



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ADANA ALPARSLAN TÜRKER BİLİM VE TEKNOLOJİ
ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

KOLESTEROLÜN SALMONELLA BAKTERİLERİNDE ANTİBİYOTİK
AKTİVİTE DEĞİŞTİRİCİ AJAN OLARAK KULLANIMI

Ceren İLGAZ
YÜKSEK LİSANS



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ADANA ALPARSLAN TÜRKER BİLİM VE TEKNOLOJİ
ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

KOLESTEROLÜN SALMONELLA BAKTERİLERİNDE ANTİBİYOTİK
AKTİVİTE DEĞİŞTİRİCİ AJAN OLARAK KULLANIMI

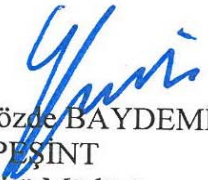
Ceren İLĞAZ
YÜKSEK LİSANS

DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ PINAR KADİROĞLU KELEBEK

ADANA 2019

**KOLESTEROLÜN *SALMONELLA* BAKTERİLERİNDE ANTİBİYOTİK AKTİVİTE
DEĞİŞTİRİCİ AJAN OLARAK KULLANIMI**

Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında Ceren İLGAZ tarafından tamamlanan Yüksek Lisans Tezi onaylanmıştır.


Doç. Dr. Gözde BAYDEMİR
PEŞİNT
Enstitü Müdürü


Prof. Dr. Haşim KELEBEK
Anabilim Dalı Başkanı


Dr. Öğr. Üyesi Pınar
KADİROĞLU KELEBEK
Danışman

Tez Jürisi


Dr. Öğr. Üyesi Pınar KADİROĞLU KELEBEK
Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi


Dr. Öğr. Üyesi Hande DEMİR
Osmaniye Korkut Ata
Üniversitesi


Dr. Öğr. Üyesi Levent Yurdaer AYDEMİR
Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji
Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi

28/06/2019

Bu tezde yer alan tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik davranışa uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu beyan ederim. Ayrıca, bu kuralların ve davranışların gerektirdiği şekilde bu çalışmaya özgün olmayan tüm bilgiler için atıf verdiğimi ve kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

[İmza]

Ceren İLGİZ

ÖZET

KOLESTEROLÜN *SALMONELLA* BAKTERİLERİNDE ANTİBİYOTİK AKTİVİTE DEĞİŞTİRİCİ AJAN OLARAK KULLANIMI

Ceren İLĞAZ

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Pınar KADİROĞLU KELEBEK

Haziran 2019, 72 sayfa

Bu çalışmada kolesterolün *Salmonella* Typhimurium bakterisinin farklı antibiyotiklere ve konsantrasyonlarına karşı dirençliliği üzerine olan etkisi araştırılmıştır. *Salmonella* Typhimurium antibiyotik direnç profili incelendiğinde; ampisilin, streptomisin, sulfametoksazol/trimetoprim, siprofloksazin, tetrasiklin, kloramfenikol ve gentamisine duyarlı olduğu; penisilin ve vankomisine karşı dirençli olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmada incelenen ampisilin, streptomisin, siprofloksazin ve sulfametoksazol/trimetoprim toz antibiyotikleri için belirlenen minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) sırasıyla; 16, 128, 0,25 ve 16 mg/L olarak bulunmuştur. MİK değerleri kolesterol bulunan ortamda, kolesterol olmayan ortamdan daha yüksek olarak bulunmuştur. Ayrıca aynı etki disk difüzyon yönteminde inhibisyon zon çaplarında azalma şeklinde görülmüştür. MİK değerindeki artış ve inhibisyon zon çapındaki azalış; kolesterolün *Salmonella* Typhimurium'un antibiyotiklere karşı duyarlılığında azaltığı şeklinde değerlendirilmiştir. Kolesterolün *Salmonella* Typhimurium'un antibiyotik ile bakteri etkileşimi üzerine etkisi, Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi ile de incelenmiştir. FT-IR analizleri sonucunda, ortama kolesterol eklendiğinde, kolesterol olmayan ortamda elde edilen bazı dalga boylarında tanımlanan fonksiyonel gruplarda değişikliklere neden olmuştur. Streptomisin, trimetoprim/sülfametoksazol ve siprofloksazin genel olarak bakterinin polisakkarit bölgesi olarak yorumlanan dalga boylarındaki piklerde değişikliğe neden olmuştur. Ampisilin diğer antibiyotiklerden farklı olarak bakterinin proteinin sentezindeki amino asitlerinin yapısındaki gözlemlenen dalga boylarında değişikliğe neden olmuştur.

Anahtar Kelimeler: Antibiyotik dirençlilik, kolesterol, *Salmonella* Typhimurium, FT-IR, disk difüzyon, MİK.

ABSTRACT

USE OF CHOLESTEROL AS AN ANTIBIOTIC ACTIVITY MODIFIER AGENT IN *SALMONELLA* BACTERIA

Ceren İLĞAZ

M.Sc., Department of Food Engineering

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Pınar KADIROĞLU KELEBEK

June 2019, 72 pages

In this study, the effect of cholesterol on *Salmonella* Typhimurium to different antibiotics and concentrations was investigated. When *Salmonella* Typhimurium antibiotic resistance profile was examined, it was observed that it is susceptible to ampicillin, streptomycin, sulfamethoxazole/trimethoprim, ciprofloxacin, tetracycline, chloramphenicol and gentamicin and resistant to penicillin, erythromycin and vancomycin. The minimum inhibitory concentrations (MIC) for ampicillin, streptomycin, ciprofloxazine and sulfamethoxazole/trimethoprim powder antibiotics were found as 16, 128, 0.25 and 16 mg/L, respectively. When the effect of cholesterol on MIC values was examined, it was found that MIC values increased in cholesterol medium than in non-cholesterol medium. There was also a decrease in inhibition zone diameters. The increase in MIC and decrement in inhibition zone diameters were considered as the cholesterol may cause a decrease in the sensitivity of *Salmonella* Typhimurium to antibiotics. The effect of cholesterol on *Salmonella* Typhimurium interaction with antibiotics were also determined by Fourier transformed infrared (FT-IR) spectroscopy. When cholesterol was added to the medium, changes were identified in the functional groups compared to non-cholesterol environment and new functional groups were observed at different wavelengths. Antibiotics generally caused changes in peaks at wavelengths which were interpreted as polysaccharide regions of bacteria. Unlike other antibiotics, ampicillin caused changes in the wavelengths observed in the amide region of the bacteria.

Keywords: Antibiotic resistance, cholesterol, *Salmonella* Typhimurium, FT-IR, disc diffusion, MIC.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, araştırma konumum belirlenmesinde, deneysel çalışmamın yürütülmesinde bana yol gösteren, beni yönlendiren, manevi desteğini benden esirgemeyen tez danışmanım, sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Pınar KADİROĞLU KELEBEK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarım sırasında yardımlarını ve çalışmam boyunca manevi desteğini benden esirgemeyen Arş. Gör. Sevgin DIBLAN hocama teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam boyunca her zaman benim yanımda olan, manevi desteğini benden esirgemeyen sevgili arkadaşım Özge AKSAY'a teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim ve hayatım boyunca her anımda benim yanımda olan, manevi destekleri hep üzerimde olan canım aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	xi
KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	3
2.1. Gıda Zincirinde Antibiyotik Direnç Yayılımı.....	3
2.2. <i>Salmonella</i> ve <i>Salmonella</i> Typhimurium'un Genel Özellikleri.....	6
2.3. Bakterilerin Antibiyotik Direnç Mekanizması.....	16
2.3.1. Antibiyotik İnaktivasyonu.....	18
2.3.2. Hedef Molekülün Değişmesi.....	19
2.3.3. Aktif Pompa Sistemleri.....	19
2.3.4. Hücre Duvarı Geçirgenliği Değişimi.....	19
2.4. <i>Salmonella</i> 'nın Direnç Gösterdiği Antibiyotik Grupları ve Direnç Mekanizmaları.....	20
2.4.1. Aminoglikozitler.....	20
2.4.2. Beta-laktamlar.....	21
2.4.3. Kinolonlar.....	22
2.4.4. Sülfonamid.....	23
2.5. Kolesterolün Antibiyotik Dirençlilik Üzerine Etkisi.....	24
2.6. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi Çalışmaları.....	27
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	31
3.1. Standart <i>Salmonella</i> Kültürünün Hazırlanması.....	31
3.2. Kolesterol Çözeltilisinin Hazırlanması.....	31
3.3. Antibiyotiklerin Hazırlanması.....	31
3.3.1. Antibiyotiklerin Temin Edilmesi.....	31
3.3.2. Toz Antibiyotiklerin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması.....	31
3.3.3. Toz Antibiyotiklerin Dilüsyon Aralığının Hazırlanması.....	32

3.4. Saf <i>Salmonella</i> Kültürlerinin Antibiyotik Duyarlılıklarının Disk Difüzyon Yöntemi ile Belirlenmesi	32
3.5. MİK Değerlerinin Belirlenmesi	33
3.5.1. Agar-Disk Difüzyon Yöntemi	33
3.5.2. Tüp Dilüsyon Yöntemi	33
3.6. Kolesterolün MİK Değerleri Üzerine Ekisinin Belirlenmesi	34
3.7. FT-IR Analiz Yöntemi.....	34
3.7.1. Örnek Hazırlama.....	34
3.7.2. FT-IR Spektroskopi Analiz Yöntemi	34
3.8. İstatistiksel Analiz	34
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	35
4.1. <i>Salmonella</i> Typhimurium'un Antibiyotik Duyarlılığı.....	35
4.2. MİK Değerlerinin Belirlenmesi.....	38
4.2.1. Agar-Disk Difüzyon Yöntemi	38
4.2.2. Tüp Dilüsyon Yöntemi	43
4.3. Kolesterolün MİK Değerleri Üzerine Ekisi.....	46
4.4. FT-IR Sonuçları.....	51
5. SONUÇLAR	62
KAYNAKLAR.....	64
ÖZGEÇMİŞ	72

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Diğer ölüm nedenleri ile karşılaştırıldığında her yıl antibiyotik dirence bağlı ölümler	3
Şekil 2.2.	<i>Salmonella</i> salgınları ile ilişkili gıdalar	7
Şekil 2.3.	Disk difüzyon yöntemine göre <i>Salmonella</i> spp. izolatlarının farklı antibiyotiklerle inhibisyon bölgesinin gösterimi.	14
Şekil 2.4.	<i>Salmonella</i> izolatlarında antibiyotik direnci.	15
Şekil 2.5.	Biyokimyasal ve genetik olarak kazanılmış direncin mekanizmaları.....	18
Şekil 2.6.	Streptomisin kimyasal yapısı	20
Şekil 2.7.	Ampisilin kimyasal yapısı.....	21
Şekil 2.8.	Siprofloksazin kimyasal yapısı	22
Şekil 2. 9.	Sülfametoksazol/trimetoprimin kimyasal yapısı.....	23
Şekil 2. 10.	Kolesterol yapısı	25
Şekil 2. 11.	Antibiyotiklerin kolesterol varlığında veya yokluğunda kültürlenmiş <i>H. pylori</i> 'nin canlılığı üzerindeki etkisi	26
Şekil 2.12.	FT-IR spektroskopisi çalışma prensibi	27
Şekil 2.13.	Altı <i>Salmonella enterica</i> serotipinin canlı hücrelerinin FT-IR spektrumları	29
Şekil 2.14.	Kolesterolün FT-IR spektrumu	30
Şekil 4.1.	<i>Salmonella</i> Typhimurium antibiyotik duyarlılık profili.....	35
Şekil 4.2.	Ampisilin MİK inhibisyon zon çapları	39
Şekil 4.3.	Streptomisin MİK inhibisyon zon çapları.....	40
Şekil 4.4.	Siprofloksazin MİK inhibisyon zon çapları	41
Şekil 4.5.	Trimetoprim/sülfametoksazol MİK inhibisyon zon çapları.....	41
Şekil 4.6.	Ampisilin tüp dilüsyon yöntemi.....	43
Şekil 4.7.	Streptomisin tüp dilüsyon yöntemi	44
Şekil 4.8.	Siprofloksazin tüp dilüsyon yöntemi	44
Şekil 4.9.	Sulfametoksazol/trimetoprim tüp dilüsyon yöntemi.....	45
Şekil 4.10.	Ampisilin kolesterol eklenmiş inhibisyon zon çapı hali	47
Şekil 4.11.	Ampisilin için kolesterollü ve kolesterolsüz ortamdaki inhibisyon zon çaplarındaki değişim	48
Şekil 4.12.	Streptomisin inhibisyon zon çapı değişimi	48
Şekil 4.13.	Siprofloksazin inhibisyon zon çaplarındaki değişim	49

Şekil 4.14.	Siprofloksazin için kolesterolü ve kolesterolsüz ortamda inhibisyon zon	
	çaplarındaki değişim	49
Şekil 4.15.	Sulfametoksazol/trimetoprim inhibisyon zon çaplarında ki değişim.....	50
Şekil 4.16.	Sulfametoksazol/trimetoprim için kolesterolü ve kolesterolsüz ortamdaki	
	inhibisyon zon çaplarındaki değişim.....	50
Şekil 4.17.	<i>Salmonella Typhimurium</i> 'un FT-IR spektrumu.....	52
Şekil 4.18.	Kolesterolün FT-IR spektrumu	53
Şekil 4.19.	Ampisilin ve bakteri etkileşimi FT-IR spektrum	54
Şekil 4.20.	Ampisilin, bakteri ve kolesterol etkileşimi FT-IR spektrumu	54
Şekil 4.21.	Ampisilin için kolesterol eklenmiş ve eklenmemiş ortamdaki FT-IR	
	spektrumları	55
Şekil 4.22.	Streptomisin ve bakteri etkileşimi FT-IR spektrumu.....	56
Şekil 4.23.	Streptomisin, bakteri ve kolesterol etkileşimi FT-IR spektrumu.....	56
Şekil 4.24.	Streptomisin için kolesterol eklenmiş ve eklenmemiş ortamdaki FT-IR	
	spektrumları	57
Şekil 4.25.	Siprofloksazin ve bakteri etkileşimi FT-IR spektrumu.....	58
Şekil 4.26.	Siprofloksazin, bakteri ve kolesterol etkileşimi FT-IR spektrumu.....	58
Şekil 4.27.	Siprofloksazin için kolesterol eklenmiş ve eklenmemiş ortamdaki FT-IR	
	spektrumları	59
Şekil 4.28.	Trimetoprim/sülfametoksazol ve bakteri etkileşimi FT-IR spektrumu.....	60
Şekil 4.29.	Trimetoprim/sülfametoksazol, bakteri ve kolesterol etkileşimi FT-IR	
	spektrumu.....	60
Şekil 4.30.	Trimetoprim/sülfametoksazol için kolesterol eklenmiş ve eklenmemiş	
	ortamdaki FT-IR spektrumlar	61

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1.	Hayvansal kaynaklı gıda ürünlerinden elde edilen antibiyotik dirençli <i>Salmonella</i> izolatlarının sayısı (Ejo ve ark., 2016).....	4
Tablo 2.2.	Gıda ürünlerinden izole edilen <i>Salmonella</i> spp.'nin antibiyotik direnç profilleri (Ejo ve ark., 2016)	4
Tablo 2.3.	Antibiyotiğe Dirençli Gıda Kaynaklı Salgınlar (CSPI)	10
Tablo 2.4.	Antibiyotik disk difüzyon yöntemine göre duyarlı, orta duyarlı ve dirençli izolatların yüzdesi (Fallah ve ark., 2015).....	11
Tablo 2.5.	Disk difüzyon yöntemi ile test edilen tavuk eti örneklerinden izole edilen <i>Salmonella</i> Enteritidis ve <i>Salmonella</i> Typhimurium'un antimikrobiyal duyarlılık paterni	12
Tablo 2.6.	Tavuk eti örneklerinden izole edilen ve <i>Salmonella</i> Typhimurium'un antibiyotik direnç profili paterni ve çoklu antibiyotik direnci indeksi.....	13
Tablo 2.7.	<i>S. Typhimurium</i> 'un çeşitli antibiyotiklere direnci.....	13
Tablo 2.8.	<i>Salmonella</i> spp. izolatlarının antibiyotik duyarlılık profili	14
Tablo 2.9.	Çalışmada test edilen 58 <i>S. Typhimurium</i> izolatının antimikrobiyal duyarlılık profillerinin değerleri.....	16
Tablo 2.10.	Yaygın olarak kullanılan antimikrobiyal ajanların etki mekanizması ve direnci.....	17
Tablo 2.11.	<i>Salmonella</i> 'nın farklı antimikrobiyal ilaçlara direnç özellikleri.....	24
Tablo 2.12.	Deneyssel olarak elde edilen titreşim frekans verilerinin literatür değerleri ile karşılaştırılması.	30
Tablo 3.1.	Antibiyotiklerin Hazırlanması ve MİK Değerlerinin Belirlenmesi için Tavsiye Edilen Aralık Değerleri	32
Tablo 4.1.	<i>Salmonella</i> Typhimurium antibiyotik duyarlılık profili.....	35
Tablo 4.2.	Antibiyotiklerin MİK sonuçları ve standarda göre değerlendirilmesi	38
Tablo 4.3.	Antibiyotiklerin kolesterol eklenmiş ve eklenmemiş halinde inhibisyon zon çaplarındaki değişim	47

KISALTMALAR

WEF	: Dünya Ekonomik Forumu
CDC	: ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi
ECDC	: Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
NARMS	: Ulusal Antimikrobiyal Direnç İzleme Sistemi
FT-IR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
AML	: Amoksisilin
AMP	: Ampisilin
KF	: Sefalotin
CRO	: Seftriakzon
CN	: Gentamisin
NA	: Nalidiksik asit
SXT	: Sülfametoksazol- trimetoprim
TE	: Tetrasiklin
C	: Kloramfenikol
VA	: Vankomisin
E	: Eritromisin
S	: Streptomisin
CIP	: Siprofloksazin
P	: Penisilin
LPS	: Lipopolisakkarit
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
WGS	: Tüm Genom Dizilimi
CSPI	: Kamu Yararına Bilim Merkezi
PFGE	: Darbeli alan jel elektroforezi
Mcr-1	: Plazmid Aracılı Kolistin Direnci
CLSI	: Klinik Laboratuvarlar Standartları Enstitüsü
DANMAP	: Danimarka Bütünleşik Antimikrobiyal Direnç İzleme ve Araştırma Programı
DMSO	: Dimetil sülfoksit
EUCAST	: Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi

PBP : Penisilin bağlayan proteinler
ESBL : Geniş spektrumlu β -laktamazlar



1. GİRİŞ

Dünyanın her yerinde küresel bir sorun haline gelen antibiyotik dirençliliği Dünya Ekonomik Forumu'nun (The World Economic Forum) (WEF) Küresel Riskler raporlarına göre, insan sağlığı için en büyük tehditlerden biri olarak listelenmiştir. ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (Center for Disease Control and Prevention) (CDC), Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi (European Centre for Disease Prevention and Control) (ECDC) ve Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization) (WHO) gibi organizasyonlar, çoklu ilaç dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonları küresel bir hastalık ve önemli bir halk sağlığı sorunu olarak değerlendirmektedir (Roca ve ark., 2015).

Antibiyotik direnci, bakteriler üzerinde etkili olan ve onu duyarlı hale getiren antibiyotiklerin bakteriyostatik (bakteri büyümesini ve üremesini inhibe eden) veya bakteriyosidal (bakterileri öldüren) etkilerinin durdurulması olarak tanımlanmaktadır (Lee ve ark., 2009). *Salmonella*'nın, antimikrobiyal dirençli suşlarının ortaya çıkması ve yayılması gıda kaynaklı hastalıkların ana nedeni olarak belirlenmiştir (Ejo ve ark., 2016). 1996'dan beri, Ulusal Antimikrobiyal Direnç İzleme Sistemi (NARMS), test edilen 17 antimikrobiyal maddenin dokuzuna karşı dirençli olan *Salmonella* izolatlarının sayısının arttığını tespit etmiştir. Bu antibiyotikler; amoksisilin/klavulanat, ampisilin, sefoksitin, seftiofur, sefalotin, kloramfenikol, streptomisin, sülfametoksazol ve tetrasiklidir. Hastalığa sebep olan *Salmonella* bakterisinin serovarlarından *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, gram negatiftir, kamçılı, aerobik bir bakteridir. Küresel olarak en sık izole edilen *Salmonella* serovarıdır. *S. Typhimurium* vakalarının çoğu kontamine domuz eti, kümes hayvanları ve sığır eti tüketimi ile ilişkilidir. Et ve yumurta dahil olmak üzere çiğ veya az pişmiş enfekte gıdalar yoluyla da insanlara aktarılmaktadır. Çoklu ilaç dirençli *Salmonella enterica* serovar Typhimurium suşları, 1980'lerin ortalarında izole edilmiştir ve tipik olarak ampisilin, kloramfenikol, streptomisin, sülfonamidler ve tetrasikline karşı dirençli olarak belirlenmiştir (Ribot ve ark., 2002).

Salmonella popülasyonlarında antimikrobiyal direncin yayılması için kritik iki mekanizma vardır. Bu mekanizmalar antibiyotik direnç genlerinin yatay transferi ve antimikrobiyal ilaca dirençli *Salmonella* izolatlarının klonal yayılmasıdır (Alcaine ve ark., 2016). *Salmonella* popülasyonunda birden fazla aktivite değiştirici ajana karşı gösterilen direnç mekanizmaları, salmonellozun kontrolünde ve tedavisinde sorunlar yaratmaya başlamaktadır (Taşkale, 2010).

Bakterilerin antibiyotiklere karşı geliştirdikleri direnç mekanizmaları üzerine etki edebilecek ve bu mekanizmaları değiştirebilecek yeni formda ilaçlar veya yöntemler geliştirilmelidir. Kolesterol, bakterilerin sitoplazmik hücre zarında bulunmaz. Fakat kolesterol bakteri hücre zarının mozaik sıvı yapısını etkileyebilmekte, akışkanlığını değiştirebilmekte ve dolayısı ile antibiyotiklerin etki edebilmesi için daha duyarlı hale getirebilmektedir (Andrade ve ark., 2014).

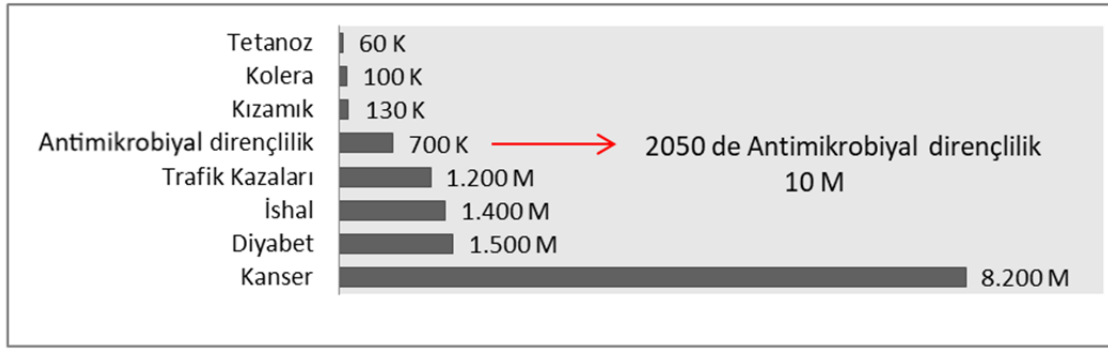
Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi bir titreşim spektroskopisi şeklidir ve FT-IR spektrumu hem moleküler yapıyı hem de moleküler ortamı yansıtmaktadır (Duygu ve ark., 2009). Spektrum, mikroorganizmaların tanımlanmasını sağlayan spektroskopik bir parmak izi görevi görmektedir (Naumann ve ark., 1991; Maquelin ve ark., 2003). FT-IR spektroskopisi bakterilerin hızlı ve eř zamanlı karakterizasyonunu sağlamaktadır (Helm ve ark., 1991; Schallehn ve ark., 1991; Naumann ve ark., 1991). FT-IR tekniği çeşitli alanlarda (klinik, çevresel, gıda mikrobiyolojisi) çok hızlı sınıflandırma, farklı mikrobiyal türlerin ve suşların farklılaşması amacıyla, analitik bir yöntem olarak kullanılabilir (Naumann, 1998).

Yapılan literatür araştırmaları sonucunda kolesterolün *Salmonella* bakterilerinin antibiyotik dirençliliği üzerine etkisinin incelendiği herhangi bir çalışmanın bulunmadığı görölmüşütdür. Bu yüksek lisans tez çalışmasının amacı kolesterolün antibiyotik duyarlılığı belirlenmiş *Salmonella* Typhimurium bakterisinin farklı antibiyotiklere ve konsantrasyonlarına karşı dirençlilik profili üzerine olan etkisinin mikrobiyolojik yöntemler kullanılarak belirlenmesi ve Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) spektroskopisinin hızlı ve güvenilir bir yöntem olarak bu etkinin belirlenmesinde uygulanabilirliğinin araştırılmasıdır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Gıda Zincirinde Antibiyotik Direnç Yayılımı

Son on yılda, antibakteriyel maddelere karşı çoklu ilaç direnci gösteren bakteriyel ve patojenlerin sayısında önemli bir artış görülmektedir. Antibiyotik direnci her yıl dünya çapında tahminen 700.000 insanın ölümüne neden olmakta ve bazı uzmanlar Şekil 2.1’de de verildiği gibi, dirençleri azaltmak veya yeni antibiyotikler geliştirmek için çaba gösterilmediği takdirde 2050 yılına kadar bu rakamın 10 milyona ulaşabileceğini öngörmektedir (O’Neill ve Jim, 2014).



Şekil 2.1. Diğer ölüm nedenleri ile karşılaştırıldığında her yıl antibiyotik dirence bağlı ölümler (Antibiyotik dirençlilik derleme, 2014)

Antibiyotik direnci sadece tıp alanında değil, aynı zamanda gıda ürünü olan çiftlik hayvanlarında da önemli bir sorun haline gelmiştir. Son zamanlarda, çok sayıda raporda, sığır, kümes hayvanları, domuz gibi çeşitli hayvansal kaynaklardan elde edilen gıda ürünlerinde (yemeye hazır et, pişmiş et ve dökme süt) çok miktarda antibiyotiğe dirençli bakteri ve direnç genlerinin varlığı belirlenmiştir (Liu ve ark., 2016). Ejo ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada, toplam 21 *Salmonella* izolatı, dokuz farklı antibiyotik kullanılarak antibiyotik duyarlılık testine tabi tutulmuştur. Genel olarak, antibiyotik duyarlılık testi sonucunda, seftriakzon, gentamisin ve nalidiksik asidin, bu çalışmadan izole edilen *Salmonella* spp.'e karşı etkili olan antibiyotikler olduğu ortaya konulmuştur (Tablo 2.1.). Gıda ürünlerinden (çiğ et, kıyılmış et, çiğ yumurta ve çiğ süttten) izole edilen dirençli *Salmonella* spp. izolatlarının antimikrobiyal direnç profilleri Tablo 2.2.'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Hayvansal kaynaklı gıda ürünlerinden elde edilen antibiyotik dirençli *Salmonella* izolatlarının sayısı (Ejo ve ark., 2016)

Gıda örneklerinden izole edilen dirençli izolatların sayısı					
Antibiyotik	Kıyma (n= 1)	Çiğ et (n=3)	Çiğ yumurta (n=5)	Çiğ süt (n=1)	Toplam (n=10)
Amoksisilin(AML)	1 (%100)	0	1 (%20)	1 (%100)	3 (%30)
Ampisilin (AMP)	0	0	1 (%20)	1 (%100)	2 (%20)
Sefalotin (KF)	1 (%100)	1 (%33.3)	0	0	2 (%20)
Seftriakzon (CRO)	0	0	0	0	0
Gentamisin (CN)	0	1 (%33.3)	0	0	1 (%10)
Nalidiksik asit (NA)	0	0	2 (%40)	0	2 (%20)
Nitrofurantoin (F)	1 (%100)	1 (%33.3)	2 (%40)	0	4 (%40)
Sülfametoksazol-Trimetoprim (SXT)	1 (%100)	1 (%33.3)	2 (%40)	0	4 (%40)
Tetrasiklin (TE)	1 (%100)	3 (%100)	4 (%80)	1 (%100)	9 (%90)

n: dirençli izolat sayısı

Tablo 2.2. Gıda ürünlerinden izole edilen *Salmonella* spp.'nin antibiyotik direnç profilleri (Ejo ve ark., 2016)

Direnç şekli	Antibiyotik profilleri	Dirençli izolatlar	Gıda maddelerinin kaynağı
Çoklu ilaç dirençli	AMP,F,SXT,TE	1	Kıyma
Çoklu ilaç dirençli	AML,AMP,NA,TE	1	Çiğ yumurta
Çoklu ilaç dirençli	KF,CN,SXT,TE	1	Çiğ et
Çoklu ilaç dirençli	AML,AMP,TE	1	Çiğ süt
Çoklu ilaç dirençli	CN,SXT,TE	1	Çiğ yumurta
Çoklu ilaç dirençli	F,TE	1	Çiğ et
Çoklu ilaç dirençli	NA,SXT	1	Çiğ yumurta
Çoklu ilaç dirençli	SXT,TE	1	Çiğ yumurta
Mono ilaç dirençli	SXT	1	Çiğ yumurta
Mono ilaç dirençli	TE	1	Çiğ et

AML: amoksisilin; AMP: ampisilin; KF: sefalotin; CRO: seftriakzon; CN: gentamisin; NA: nalidiksik asit; F: nitrofurantoin; SXT: sülfametoksazol- trimetoprim; TE: tetrasiklin

Hayvanlara büyümelerini teşvik etmek veya yem verimliliğini artırmak için antibiyotik verildiğinde, bakteriler uzun bir süre boyunca bu ilaçların düşük dozlarına maruz kalmaktadır. Bu durum bakteriler arasında antibiyotik direncinin yaygınlığını artırmakta, böylece dirençli suşların neden olduğu bakteriyel enfeksiyonların insidansı artmaktadır. Hayvanlarda antimikrobiyal kullanımının istenmeyen bir diğer sonucu da, antimikrobiyal dirençli zoonotik gıda kaynaklı bakteriyel patojenlerin potansiyel gelişimidir. Bu gelişim gıda kontaminantları olarak insanları etkilemektedir (O'Bryan ve ark., 2017).

Hayvanlar ve bitkiler dahil olmak üzere çevresel ortamlar patojenik ve patojenik olmayan dirençli bakteriler için bir iletim yolu görevi görmektedir. Ayrıca, gıda üretim tesisleri ve gıda

tedarik zinciri de bu dirençli bakterilerin çevreye, hayvanlara ve insanlara geçişinde önemli bir rol oynayabilmektedir (FAO ve WHO, 2011).

Hayvanlardan ve çevreden bakterilere antibiyotik direnç genlerinin aktarılmasında kritik bir özellik, direnç fenotiplerine katkıda bulunan genleri seçen bir antibiyotik etki varlığıdır. Antibiyotik direnç durumunda, antibiyotikler, duyarlı bakterileri öldürerek, antibiyotiğe dirençli bakterilerin hayatta kalmasını ve çoğalmasını sağlarlar. Bu etki, taşıdıkları direnç genlerinin iletilmesine yardımcı olarak duyarlı olanlara oranla dirençli bakterileri ortaya çıkarmaktadır (Bengtsson-Palme, 2017).

Yiyeceklerde hem dirençli hem de dirençli olmayan patojenlerin risk değerlendirmesinde, gıda hazırlığının öneminin bilinmesi gereklidir. Uygun şekilde pişirilmiş veya bakterileri öldürecek şekilde hazırlanmış yiyecekler, bakterilerin insanları enfekte etmesine veya kolonileştirmesine engel olmaktadır. Bu durum aynı zamanda, sebze ve meyvelerin et ve balıktan daha çığ veya işlem uygulanmadan tüketilmesinin daha muhtemel olması nedeniyle risk olasılığını artırmaktadır. Bu nedenle, sebze ve meyvelerin hazırlanması, muhafaza edilmesi ve paketlenmesi, çevresel bakterilerin insan mikrobiyomunu etkilemesi açısından önem taşımaktadır (Bengtsson-Palme, 2017).

Dirençli bakteriler toprakta, suda, insan veya hayvan dışkısında bulunabilmektedir. Hayvansal ürünlere, kesim sırasında fekal kontaminasyon sonucunda antimikrobiyal dirençli bakteriler geçebilir. Bitkisel ürünler, insan veya hayvan dışkısı ile kontamine olmuş sulama suyunun veya kanalizasyon deşarjlarının kullanılması sonucu üretim sırasında antimikrobiyal dirençli bakterilerle kontamine olabilmektedir (Bér zin ve ark., 1997). Kontaminasyon, gıda üretiminden sonra ortaya çıkabilmekte ya da gıdalar işleme sırasında ortamda bulunan antimikrobiyal dirençli bakteriler veya antimikrobiyal dirençli genler ile kontamine olabilmektedir (Verraes ve ark., 2013).

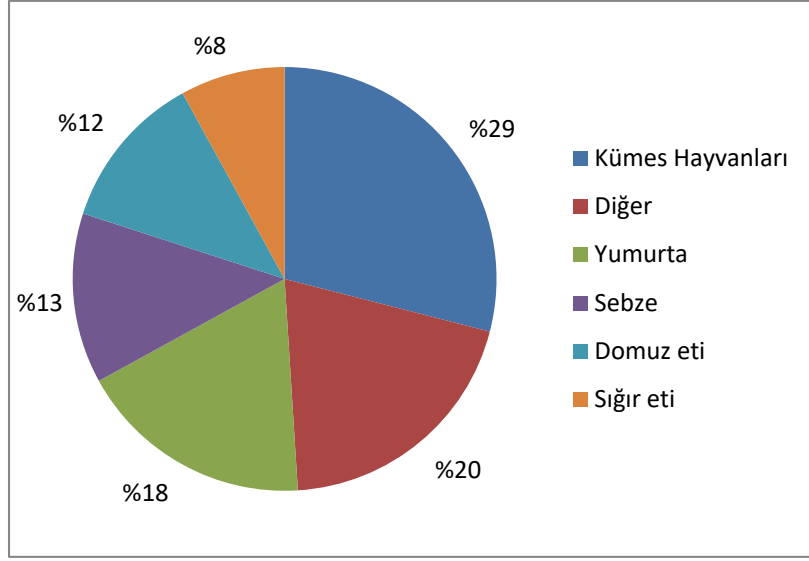
Antibiyotik alan gıda hayvanlarının bağırsaklarında antibiyotik dirençli bakterilerin gelişmesi ve bu hayvansal ürünlerin yeterince ısıtılma işlem görmemesi sonucunda da antibiyotik dirençli bakteriler insanlara bulaşabilmektedir (Singer 2003).

Dirençli bakteriler ve antibiyotiğe dirençli genler, gıda üretim zincirinin her aşamasında kolaylıkla yayılabilmekte (Da Costa ve ark., 2013; FAO, 2015) ve insanlarda enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Antibiyotik direnç genlerinin yayılması, gıda zinciri boyunca doğrudan veya dolaylı temas yoluyla mümkündür. Doğrudan temas, insanların hayvanlara ve biyolojik maddelere (kan, idrar, dışkı, süt, tükürük ve semen gibi) hemen maruz kalmasını takiben oluşur ve dirençli bakterilerin konakçıdan konakçıya hızlı ve kolay yayılmasına neden olmaktadır. İnsanlar, kontamine gıda ürünleri ile (örn., et, yumurta, süt ve süt ürünleri) temas veya tüketim ile dolaylı olarak antibiyotiğe dirençli bakterilere ve dirençli genlere maruz kalabilmektedir (Marshall ve Levy, 2011).

Uluslararası gıda standartları, gıda kaynaklı oluşan direnç yayılımının gıda üretiminin risk analizinde dikkate alınması gerektiğini ve dirençli bakterilerin izlenmesinin etkili risk yönetimi stratejilerinin belirlenmesinde kritik öneme sahip olduğunu ortaya koymaktadır (FAO ve WHO, 2011).

2.2. *Salmonella* ve *Salmonella Typhimurium*'un Genel Özellikleri

Patojenler arasında *Salmonella*, dünya çapında en yaygın gıda kaynaklı patojen olarak kabul edilmektedir ve özellikle gelişmekte olan ülkelerde, hayvanlar ve insanlarda ekonomik öneme sahip önemli bir zoonotik mikroorganizma olarak görülmektedir (Ejo ve ark., 2016). Şekil 2.2.'de de verildiği gibi *Salmonella* enfeksiyonu (salmonelloz) kontamine çiğ sebze, meyve, et, süt, süt ürünleri, yumurta, balık ve su ürünlerinin pişirilmeden kullanılması, pastörize edilmemiş süt, yoğurt, dondurma ve süt ürünleri kullanılması, sanitasyon ve hijyene dikkat edilmeden hazırlanmış gıdaların tüketilmesi sonucunda bulaşabilmektedir. Dünya çapında en yaygın gıda kaynaklı patojenlerden biri olan *Salmonella* sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde 1.3 milyon vakada salmonelloza neden olduğu tahmin edilmektedir. Bu da her yıl 15.000 hastanede yatışa ve yaklaşık olarak 500 ölüme neden olmaktadır (Callaway, 2008).



Şekil 2.2. *Salmonella* salgınları ile ilişkili gıdalar (CDC, Ulusal Salgın Raporlama Sistemi).

Salmonella cinsi, *Enterobacteriaceae* familyasına ait fakültatif anaerob, çubuk şeklinde, hareketli, kapsülsüz ve gram negatif bakterilerdir. Optimum üreme sıcaklıkları 35-37° C 'dir. Optimal pH değeri 6.5 - 7.5'dir. *Salmonella* cinsi iki tür içerir, *S. enterica* ve *S. bongori*. *S. enterica* ayrıca karbonhidrat, flagellar ve lipopolisakkarit (LPS) yapılarının kompozisyonuna dayanarak biyokimyasal olarak farklılaştırılmış altı alt türe bölünmüştür. Tüm *Salmonella* serotipleri, kapsüler (Vi) antijenlerine ek olarak somatik (O) ve flagellar (H) antijenlerini temel alan bir antijenik formül ile tanımlanmaktadır (Hurley ve ark., 2014).

Salmonella enfeksiyonu bağırsak sistemini etkileyen yaygın bir bakteriyel hastalıktır. *Salmonella* türleriyle enfeksiyonun ardından, konağın duyarlılığına bağlı olarak çeşitli şekillerde klinik belirtiler ortaya çıkmaktadır. Bulaşıcı etkenlerden, *S. Typhi* ve *S. Paratyphi*, ölüme neden olabilen ince bağırsak enfeksiyonlarıyla sınırlı tifo benzeri hastalığa, *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* ise tifoidal olmayan gastroenterite neden olmaktadır (López ve ark., 2012). Gelişmekte olan ülkelerde yaygın olan tifonun aksine, tifodial olmayan *Salmonella* salmonellozları dünya çapında görülmektedir. Her yıl bu enfeksiyon nedeniyle yaklaşık 93.8 milyon gastroenterit vakasına rastlanmakta ve bu da yaklaşık 155.000 ölümle sonuçlanmaktadır. Kanatlı hayvan, yumurta ve süt ürünleri gibi kontamine hayvansal kaynaklı gıda ürünlerine ek olarak, tifodial olmayan *Salmonella* aktarımı kişiden kişiye temas veya kediler, köpekler, kemirgenler, sürüngenler veya amfibiler gibi evcil hayvanlarla temastan kaynaklanabilmektedir (Gal-Mor ve ark., 2014).

Hem insanlarda hem de hayvanlarda antibiyotiğe dirençli *Salmonella* enfeksiyonları, özellikle hijyenik olmayan yaşam koşulları, hayvanlar ve insanlar ile yakın temas, az pişmiş hayvansal gıda maddeleri ya da çiğ tüketim nedeniyle enfeksiyon riskinin yüksek olduğu gelişmekte olan ülkelerde önemli bir problemdir. Antibiyotiğe dirençlilik ve potansiyel olarak daha patojenik türlerin ortaya çıkması ve yayılmasından dolayı bu patojen ile ilgili endişe giderek artmaktadır. Antimikrobiyal dirençli *Salmonella* spp., antimikrobiyallerin, tıp ve veteriner alanlarında terapötik veya profilaktik ajanların uygunsuz kullanımına bağlı olarak ve ayrıca hayvansal üretimde büyüme promotörlerinin kullanımından dolayı, dünyanın dört bir yanındaki hayvansal gıdalardan izole edilmiştir (WHO, 2012). Özellikle florokinolonlara ve üçüncü kuşak sefalosporinlere karşı ve çeşitli antimikrobiyal maddelere dirençli *Salmonella* suşları, dünya çapında ortaya çıkan önemli bir problem olarak kabul edilmekte ve etkileri daha yüksek morbidite ve mortalite oranları ile birlikte yüksek tedavi maliyetleri ile sonuçlanmaktadır (WHO, 2012).

Salmonella enterica serovar Typhimurium, insanlarda klinik olarak bildirilen salmonelloz ile ilişkilendirilen önemli serovarlardan biridir ve enfeksiyonların en az % 15'ini oluşturmaktadır (Scallan, 2011). Salmonellozla ilişkili olan gastroenterit veya bağırsak iltihabının oluşumuna neden olan bu serovar, Gram-negatif, kamçılı, aerobik bakterilerdir (Black, 2008). Toksisitesi, bakterileri ortamdan koruyan büyük ölçüde lipopolisakaritlerden (LPS) oluşan bir dış zarıdan kaynaklanır. LPS, bir O-antijeni, bir polisakarit çekirdeği ve onu dış zara bağlayan lipit A'dan oluşur. *S. Typhimurium* kontamine yiyecek ve içeceklerle yayıldığı gibi, virüslü bir hayvan veya evcil hayvanla doğrudan temas yolu ile de insanlara aktarılabilmektedir (Torpdahl et al., 2013). En sık görülen risk faktörü, az pişmiş sığır eti, domuz eti ve kuzu eti gibi gıdalardır.

S. Typhimurium'un neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibiyotiklere karşı gösterilen duyarlılığın azalması, bu patojenin antibiyotik direnç genlerini diğer bakterilere yayma potansiyeli eğilimde olduğunu göstermektedir (Blake ve ark., 2013). Bu durum önemli bir endişe nedenidir çünkü uzun süren yeni ilaç gelişim süreci nedeniyle hastalığa neden olan bakterilerin dirençli suşlarının tedavisi giderek daha zor hale gelmektedir (Chen ve ark., 2019).

Çoklu ilaç dirençli *Salmonella enterica* serovar Typhimurium suşları; ampisilin, kloramfenikol, streptomisin, sülfonamidler ve tetrasiklinler gibi birçok ilaca dirençli olarak tanımlanmıştır (Chen ve ark., 2019). Tüm direnç genleri, sınıf 1 integronun bir parçası olarak bulunmuştur ve bu genetik yapıya sahip türler, dünyanın farklı yerlerinde tanımlanmıştır (Faldynova ve ark., 2005).

CDC'nin 2018 verilerinden elde edilen bir salgın vakasında; Amerikan Gıda ve İlaç Dairesinin (FDA) yapmış olduğu testler ile, organik ürün satan marketten alınan hindistan cevizlerinin açılmamış bir numunesinde *Salmonella* Typhimurium tanımlanmıştır. Tüm Genom Dizilimi (whole genome sequencing-WGS) sonuçları, kurutulmuş hindistan cevizindeki *Salmonella*'nın genetik olarak hasta insanlar ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu sonuç, bu salgındaki insanların kontamine olmuş kurutulmuş hindistan cevizi yemekten hastalandıklarına dair kanıt sağlamıştır.

2018 yılında meydana gelen başka bir salgında ise *Salmonella* Typhimurium'un suşları ile enfekte toplam 265 kişi bildirilmiştir. Görüşülen 222 kişiden 194'ü (% 87) marketlerden satın aldıkları tavuk salatasını yediklerini bildirmiştir. Araştırmacılar tarafından, laboratuvar testleri için tavuk salatası satın alınan marketten örnekler toplanmış ve örneklerde *Salmonella* Typhimurium suşu tanımlanmıştır.

Kamu Yararına Bilim Merkezi (The Center for Science in the Public Interest) (CSPI)' nin yayınladığı bir raporda da, çoğunlukla hayvansal kökenli gıdalar ile insanlarda antibiyotik dirençli patojenlerin neden olduğu salgınlar arasındaki bağlantıyı göstermektedir. Tablo 2.3'te 2000 ve 2011 yılları arasında bildirilen gıda kaynaklı vakalarda izole edilen *Salmonella* Typhimurium bakterilerinin en az bir antibiyotiğe dirençli olduğunu göstermektedir.

Tablo 2.3. Antibiyotiğe Dirençli Gıda Kaynaklı Salgınlar (CSPI)

Yıl	Bakteri	Gıda/Kaynak	Vaka Sayısı	Hastane	Ölüm	Antibiyotik Dirençlilik	İlaç Grubu	WHO Durumu
2000	S.Typhimurium	Pastörize süt	93	6	0	Ampisilin	Penisilin	Kritik
						Streptomisin	Aminoglikozit	Kritik
						Sülfametoksazol	Aminoglikozit	Yüksek
						Tetrasiklin	Tetrasiklin	Yüksek
2005	S.Typhimurium	Suşi	25	0	0	Amoksisilin-klavulanat	Penisilin	Kritik
						Ampisilin	Penisilin	Kritik
						Kloramfenikol	Kloramfenikol	Yüksek
						Streptomisin	Aminoglikozit	Kritik
						Tetrasiklin	Tetrasiklin	Yüksek
2006	S.Typhimurium	Kök Sebzeler	3	NR	NR	Amoksisilin-klavulanat	Penisilin	Kritik
						Ampisilin	Penisilin	Kritik
						Kloramfenikol	Kloramfenikol	Yüksek
						Streptomisin	Aminoglikozit	Kritik
						Tetrasiklin	Tetrasiklin	Yüksek
2011	S.Typhimurium	Dana kıyma	20	8	0	Amoksisilin-klavulanat	Penisilin	Kritik
						Ampisilin	Penisilin	Kritik
						Seftriakzon	Sefalosporin	Kritik
						Kanamisin	Aminoglikozit	Yüksek
						Streptomisin	Aminoglikozit	Kritik
						Tetrasiklin	Tetrasiklin	Yüksek

Salmonella enterica'nın tifodial olmayan *Salmonella* serotiplerinin bir çoğu salmonelloz tedavisinde yaygın olarak kullanılan antimikrobiyallere karşı direnç geliştirmiştir. Kuang ve ark. tarafından yapılan çalışmada, Şanghay'da insanlardan, yiyeceklerden, hayvanlardan ve sudan izole edilen 3680 *Salmonella* suşları içerisinde 179 izolatın siprofloksasine dirençli olduğu belirlenmiştir. Bu suşlar içerisinde en yaygın olan suşlar *S. Typhimurium* (n = 64,% 35.8) ve *S. Indiana* (n = 45,% 25.1) olarak tanımlanmıştır. Kinolon olmayan ilaçlar arasında izolatların en yüksek direnç gösterdiği antibiyotikler sulfisoksazol (% 95.0), ampisilin (% 92.7), tetrasiklin (% 86.6) ve trimetoprim / sülfametoksazol (% 84.4) olarak belirlenmiştir. Darbeli alan jel elektroforezi (PFGE) analizlerinin sonuçları, domuz dışkısı ve domuz ürünlerinden izole edilen *S. Typhimurium* izolatlarının çoğu hastadan izole edilen izolatlarla oldukça benzer bir PFGE paterni gösterdiğini göstermiştir; bu da domuzların, Şanghay'da insanlarda hastalıklara neden olan siprofloksasine dirençli *S. Typhimurium* izolatlarının ana kaynağı olabileceğini düşündürmektedir (Kuang ve ark., 2018).

Gıda değeri olan hayvanların beslenmesinde antibiyotiklerin geniş kullanımı nedeniyle insanlara aktarılabilen ilaca dirençli bakterilerin ortaya çıkması, antibiyotiğe dirençli *Salmonella*'yı dünya çapında ciddi bir problem haline getirmektedir. Fallah ve ark. (2015)

tarafından yapılan bir çalışmada, tifodial olmayan *Salmonella* spp.'de antibiyotik direnç paterni belirlenmiştir. Bu çalışma, 196 perakende piyasasından toplanan 100 tavuk örneği üzerinde yapılmıştır. Bütün suşlar sefotaksim ve siprofloksasine duyarlı ve nalidiksik asit, tetrasiklin ve streptomisine karşı dirençli olarak bulunmuştur. Antibiyotik disk difüzyon yöntemine göre duyarlı, orta duyarlı veya dirençli izolatların yüzdesi Tablo 2.4'de verilmiştir (Fallah ve ark., 2015).

Tablo 2.4. Antibiyotik disk difüzyon yöntemine göre duyarlı, orta duyarlı ve dirençli izolatların yüzdesi (Fallah ve ark., 2015)

Antibiyotikler	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli
Nalidiksik asit	0	0	100
Tetrasiklin	0	0	100
Streptomisin	0	0	100
Amoksisilin	30	0	70
Kloramfenikol	28	0.8	64
Trimetoprim	20	14	66
Amoksisilin-klavulanat	34	34	32
Seftazidim	44	28	28
Kolistin	76	0	24
Ampisilin	80	10	10
Gentamisin	98	0	0.2
İmipenem	98	0.2	0
Sefotaksim	100	0	0
Siprofloksazin	100	0	0

Salmonella enterica serovarları arasında *Salmonella* Typhimurium, dünya çapında en sık izole edilen serotipler arasındadır. Antimikrobiyallerin yaygın kullanımı, kinolonlara ve florokinolonlara karşı dirençli olan NTS *Salmonella* suşlarının artmasına neden olmuştur. Bu azalmış duyarlılık, bazı durumlarda tedavi başarısızlığına neden olabilmektedir. Almedia ve ark.'nın yaptığı çalışmada, 90 *Salmonella* Typhimurium suşu, 1983 ve 2013 yılları arasında Brezilya'daki farklı coğrafi bölgelerden insanlardan ve yiyeceklerden izole edilmiştir. İncelenen 90 *S. Typhimurium* suşunun 65'i (% 72.2) sülfonamidlere dirençli, 44 suş (% 48.9) streptomisine dirençli, 27 suş (% 30) tetrasikline, 21 suş (% 23.3) gentamisine ve 7 suş (% 7.8) seftriaksona dirençli olarak bulunmuştur. *Salmonella* Typhimurium suşlarında bulunan dirençli genlerin çeşitliliği ve prevalansı, insanlar için potansiyel tehlikesini ortaya koymuştur (Almedia ve ark., 2018).

2500'den fazla *Salmonella* serotipi arasında, *Salmonella* Enteritidis ve *Salmonella* Typhimurium, insanlarda sıklıkla hastalıklara neden olan serovarlardır (Rodpai ve ark., 2013). İnsanlarda *S. Enteritidis* vakaları çoğunlukla kontamine yumurta ve kümes hayvanı eti

tüketimi ile ilişkilendirilirken, *S. Typhimurium*, kontamine domuz eti, kümes hayvanları ve sığır eti tüketimi ile ilgilidir (Spector ve Kenyon, 2012; Park ve ark., 2014). Thong ve ark.'nın yaptıkları çalışma, pazarlarda ve hipermarketlerde çiğ tavuk etinde *Salmonella* Enteritidis ve *Salmonella* Typhimurium'un oluşumunu incelemek ve ayrıca *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium*'un antibiyotik duyarlılık profilini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Çoklu ilaç dirençli *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* izolatları en az üç antibiyotiğe (eritromisin, penisilin ve vankomisin) dirençli olarak bulunmuştur. Tüm izolatlar eritromisin, penisilin ve vankomisine dirençliyken amoksisilin / klavulanik asit, gentamisin, tetrasiklin ve trimethoprim karşı duyarlı olarak bulunmuştur (Tablo 2.5) (Thong ve ark., 2016). Direnç profillerine dayanarak, *S. Typhimurium* izolatları test edilen toplam antibiyotik sayısının dirençli antibiyotik sayısına oranı açısından en yüksek çoklu ilaç direnci indeks değerini göstermiştir (Tablo 2.6).

Tablo 2.5. Disk difüzyon yöntemi ile test edilen tavuk eti örneklerinden izole edilen *Salmonella* Enteritidis ve *Salmonella* Typhimurium'un antimikrobiyal duyarlılık paterni (Thong ve ark., 2016)

Antibiyotikler	Test edilen izolatlar	S. Enteritidis ve S. Typhimurium Antibiyotik Duyarlılık Profili		
		*Dirençli (%)	*Orta duyarlı (%)	*Duyarlı (%)
Amoksisilin	11	3 (27.27)	-	8 (72.73)
Ampisilin	11	8 (72.73)	3 (27.27)	-
Amoksisilin-klavulanik asit	11	-	-	11 (100)
Sefazolin	11	3 (27.27)	2 (18.18)	6 (54.55)
Seftazidim	11	-	3 (27.27)	8 (72.73)
Siprofloksazin	11	3 (27.27)	8 (72.73)	-
Eritromisin	11	11 (100)	-	-
Gentamisin	11	-	-	11 (100)
Kanamisin	11	-	3 (27.27)	8 (72.73)
Penisilin	11	11 (100)	-	-
Nalidiksik asit	11	1 (9.09)	3 (27.27)	7 (63.64)
Streptomisin	11	1 (9.09)	3 (27.27)	7 (63.64)
Tetrasiklin	11	-	-	11 (100)
Trimetoprim	11	-	-	11 (100)
Vankomisin	11	11 (100)	-	-

*Test edilen izolatlardan dirençli, orta duyarlı ve duyarlı izolatların sayısı ve yüzdesi

Tablo 2.6. Tavuk eti örneklerinden izole edilen ve *Salmonella* Typhimurium'un antibiyotik direnç profili paterni ve çoklu antibiyotik direnci indeksi

<i>Salmonella</i> serovar	Perakende	Antibiyotik direnç profili	Çoklu ilaç direnç indeksi
S.Typhimurium	Pazar	AML,KZ,CIP,E,P,VA	0.4
S.Typhimurium	Pazar	AML,KZ,CIP,E,P,VA	0.4
S.Typhimurium	Hipermarket	AML,KZ,CIP,E,P,VA	0.4

AML - Amoksisilin; AMP - Ampisilin; KZ - Sefazolin; CIP - Siprofloksasin; E - Eritromisin; P - Penisilin; VA - Vankomisin.Çoklu ilaç direnç indeksi = dirençli antibiyotik sayısı / test edilen toplam antibiyotik sayısı

Çin'de yapılan bir çalışmada ise, ülke genelinde hayvanlardan ve yiyeceklerden izole edilen *Salmonella* suşlarında mcr-1 (plazmid aracılı kolistin direnci) geninin prevalansı araştırılmıştır. Çalışmada, mcr-1 pozitif *Salmonella* izolatlarının, 14 antibiyotiğe karşı duyarlılıkları belirlenmiştir. Bu izolatlar, genel olarak, kolistine ek olarak ampisilin, kloramfenikol, gentamisin ve tetrasikline karşı yüksek bir direnç sergilemişlerdir. mcr-1 taşıyan plazmidleri barındıran *Salmonella* suşlarının çoğu S. Typhimurium olarak tanımlanmıştır (Cui ve ark., 2017).

S. Typhimurium' un antibiyotik duyarlılığı üzerine Chen ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada; Kirby-Bauer disk difüzyon testi uygulanarak streptomisin, nalidiksik asit, eritromisin, tetrasiklin ve penisilin G' ye karşı duyarlılıkları test edilmiştir. S. Typhimurium'un eritromisin ve penisilin G'ye dirençli olduğu görülmüştür. S. Typhimurium'un tetrasiklin ve nalidiksik asite duyarlı olduğu belirlenmesine rağmen, nalidiksik asit zon çapı çevresinde bazı dirençli koloniler görüldüğünü, bu da bazı kolonilerin bu antibiyotiklerin üstesinden gelmelerini sağlayan mutasyonlar geliştirdiğini gösterir şeklinde yorumlanmıştır. Kirby-Bauer disk difüzyon testinin sonuçlarına göre, tetrasiklinin S. Typhimurium'a karşı etkili bir kemoterapötik ajan olabileceği görülmüştür. Bu bakterinin zon çaplarına bağlı olarak duyarlılık ve dirençlilik durumları Tablo 2.7'de verilmiştir.

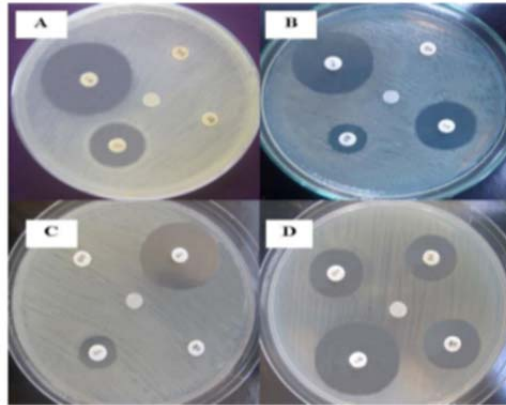
Tablo 2.7. S. Typhimurium'un çeşitli antibiyotiklere direnci.

Antibiyotik	Disk içeriği	İnhibisyon zonu	Duyarlılık
Streptomisin	10 µg	14 mm	Orta
Nalidiksik asit	30 µg	19 mm	Duyarlı
Eritromisin	15 µg	10 mm	Dirençli
Tetrasiklin	30 µg	19 mm	Duyarlı
Penisilin G	10 µg	12,5 mm	Dirençli

Kanatlı hayvanlarda ve diğer gıda değeri olan hayvanlarda antibiyotiklerin, hastalıkların tedavisinde ve/veya antimikrobiyal büyüme promotörü olarak kullanılması, et ürünlerinin kontaminasyonuna neden olabilecek antibiyotik dirençli kommensal bakterilerin ortaya çıkmasına bağlanmıştır (Bogaard ve ark., 2000). Filipinler'de yapılan bir çalışmada, pazarlarda perakende tavuk etinde *E. coli* ve *Salmonella* spp.'nin varlığını ve antibiyotik duyarlılıklarını belirlemek amaçlanmıştır. *Salmonella* spp. izolatlarının antibiyotik duyarlılık profili Tablo 2.8'de verilmiştir. CLSI (2006) protokolünü izleyen *Salmonella* spp. izolatları için antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarına göre izolatların % 100'ü (9/9) amoksisiline dirençli ve % 88.88'i (8/9) ampisiline dirençli olarak bulunmuştur. İzolatların çoğunluğu (% 96) ise streptomisine duyarlı olarak belirlenmiştir (Elumba ve ark., 2018). Ayrıca farklı antibiyotik diskleri etrafında oluşan inhibisyon zon çapları Şekil 2.3' de gösterilmiştir.

Tablo 2.8. *Salmonella* spp. izolatlarının antibiyotik duyarlılık profili (Elumba ve ark., 2018).

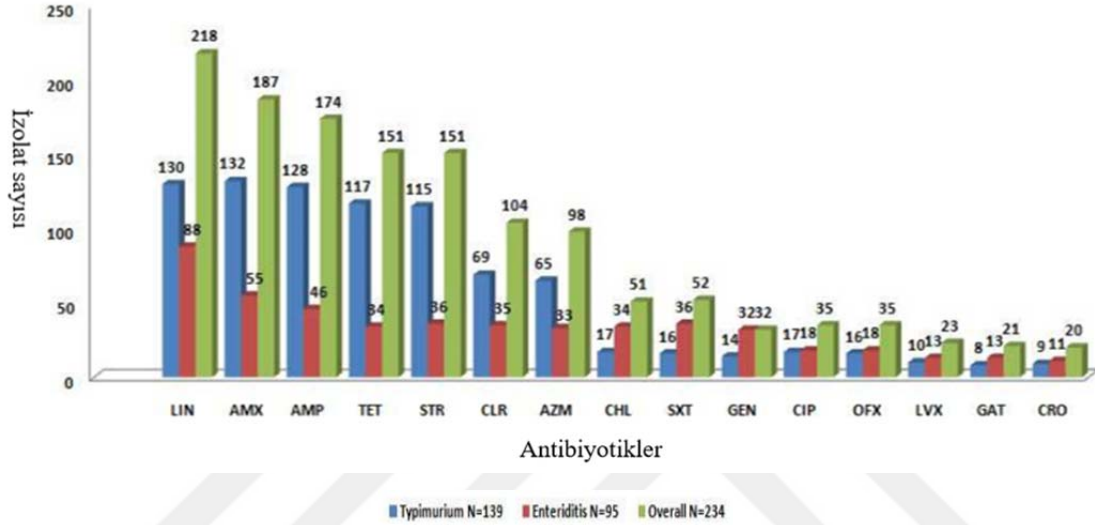
Antibiyotik	Duyarlı		Orta duyarlı		Dirençli	
	Zon çapı(mm)	İzolatların sayısı (%)	Zon çapı(mm)	İzolatların sayısı (%)	Zon çapı(mm)	İzolatların sayısı (%)
Amoksisilin	≥ 18	0 (0%)	14-17	0 (0%)	≤ 13	9 (100%)
Ampisilin	≥ 17	0 (0%)	14-16	1 (11.11%)	≤ 13	8 (88.88%)
Kloramfenikol	≥ 18	8 (88.88%)	13-17	0 (0%)	≤ 12	1 (11.11%)
Streptomisin	≥ 15	4 (44.44%)	12-14	3 (33.33%)	≤ 11	2 (22.22%)



Şekil 2.3. Disk difüzyon yöntemine göre *Salmonella* spp. izolatlarının farklı antibiyotiklerle inhibisyon bölgesinin gösterimi.

Salmonella'nın antibiyotik dirençliliği üzerine yapılan bir başka çalışmada ise, Khan ve ark.'larının kümes hayvanları ürünlerinde *Salmonella*'nın antibiyotik dirençliliği disk difüzyon yöntemine göre 15 antibiyotik (CRO (seftriakzon), AMX (amoksisilin) , 31 GEN (gentamisin), STR (streptomisin), TET (tetrasiklin), CHL (kloramfenikol), CLR (klaritromisin), LVX (levofloksasin), OFX (ofloksazin), GAT (gatifloksasin), CIP

(siprofloksazin), SXT (trimetoprim-sulfametoksazol), AMP (ampisilin), LIN (linkomisin) ve AZM (azitromisin)) için test edilmiştir. 234 izolattan 139 adet izolat *S. Typhimurium* olarak belirlenmiştir. Farklı serovarların antibiyotik dirençliliği Şekil 2.4’ de verilmiştir. *S. Typhimurium*, AMX'e (% 94.9, 132/139) ve ardından LIN (% 93.5, 130/139), AMP (% 92, 128/139), TET ve STR'ye (% 84.1, 117/139),(83.4, 116 / 139) karşı yüksek direnç göstermiş, ancak CRO (% 6.4, 9/139) ve GAT (% 5.7, 8/139)’a karşı duyarlı olarak bulunmuştur.



Şekil 2.4. *Salmonella* izolatlarında antibiyotik direnci (Khan ve ark., 2019).

Yapılan bir başka çalışmada, Mısır'da bulunan 41 tavuk çiftliğinden izole edilen *Salmonella enterica* serovarlarının prevalansı, türü ve antibiyotik duyarlılıkları araştırılmıştır. Tavuk çiftliğinde bulunan baskın serotipler arasında *Salmonella enterica* serovar Typhimurium da tanımlanmıştır. Bu çalışmada izole edilen tüm *Salmonella* serovarları gentamisine duyarlı, 52 (% 89.7) *S. enterica* serovar Typhimurium izolatu streptomisine duyarlı, 6 izolat ise (% 10.3) streptomisine orta düzeyde duyarlı olarak bulunmuştur. 55 (% 94,8) *S. enterica* serovarı Typhimurium izolatları trimetoprim / sülfometoksazole duyarlı, 3 (% 5,2) izolat ise dirençli olarak belirlenmiştir. Ayrıca izole edilen tüm *S. enterica* serovarları Typhimurium suşları ampisilin, kloramfenikol ve tetrasikline dirençli olarak bulunmuştur (El-Sharkawy ve ark., 2017).

Tablo 2.9. Çalışmada test edilen 58 *S.Typhimurium* izolatının antimikrobiyal duyarlılık profillerini (El-Sharkawy ve ark., 2017)

Antibiyotikler	Konsantrasyon (µg)	İnhibisyon zon çapı (mm)			S.Typhimurium		
		R	I	S	R	I	S
Ampisilin	10	≤13	14-16	≥17	58 (100 %)	–	–
Kloramfenikol	30	≤12	13-17	≥18	58 (100 %)	–	–
Gentamisin	10	≤12	13-15	≥16	–	–	58 (100 %)
Streptomisin	25	≤11	12-14	≥15	–	6(10.3%)	52 (89.7 %)
Tetrasiklin	30	≤14	15-18	≥19	58 (100 %)	–	–
Sulfametoksazol/Trimetoprim	25	≤10	11-15	≥16	3 (5.2 %)	–	55 (94.8%)

R: Resistant (Dirençli), I: Intermediate resistant (Orta düzeyde duyarlı), S: Susceptible (Duyarlı)

2.3. Bakterilerin Antibiyotik Direnç Mekanizması

Antibiyotik direncini anlayabilmek için, antibiyotiklerin nasıl çalıştığını bilmek önemlidir. Bir antibiyotğin bakterilere karşı etkili olması için üç koşul yerine getirilmelidir: i) hücrede duyarlı bir antibiyotik hedefi bulunmalı, ii) antibiyotik hedefe yeterli miktarda ulaşmalı ve iii) antibiyotik etkisizleştirilmemeli veya değiştirilmemelidir (Dzidic ve ark., 2008).

Antibiyotiklerin sınıflandırılmasındaki en yaygın sınıflandırma şemaları moleküler yapılarına, etki mekanizmalarına ve aktivite spektrumlarına dayanmaktadır (Calderon ve Sabundayo, 2007). Kimyasal veya moleküler yapılarına göre bazı yaygın antibiyotik sınıfları arasında beta-laktamlar, makrolidler, tetrasiklinler, kinolonlar, aminoglikozitler, sülfonamidler, glikopeptitler ve oksazolidinonlar bulunmaktadır (Etebu ve ark., 1997).

Çoğu antibiyotik sınıfının antimikrobiyal potansiyeli, bakteri yapısına ya da metabolik özelliğine yöneliktir. Antibiyotiklerin etki mekanizmaları; hücre duvarı sentezinin inhibisyonu, hücre zarı yapısının veya fonksiyonunun zarar görmesi, nükleik asitlerin yapı ve fonksiyonunun inhibisyonu, protein sentezinin inhibisyonu ve metabolik yolların inhibisyonu şeklindedir. Tablo 2.10.'da en çok kullanılan antimikrobiyal sınıfların hem etki mekanizmaları hem de bunlara karşı gösterilen direnç mekanizmaları gösterilmiştir.

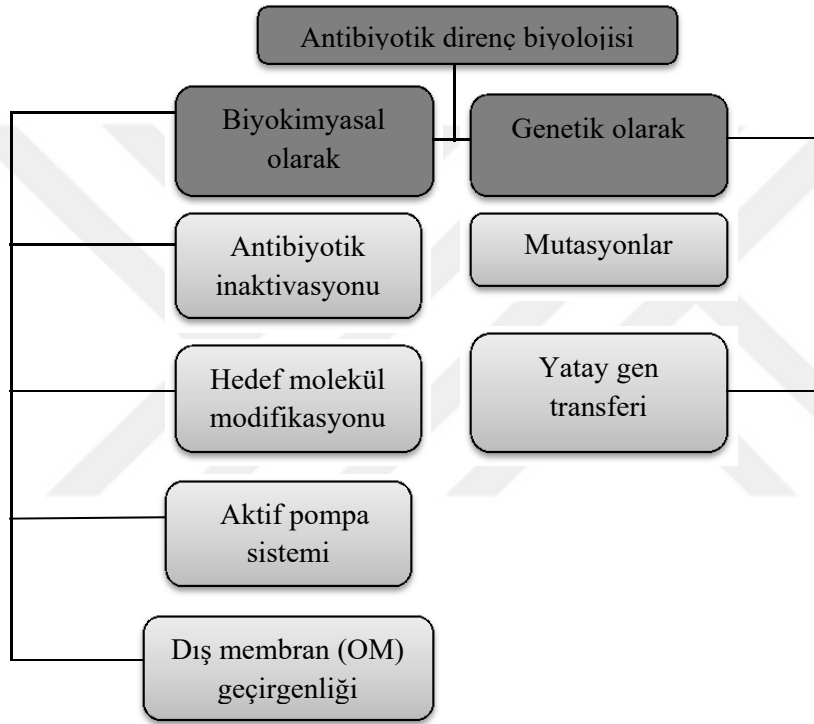
Tablo 2.10. Yaygın olarak kullanılan antimikrobiyal ajanların etki mekanizması ve direnci (Kaufman ve Gerri, 2013; Alcaine ve ark.,2016)

Antibiyotik sınıfı	Etki mekanizması	Direnç mekanizması
Beta-laktam	Hücre duvarı üretimini inhibe eder. Peptidoglikanlar oluşturmaya yardımcı olan enzimleri (PBP'ler) bağlar.	Beta-laktamaz üretimi PBP'lere bağlanmayı önlemek için hücre duvarı protein enzimlerini değiştirir.
Beta-laktamaz inhibitörleri	Beta-laktamaz enzimlerini inhibe eder / bağlar.	Geniş spektrumlu beta laktamazlar (ESBL) beta- laktamları inhibe ederler.
Aminoglikozitler	rRNA, 30S alt ünitesine bağlanır ve genetik kodun yanlış okunmasına neden olur. Protein üretimini inhibe eder.	Fosforilasyon, adenilasyon ve asetilasyonu ile (fosfo/asetil/adenil transferaz enzimleri ile) inaktif edilirler.
Florokinolon	Bakteri hücresinde başarılı bir DNA replikasyonu ve hücre bölünmesi için esas olan DNA giraz (topoizomeraz II) ve topoizomeraz IV enzimlerini inhibe eder.	Topoizomeraz II ve topoizomeraz IV'ü kodlayan genlerdeki nokta mutasyonları direnci oluşturur.
Sulfonamid	Dihidropteroat sentetaz enzimini inhibe eder.	PABA (p-amino benzoik asit) üretimi artırılarak sulfonamidlerin dihidroptereaz enzimine bağlanması azaltılır.

Antibiyotik dirençliliğinde genel olarak üç tip direnç tanımlanmıştır. Tanımlanan bu direnç tiplerinden mikrobiyolojik direnç (*in vitro* direnç), bakterilerin antibiyotiklere karşı duyarlılığının sınıflandırılmasında kullanılan sınır değeri üzerindeki antibiyotiklere karşı duyarlılık düzeyinin düşük olması anlamına gelmektedir. İkinci tanımlanan direnç tipi ise farmakolojik dirençtir. Bu direnç, farmakokinetik parametrelere ve bakteri türünün normal duyarlılığına dayanmaktadır. Söz konusu bakteriler için antibiyotiğin minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK), bu antimikrobiyalın ulaşabileceği konsantrasyon aralığındaysa, duyarlı olabilmektedir. İlgili bakteriler için antibiyotiğin MİK'i, enfeksiyon bölgesinde elde edilebilecek konsantrasyondan daha yüksekse, bakterinin dirençli olduğu kabul edilmektedir. Klinik direnç ise (*in vivo* direnç), ilgili bakteri ile bir enfeksiyonun artık uygun şekilde tedavi edilemeyeceği anlamına gelmektedir (Eldere ve ark., 2005).

Antibiyotiklere karşı dirençlilik, mikroorganizmaların doğal olarak antimikrobiyaller için hedef bölgelere sahip olmadığı ve antimikrobiyallerin onları etkilemediği içsel (intrinsik) direnç yada doğal olarak duyarlı bir mikroorganizmanın, antimikrobiyal tarafından etkilenmeyecek bir mekanizma kazandığı kazanılmış direnç olmak üzere iki ana başlık

altında değerlendirilmektedir (Kaufman ve Gerri, 2013). Antimikrobiyal ilaçların etki mekanizmalarından dolayı bakteriler antibiyotiklere karşı farklı direnç mekanizmaları göstermektedir. Kazanılmış direnç mekanizmaları (Şekil 2.5) biyokimyasal olarak; antibiyotiğin inaktivasyonu, hedef molekülün değişmesi, dışa atım pompaları (efluks pompa sistemi) ve hücre duvarı geçirgenliğinin değişimine bağlı oluşan direnç, genetik olarak ise mutasyonlar ve yatay gen transferlerine bağlı olarak oluşan direnç mekanizmalarıdır (Çiftci, 2015)



Şekil 2.5. Biyokimyasal ve genetik olarak kazanılmış direncin mekanizmaları (Dzidic ve ark., 2008).

2.3.1. Antibiyotik İnaktivasyonu

Antibiyotik inaktivasyonu, ilacın kendisini bozan veya modifiye eden enzimlerin üretimini içermektedir. İnaktivasyon; hidrolitik enzimler, grup transferi gibi mekanizma yolları ile gerçekleşmektedir. Pek çok antibiyotik hidrolitik olarak duyarlı kimyasal bağlara sahiptir (örneğin esterler ve amitler). Birkaç enzimin, bu bağları hedef alarak ve parçalayarak antibiyotik aktivitesini tahrip ettiği bilinmektedir. Bu enzimler bakteri içindeki hedeflerine ulaşmadan önce antibiyotikleri etkisiz hale getirmektedir (Dzidic ve ark., 2008). *Salmonella*'da aminoglikozit değiştirici enzimler temel olarak aminoglikozit antibiyotiklere direnç göstermektedir. Aminoglikozit asetil transferazlar, aminoglikosit

antibiyotiklerinde amino gruplarını değiştirir. Ek olarak, aminoglikosit hidroksil grubu fosforilasyon enzimleri, yani aminoglikozit fosfotransferazlar, *Salmonella*'da aminoglikozit antibiyotiklerine karşı direnç geliştirmede rol oynarlar (Divek ve ark., 2018).

2.3.2. Hedef Molekülün Değişmesi

İkinci ana direnç mekanizması, antibiyotiğin doğru şekilde bağlanamaması için antibiyotik hedef bölgesinin değiştirilmesidir. Örneğin; tifoidal olmayan *Salmonella*'nın florokinolonlara direnci, yetişkinlerde invazif salmonelloz tedavisi için tercih edilen bir ilaç olması nedeniyle endişe vericidir. Florokinolon direnci bakteri hücrelerinde florokinolonlar için hedef olan giraz (gyrA ve gyrB) ve topoizomeraz IV'ü kodlayan genlerin kinolon direnç belirleyici bölgelerinde çoklu mutasyonlarla bağlantılıdır. Bu genlerin mutasyonu, florokinolonlara dirençle sonuçlanmaktadır (Divek ve ark., 2018).

2.3.3. Aktif Pompa Sistemleri

Akış pompaları, antibiyotikleri hücreden dışarı aktaran ve hücre içi konsantrasyonlarını düşük seviyelerde tutan membran proteinleridir. Bazıları ilaca özgü olmasına rağmen; birçok akış sistemi, yapısal olarak farklı ilaçları da dışarı çıkarabilen ve böylece bakteriyel çoklu ilaç direncine önemli ölçüde katkıda bulunan çoklu ilaç taşıyıcılardır. Bir aktif akış pompasının varlığı, *Salmonella* Typhimurium'da bir antibiyotik direnç mekanizması olarak rapor edilmiştir. AcrAB (iç membran taşıyıcı) -TolC (dış membran taşıyıcı) tip akış pompası aşırı üretkenliği ve dış zar proteinlerinde ve lipopolisakaritlerde buna bağlı değişiklikler sinerjistik olarak *S. Typhimurium*'da daha az siprofloksasin birikimine neden olmuştur ve *Salmonella*'da direnç artışı göstermiştir (Giraud ve ark., 2000).

2.3.4. Hücre Duvarı Geçirgenliği Değişimi

Dış membran geçirgenliği, azalmış antibiyotik alımı ile sonuçlanmaktadır. Gram-negatif bakteriler, fosfolipitler içeren bir iç tabaka ve lipopolisakkarit (LPS) parçasını içeren bir dış tabakadan oluşan bir dış zara sahiptir. Dış zarın bu bileşimi ilaç penetrasyonunu yavaşlatır ve OM boyunca taşınma porin proteinleri ile sağlanır.

Kinolona dirençli *Salmonella*'da dış zar proteini ekspresyonu veya lipopolisakkarit değişiklikleri hakkında birkaç çalışma bildirilmiştir. Ancak, bu çalışmalarda, bu gibi

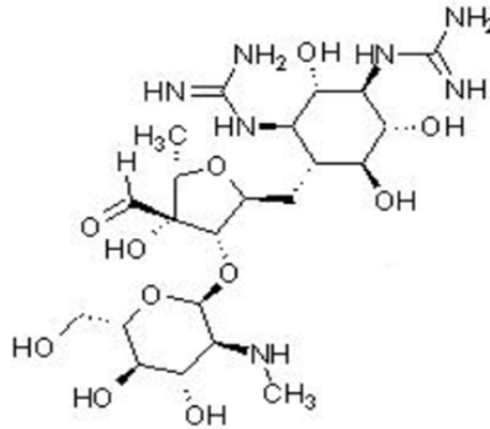
değişikliklerin, dış zar geçirgenliğinin azalmasına ve kinolon direncine önemli ölçüde katkıda bulunup bulunmadığı dair açık bir ifade bulunmamaktadır (Cloeckaert ve ark., 2001).

2.4. *Salmonella*'nın Direnç Gösterdiği Antibiyotik Grupları ve Direnç Mekanizmaları

Salmonella'nın direnç geliştirdiği en yaygın antibiyotikler; aminoglikozitler, β -laktamlar, kloramfenikol, kinolonlar, tetrasiklinler, sülfonamidlerdir (Abatcha ve ark., 2014).

2.4.1. Aminoglikozitler

Aminoglikozitler gram negatif bakterilere karşı aktif ve etkilidir. Ayrıca geniş spektrumlu aktivite için diğer antibiyotik ilaçlarla kombinasyon halinde de kullanılabilir (Gonzalez ve Spencer, 1998). Örneğin bu antibiyotik grubunda yer alan streptomisin (Şekil 2.6) ($C_{21}H_{41}N_7O_{16}S$), bakteri 30S ribozomal alt ünitesine bağlanarak t-RNA'nın yanlış okunmasına neden olarak bakterinin büyümesi için gerekli proteinleri sentezleyememesine neden olacak şekilde çalışan bir aminoglikoz antibiyotiktir.



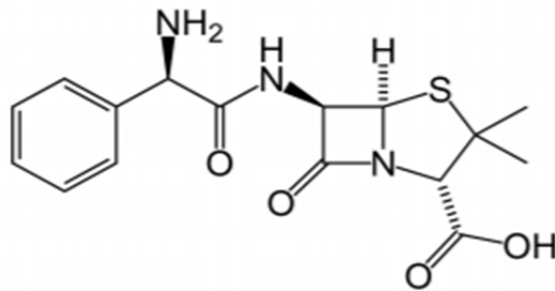
Şekil 2.6. Streptomisin kimyasal yapısı

Bakterilerin aminoglikozitlere dirençli hale geldiği üç mekanizma vardır. Bunlar; antibiyotik alımında azalma veya geçirgenlikte azalma, ribozomal bağlanma yerlerinde değişiklik ve antibiyotik modifikasyonları şeklindedir. *Salmonella*, aminoglikozite karşı plazmid aracılı aminoglikozit değiştirici enzimlerin ekspresyonu gibi mekanizmaları kullanmaktadır (Gebreyes ve Altier, 2002; Guerra, 2002). Bu enzimler üç gruba ayrılır ve yaptıkları reaksiyonlara dayanarak adlandırılmaktadır; asetil transferazlar, fosfotransferazlar ve nükleotidiltransferazlardır. Asetil transferazlar, bir amino grubunun asetil CoA'ya bağımlı asetilasyonunu katalize etmektedir (Shaw ve ark., 1993). Fosfotransferazlar, bir hidroksil

grubunun ATP'ye bağı fosforilasyonunu katalize etmektedir (Mascaretti, 2003; Shaw ve ark., 1993). Bu da, belirli fosforilasyon bölgelerine bağı olarak gruplar halinde sınıflandırılmaktadır. APH (3'') ve APH (6) grupları, streptomisine direnç sağlamaktadır (Mascaretti, 2003) ve *Salmonella* tarafından barındırılan plazmidler üzerinde kodlanmış olarak bulunmuştur (Gebreyes ve Altier, 2002). Nükleotidiltransferazlar aminoglikozit direnci sağlayan son enzim grubudur (Mascaretti, 2003, Shaw ve ark., 1993). Bu enzimler modifikasyon yerine bağı olarak birkaç gruba ayrılmaktadır ve ayrıca hidroksil gruplarını hedeflemektedirler.

2.4.2. Beta-laktamlar

Üç ana beta laktam grubu vardır: penisilinler, sefalosporinler ve karbapenemler. Bu ilaçların antimikrobiyal etkilerine, penisilin bağlayıcı proteinler olarak bilinen bir grup protein aracılık etmektedir. Bu proteinler, bakteri hücre duvarının temel bir bileşeni olan peptidoglikanın sentezinde rol oynamaktadır (Alcaine ve ark., 2016). Örneğin; bir penisilin beta-laktam antibiyotiğı olan ampisilin (Şekil 2.7), gram pozitif ve gram negatif aerobik ve anaerobik bakterilere karşı in vitro aktiviteye sahiptir. Ampisilin bakterisit aktivitesi, hücre duvarı sentezinin inhibisyonundan kaynaklanır ve penisilin bağlanma proteinlerine (PBP'ler) ampisilin bağlanması aracılık eder. Ampisilin, penisilinazlar ve sefalosporinazlar ve genişletilmiş spektrumlu beta-laktamazlar dahil olmak üzere çeşitli beta-laktamazlar tarafından hidrolize karşı kararlıdır.



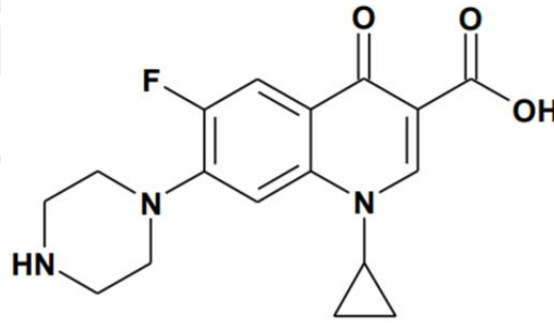
Şekil 2.7. Ampisilin kimyasal yapısı

Penisilinlerin yaygın klinik kullanımı nedeniyle, ampisilin ve metisilin gibi ilaçlara karşı dirençlilik yaygın hale gelmiştir (Angulo ve ark., 2000). Artan antibiyotik kullanımı ve yeni bileşiklerin eklenmesi, β -laktamaz oluşumunun artmasına ve yeni formların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bu yeni β -laktam antibiyotiklerin kullanılması, geniş spektrumlu β -laktamaz

(Extended spectrum beta lactamases) (ESBL) üreten dirençli suşların ortaya çıkmasına neden olmuştur. ESBL'ler penisilinleri, sefalosporinleri (sefalisinler hariç) ve monobaktamları hidrolize edebilir ve β -laktam inhibitörleri tarafından inhibe edilebilirler (Bradford, 2001).

2.4.3. Kinolonlar

Bakteriyel enfeksiyona karşı daha etkili olan birçok kinolon nesli vardır. Etki biçimleri, erken ve geç nesil kinolonların DNA giraz ve DNA topoizomeraz IV'ü hedef almasında değişiklik göstermektedir (Mascaretti, 2003). Örneğin; ikinci nesil bir florokinolon olan siprofloksasin (Şekil 2.8) (1-siklopropil-6-floro-1,4-dihidro-4-okso-7-(piperazinil)-3-kinolin karboksilik asit), birçok Gram negatif ve Gram pozitif bakteriye karşı DNA giraz ve topoizomeraz IV'ün inhibisyonu yoluyla etkisini göstermektedir. Florokinolonlar ve diğer antibiyotik sınıfları arasında çapraz direnç yoktur, bu nedenle diğer antibiyotiklerin etkili olmadığı durumda klinik değeri olabilir.



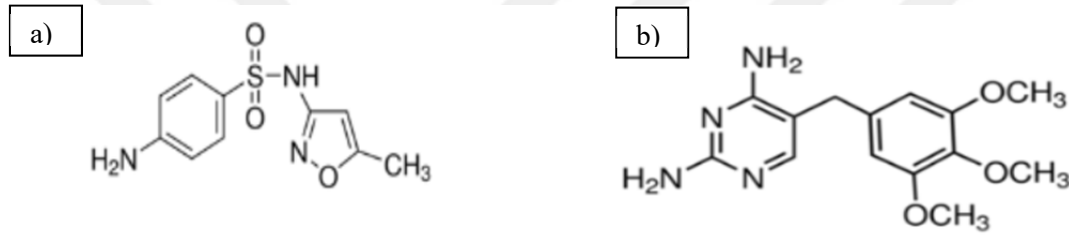
Şekil 2.8. Siprofloksazin kimyasal yapısı

Kinolona karşı *Salmonella* direnci iki mekanizma olarak sınıflandırılmıştır. Birincisi, kinolon direnç belirleyici bölgedeki (QRDR) DNA giraz alt birimlerini kodlayan genler olan *gyrA* ve *gyrB* ve topoizomeraz IV'ün *parC* alt birimindeki mutasyonlardır (Baucheron ve diğerleri, 2004; Casin ve diğerleri, 2003; Levy ve diğerleri, 2004). İkinci etki şekli, bu sistemin regülatör genlerindeki mutasyonların bir sonucu olarak AcrAB-TolC akış sisteminde değişiklikleri içermektedir (Koutsolioutsou ve ark., 2001; Levy ve ark., 2004; Olliver ve ark., 2005). Bu mutasyonlar kinolon duyarlılığını azaltmıştır. Gen, DNA-giraz'a bağlandığı ve kinolon inhibisyonundan koruduğu ortaya çıkan bir proteini ifade etmektedir (Li ve ark. 2005). Plazmid aracılı kinolon direnç geni (*qnr*) barındıran plazmidler üzerinde yapılan

çalışmada, diğer bakteri türlerinden konjugasyon yoluyla *Salmonella*'ya transfer edilebileceğini göstermiştir (Martinez ve ark., 2005).

2.4.4. Sülfonamid

Bu antibiyotik sınıfı bakteriyostatiktir ve etki şekli tetrahidrofolik asidin sentezinde yer alan enzimleri inhibe etmektedir. Sülfonamidler, dihidropropat sentetazını (DHPS) inhibe ederken, trimetoprim, dihidrofolat redüktazı (DHFR) inhibe etmektedir (Mascaretti, 2003). Örneğin sülfametoksazol (Şekil 2.9,a) ($C_{10}H_{11}N_3O_3S$), dihidrofolik asit sentezini inhibe ederken, trimetoprim (Şekil 2.9,b) ($C_{14}H_{18}N_4O_3$), timidin ve DNA sentezini inhibe etmektedir. Bu iki antibiyotik ajan, folik asit sentezinin inhibe edilmesinde sinerjistik olarak etki etmektedirler.



Şekil 2.9. a) Sülfametoksazol ve b) trimetoprimin kimyasal yapısı

Salmonella'nın sülfonamide direnci, duyarsız bir DHPS formunu ifade eden 'sul' geninin varlığına bağlanmıştır (Antunes vd., 2005; Mascaretti, 2003). Sülfonamid direncine benzer şekilde trimetoprim direnci, trimetoprim'e bağlanmayan DHFR'ın ekspresyonuna dayanmaktadır (Alcaine ve ark., 2016). Tablo 2.11.'da Alcaine ve ark.'larının yaptığı çalışmada bazı antibiyotik sınıflarına karşı gösterilen etki mekanizmaları ve dirençli *Salmonella* serotipleri verilmiştir.

Tablo 2.11. *Salmonella*'nın farklı antimikrobiyal ilaçlara direnç özellikleri

Antibiyotik sınıfı	Etki mekanizması	<i>Salmonella</i> serotipleri
Beta-laktam	Hücre duvarı oluşumunu inhibe eder.	Anatum, Agona, Blockley, Dublin, Enteritidis, Haardt, Muenchen, Newport, Stanley, Typhimurium , Virchow
Aminoglikozitler	Protein sentezini inhibe eder.	Agona, Anatum, Blockley, Bredeney, Derby, Give, Hadar, Heidelberg, Kentucky, London, Infantis, Saintpaul, Newport, Typhimurium
Kinolon	Topoizomerazı inhibe eder.	Enteritidis, Typhimurium
Sulfonamid	Dihidropteroat sentetazı inhibe eder.	Agona, Albany, Anatum, Brandenburg, Derby, Djugu, Enteritidis, Hadar, Heidelberg, Orion, Rissen, Typhimurium

^a Direnç, bu genlerdeki nokta mutasyonları tarafından yönlendirilir.

2.5. Kolesterolün Antibiyotik Dirençlilik Üzerine Etkisi

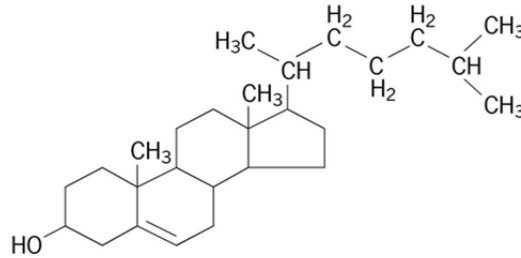
Günümüzde bakteriyel enfeksiyonlar, temel olarak bakteriyel direncin belirgin şekilde artmasından dolayı halk sağlığının odağını oluşturmaktadır ve tedavi için yeni ilaçlar ve etkili teknikler geliştirilmesini giderek daha gerekli hale getirmektedir. Bakterilerin bu ilaç dirençliliğindeki mekanizmalarını etkileyecek antibiyotik aktivite değiştiricileri, bakterilerin gösterdikleri direncin etkisini azaltan veya tersine çeviren maddelerdir. Antibiyotikler ile beraber kombinasyonda kullanılan bu maddeler antibiyotik aktiviteyi artırır; bu maddelerin antibiyotikler ile beraber sinerjik bir etkiye sahip olduğu düşünülmektedir. Eğer, antibiyotikğin etkisinde veya etkisizleştirilmesinde bir düşüş olursa, eklenen maddenin antagonistik bir etkiye sahip olduğu düşünülmektedir (Canton ve ark., 2010).

Gıdalar önemli miktarlarda yağ içermektedir. Yağlar; hücre bileşenlerinin özellikle hücre zarlarının temel yapılarıdır, fosfolipidlerden oluşurlar ve çoğunlukla trigliseritlerin oluşturduğu enerji depolarıdır. Yağ asitleri yağlardan enzim aktivitesi sonucunda ortaya çıkarlar ve serbest yağ asitleri bakterileri öldürebilmekte ya da büyümelerini

engelleyebilmektedir (Desbois ve ark., 2010). Yağda çözünen bileşikler bakterilerde plazma zarının geçirgenliğini modifiye edici ajanlardır.

Kolesterol, vücudun normal çalışması için gerekli olan bir lipit bileşenidir. Plazma membranında ve organellerin zarlarında önemli bir yapısal fonksiyon sergiler ve bağırsak tarafından yağ ve yağda çözünebilir vitaminlerin alımı için gerekli olan safra asitlerinin sentezine ve steroid hormonlarının ve E vitamininin üretimine katılır (Ludke ve ark., 1999, Leanca ve ark., 2010).

Kolesterol, hacimli steroid yapısını oluşturan dört hidrokarbon halkasından oluşan bir lipittir. Steroidin bir ucuna bağlı bir hidrokarbon kuyruğu ve diğer ucuna bağlı bir hidroksil grubu vardır. Kolesterol ökaryotların biyolojik zarlarının önemli bileşenleridir ve membranların geçirgenliğini korumaktan sorumludurlar. Hücre, kolesterol seviyelerinin düzenlenmesi veya fosfolipidlerin hidrokarbon zincirlerinin doyma derecesinin düzenlenmesi yoluyla akışkanlığını kontrol edebilir (Frezard ve ark., 2005).

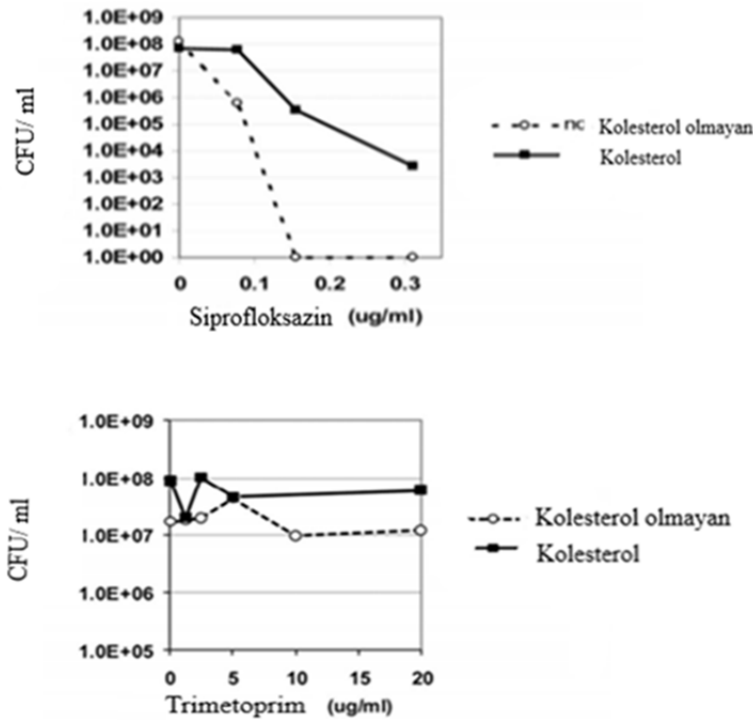


Şekil 2.10. Kolesterol yapısı

Kolesterol bakteri hücre zarının mozaik sıvı yapısını etkileyebilmekte, akışkanlığını değiştirebilmekte ve dolayısı ile antibiyotiklerin etkin edebilmesi için daha duyarlı hale getirebilmektedir (Andrade ve ark., 2014). Kolesterol ve antibiyotik dirençliliğin ilişkilendirildiği bir çalışmada, *Staphylococcus aureus*'un çoklu ilaca dirençli suşlarında ergosterol ve kolesterolün aktif pompa sistemlerine karşı etkisi araştırılmıştır. Bunun için de Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) belirlenmiş ve MİK değerinin düşürülmesi ile dışarı akış pompalarının olası inhibisyonunun değerlendirilmesi yapılmıştır. Kolesterol ve ergosterolün akış pompaları üzerine etkisi gözlemlenmemiştir. Hücre zarı ile lipit çift katmanındaki etkileşim nedeniyle bir sinerjizm gözlemlenmiştir (Tintino ve ark., 2017). Alfa

tokoferolün çoklu ilaç dirençli olan bakterilerden *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli*'ye karşı etkisinin araştırıldığı bir çalışmada kolesterol ve ergosterol'ün antibakteriyel etkileri olmadığı fakat antibiyotiklerle birleştirildiğinde MİK değerini azalttığı sonucuna varılmıştır. *S.aureus*'un çoklu ilaç dirençli suşlarına karşı aminoglikozitler ile birlikte kolesterol ve ergosterolün modifiye edici antibiyotik aktivitesi gözlemlenmiştir (Andrade ve ark., 2014).

Helicobacter pylori üzerine yapılan bir çalışmada ise bu bakteri hücrelerinin 12 antimikrobiyal ajana (ampisilin, amoksisilin, kolistin, siprofloksazin, metronidazol, nalidiksik asit, bizmut, kloramfenikol, klaritromisin, rifampin, tetrasiklin ve trimetoprim) kolesterol bulunan ortamda, kolesterol olmayan ortamda büyüyen hücrelere oranla daha dirençli oldukları gösterilmiştir.



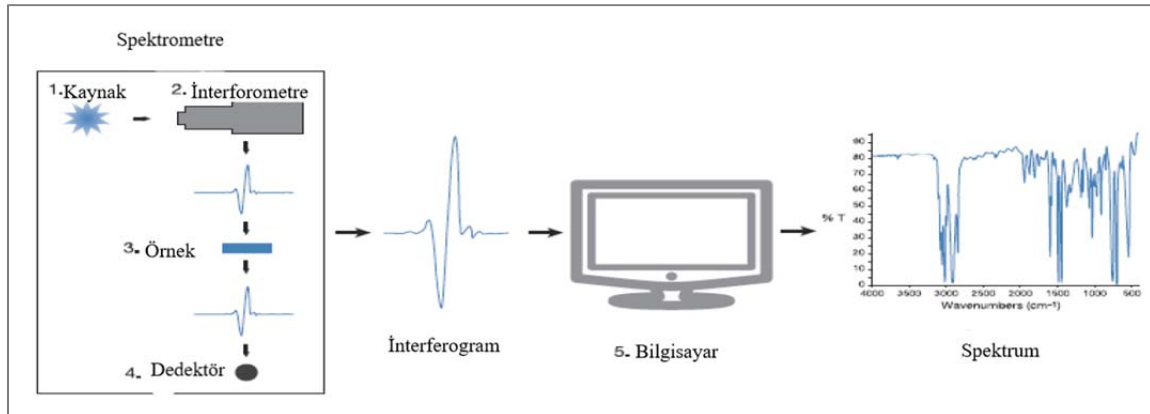
Şekil 2.11. Antibiyotiklerin (siprofloksazin, trimetoprim) kolesterol varlığında veya yokluğunda kültürlenmiş *H. pylori*'nin canlılığı üzerindeki etkisi

Şekil 2.11'de görüldüğü gibi kolesterol ile kültürlenmiş *H. pylori*, kolesterol olmayan ortama göre trimetoprim ve siprofloksazine daha dirençli olarak bulunmuştur. Daha önce, *H. pylori*'nin, ortamdan BSA (sığır serum albumini) veya serum çıkarıldığı takdirde,

trimetoprime duyarlı olduğu bildirilmiştir. Yapılan bu çalışmada kolesterol dışındaki bir serum bileşeninin, değiştirilmiş trimetoprim duyarlılığından sorumlu olabileceği araştırmacılar tarafından yorumlanmıştır (McGee ve ark., 2011).

2.6. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi Çalışmaları

Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi, kızılötesi spektroskopinin güvenilir bir yöntemidir ve akademik, analitik, kalite güvence / kalite kontrol çalışmalarında ve adli laboratuvarlarda çeşitli analitik olanaklar sağlamaktadır. FT-IR teknolojisi, özellikle polimerler ve organik bileşikler için çok çeşitli kimyasal uygulamalar yapılmıştır. Ayrıca FT-IR bilinmeyen bir materyali, bir numunenin kalitesini, bir karışımdaki bileşenlerin miktarını tanımlamak için kullanılmaktadır. FT-IR spektroskopisinin enstrümantal bileşenleri; bir kaynaktan, bir interferometreden, bir örnek bölmesinden, bir dedektörden ve bir bilgisayardan oluşmaktadır. Kaynak, kızılötesi enerjiyi yayar. Bu ışın, numuneye verilen enerji miktarını kontrol eden bir açıklıktan dedektöre geçer. Daha sonra ışın, hassas ölçümler yapmak için iki ışının etkileşiminin kullanıldığı interferometreye girer. Sonuçta ortaya çıkan interferogram sinyali, interferometreden çıkar ve numune bölmesine girer. Burası numunenin spesifik enerji frekanslarının emildiği yerdir. Işın, son ölçüm için dedektöre geçer ve ölçülen sinyal dijitalleştirilir ve Fourier dönüşümünün gerçekleştiği bilgisayara gönderilir ve değerlendirmesi yapılır (Gossman, 2019).

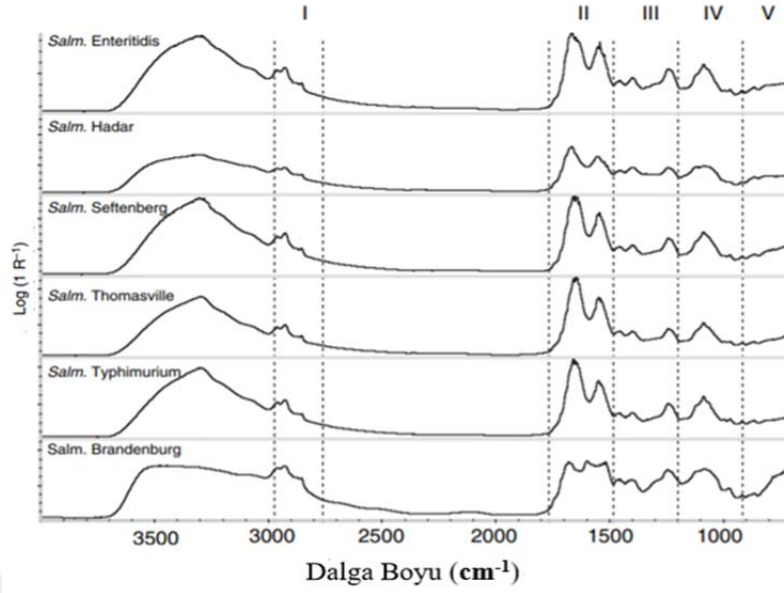


Şekil 2.12. FT-IR spektroskopisi çalışma prensibi (Gossman, 2019)

Elde edilen spektrum, moleküler absorpsiyon ve iletimi gösterir ve numunenin moleküler parmak izini oluşturur. Genel olarak 4000-1500 cm⁻¹ dalga boyu aralığındaki bantlar fonksiyonel grupları (örneğin, -OH, C = O, N-H, CH₂, vb.) tanımlamaktadır. 1500-400 cm⁻¹

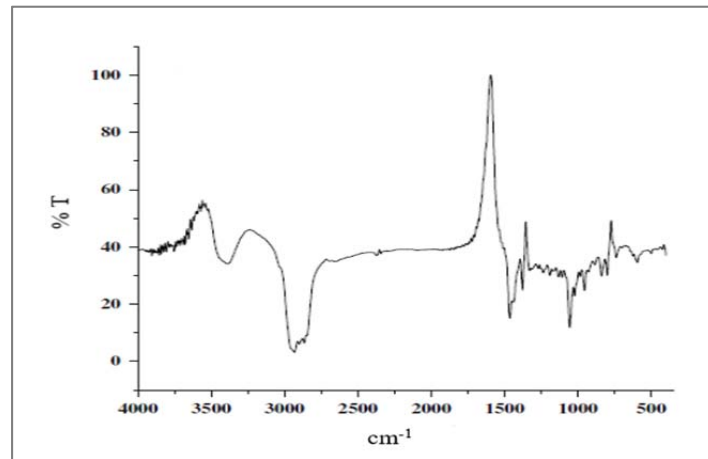
dalga boyu olan bölge ise parmak izi bölgesi olarak tanımlanmaktadır (Gossman,2019; Larry ve ark., 2014). FT-IR ayrıca gıda kaynaklı patojenlerin hızlı ve spesifik tespiti, mikrobiyoloji ve gıda güvenliği için oldukça önemlidir. Bakterilerin tespiti, tanımlanması ve sınıflandırılması genellikle biyokimyasal veya serolojik testlere dayanan geleneksel yöntemler ve DNA veya RNA parmak izlerine dayanan moleküler yöntemler kullanılarak gerçekleştirilir. FT-IR spektroskopisi sadece bakteriyel bir tanımlama yöntemi olarak değil, aynı zamanda bakteriyel metabolizma, büyüme fazı ve antibiyotik direnci hakkında da bilgi sağlamaktadır. Her bakteri türü, proteinlerinde, nükleik asitlerinde, lipitlerinde, şekerlerinde ve lipopolisakkaritlerinde bulunan moleküler bağların veya fonksiyonel titreşimlerinden dolayı benzersiz bir IR parmak izi veren karmaşık bir hücre duvarı / membran bileşimine sahiptirler. Bu nedenle, her bakteri kendine özgü ve karakteristik bir spektrum içerir ve böylece bir FT-IR spektrumundan tek bir mikroorganizma tanımlanabilmektedir (Davis ve Reeta., 2015).

Kim ve ark.'nın (2005) yaptığı çalışmada; *Salmonella* serotiplerinden elde edilen lipopolisakkarit özütlerinin ve canlı hücreleri ayırt etmek için FT-IR ve kemometrik yöntemlerin değerlendirilmesi yapılmıştır. Bu çalışma, FT-IR yönteminin *Salmonella* serotiplerini daha iyi tanımlamasının yanı sıra kimyasal yapılar hakkında daha detaylı veriler elde edilmesini sağladığı sonucuna varılmıştır. *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Thomasville*, *S. Brandenburg*, *S. Hadar* ve *S. Seftenberg*'in canlı hücrelerinin FT-IR spektrumları Şekil 2.13'de gösterilmiştir.



Şekil 2.13. Altı *Salmonella enterica* serotipinin canlı hücrelerinin FT-IR spektrumları (4000–700 cm^{-1}). Spektral bölgeler Naumann ve ark. (1991a, b) tarafından tanımlanmıştır : I, yağ asidi bölgesi (3000–2800 cm^{-1}); II, amid bölgesi (1800–1500 cm^{-1}); III, karışık bölge (1500–1200 cm^{-1}); IV, polisakarit bölgesi (1200–900 cm^{-1}); V, parmak izi bölgesi (900–700 cm^{-1}).

Gupta ve ark.'ın yaptığı çalışmada, FT-IR kullanılarak kolesterol molekülünün elektronik ve titreşimsel özelliklerini incelenmiştir. Kolesterol molekülünün titreşim analizi ile, bileşiğin spesifik moleküler yapıları ile bağlantılı titreşim modlarının bulunması amaçlanmıştır. Kolesterol molekülü için belirlenen ana bantlar 3400, 2932, 2899, 2866, 1464, 1438, 1378, 1055, 1022, 985, 840 ve 800 cm^{-1} 'de bulunmuştur (Şekil 2.14).



Şekil 2.14. Kolesterolün FT-IR spektrumu

Tablo 2.12. Deneyssel olarak elde edilen titreşim frekans verilerinin literatür değerleri ile karşılaştırılması.

FTIR'da gözlenen bantlar (cm ⁻¹)	Literatür değer (cm ⁻¹)(a,b,c,d)	
674	680	= C-H düzlem dışı bükülme
700		C-H düzlem dışı bükülme
739		C-H düzlem dışı bükülme
800		C-H düzlem dışı bükülme
840	849	C-C-C gerilme
885		C-H düzlem dışı bükülme
927	920	=C-H bükülme
956	961	CH=CH ₂ ve CH ₂ sallanma
985		=C-H bükülme
1022	1035	C-H düzlem içi bükülme
1055	1056	Halka deformasyonu
1108		C-H düzlem içi bükülme
1131		C-H düzlem içi bükülme
1170		C-H düzlem içi bükülme
1191	1191	C-C gerilme
1236	1255	CH ₂ deformasyonu
1272	1275	CH ₂ bükülme
1317	1305	CH ₂ sallanma
1331	1333	CH ₂ bükülme
1378	1378	CH ₂ ve CH ₃ bükülme
1438	1440	CH ₂ ve CH ₃ deformasyon titreşimi
1464	1466	CH ₂ ve CH ₃ simetrik gerilme
1512	1506	C-C aromatik halkada gerilme
1674	1674	C=C gerilme
2866	2860	CH ₂ ve CH ₃ simetrik gerilme
2899	2901	CH ₂ simetrik gerilme
2932	2925	CH ₂ ve CH ₃ asimetrik gerilme
3400	3398	O-H gerilme

^a Ganapathi ve ark. 2008; ^b Zhou ve ark. 1997; ^c Hanlon ve ark. 2000; ^d Zheng ve ark. 1986.

Spektrumda görülen 1378 cm⁻¹'deki pikler, molekülün CH₂ ve CH₃ bükülme titreşimine, 1440 cm⁻¹'deki titreşim pikleri, CH₂ ve CH₃ deformasyon titreşimlerinden, 1674 cm⁻¹'deki pik, C=C gerilme titreşimi ve 2901 cm⁻¹'deki pik ise, CH₂ simetrik gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır. Tablo 2.12'de verilen tabloda, yukarıda tanımlanan titreşim bantlarının literatür ve deneyssel olarak gözlemlenen değerleri arasında bir uyum olduğu görülmektedir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. Standart *Salmonella* Kültürünün Hazırlanması

Çalışmamızda antibiyotik direncine sahip mikroorganizma olarak *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 suşu kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak kullanılan suşlar *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 bakterileridir. *Salmonella* suşu kültür koleksiyonlarından liyofilize halde temin edilmiştir. Liyofilize *Salmonella* suşu % 0,1 tamponlanmış peptonlu su içerisinde hazırlanıp, bakteri hücreleri triptik soy sıvı besiyerinde 37 °C’de 18-24 saat aerobik olarak inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. Aktifleşen kültürlerden % 40’lık gliserol çözeltisi içerisine aktararak stok çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltiler -80 °C’ de saklanmıştır.

3.2. Kolesterol Çözeltisinin Hazırlanması

Kolesterol (3 β -cholest-5-en-3-ol, %99 saflıkta) Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, ABD) firmasından temin edilmiştir. Kolesterol çözeltisi 30 ml etil alkol/ 10 ml Tween 80 içerisinde son konsantrasyon 7 mg/ml olacak şekilde eklenmesi ile hazırlanmıştır.

3.3. Antibiyotiklerin Hazırlanması

3.3.1. Antibiyotiklerin Temin Edilmesi

Bu çalışmada kullanılacak suşların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi için “Oxoid marka” hazır diskler halinde satın alınan ampisilin (30 µg), kloramfenikol (30µg), trimetoprim- sulfametoksazol (25 µg), tetrasiklin (30 µg) ve streptomisin (10 µg), eritromisin (15 µg), siprofloksazin (5 µg), tetrasiklin (30 µg), penisilin (10U), gentamisin (10 µg) ve vankomisin (30 µg) kullanılmıştır.

Minimum inhibisyon konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesi için kullanılan toz halindeki antibiyotiklerden; ampisilin, trimetoprim- sulfametoksazol, streptomisin ve siprofloksazin ise Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, ABD) firmasından satın alınmıştır.

3.3.2. Toz Antibiyotiklerin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Antibiyotik stok çözeltisi en az 1000 µg/ml olacak şekilde veya test edilecek konsantrasyondan en az 10 kat fazla olacak şekilde hazırlanmış ve steril su içerisinde seyreltilmiştir. Hazırlanan stok çözeltiler küçük hacimlere bölünerek saklanmıştır.

3.3.3. Toz Antibiyotiklerin Dilüsyon Aralığının Hazırlanması

Üreticiden toz halde temin edilen antibiyotiklerin hazırlanmasında kullanılan çözenler, kullanılan seyrelticiler ve MİK değerinin belirlenmesi için kullanılacak olan dilüsyon aralığı aşağıdaki tabloda (Tablo 3.1) verildiği gibi uygulanmıştır (Andrews, 2001). Belirtilen aralıkta antibiyotik konsantrasyonları iki katlı dilüsyon serileri olacak şekilde (10 farklı konsantrasyon değerinde) hazırlanarak denemeler yapılmıştır. Her konsantrasyondan 2 paralel olacak şekilde deneyler yürütülmüştür. Hazırlanan konsantrasyonlardaki antibiyotikler steril boş disklerle emdirilerek disk difüzyon yöntemi uygulanmıştır.

Tablo 3.1. Antibiyotiklerin Hazırlanması ve MİK Değerlerinin Belirlenmesi için Tavsiye Edilen Aralık Değerleri

Antibiyotik	Çözgen	Seyreltici	Aralık	Disk içeriği (µg)
Ampisilin	Doymuş NaHCO ₃ çözeltisi	Su	0,25-128 mg/L	30
Trimetoprim - Sulfametoksazol	% 10 Etanol , Su ve 0,1 % NaOH	Su	0,25-128 mg/L	25
Siprofloksazin	Su	Su	0,25-128 mg/L	30
Streptomisin	Su	Su	0,25-128 mg/L	10

3.4. Saf *Salmonella* Kültürlerinin Antibiyotik Duyarlılıklarının Disk Difüzyon Yöntemi ile Belirlenmesi

Bu yöntemde, incelenecek olan *Salmonella* suşu triptik soy agar besiyeri içerisinde 24 saat süreyle 37°C'de inkübe edilmiştir. Aktifleşen saf kültürden belirli miktarlarda alınarak %0,9 NaCl çözeltisi içine aktarılmış ve McFarland 0.5 (10⁸ kob/mL)'e göre ayarlanarak standart bir bulanıklık oluşturulmuştur. 100 µl alınarak muller hinton agar (MHA) besiyerine yayılmıştır. İnoküle edilen agar yüzeyine steril hazır antibiyotik diskler yerleştirilmiştir. Petriler 24-48 saat süreyle 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda diskler etrafındaki inhibisyon zonları kumpasla ölçülerek değerlendirme yapılmıştır. Disk difüzyon testinde her petriden 2 paralel olacak şekilde hazırlanmış ve disk etrafında oluşan her zondan 3 ölçüm alınmıştır.

3.5. MİK Değerlerinin Belirlenmesi

3.5.1. Agar-Disk Difüzyon Yöntemi

MİK değeri mikroorganizmanın tüplerdeki üremesini tamamen inhibe eden ve çıplak gözle belirlenebilen en düşük antimikrobiyal ilaç konsantrasyonudur. Bu nedenle kontrol ile kıyaslandığında %80 veya daha fazla bir azalmanın olduğu konsantrasyon belirlenir (Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, 2014). Antibiyotiklerin MİK değerleri agar-disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. “Toz Antibiyotiklerin Dilüsyon Aralığının Hazırlanması” kısmında (3.3.3) belirtilen aralıkta antibiyotik çözeltileri iki katlı dilusyonlar halinde hazırlanmıştır. Mikroorganizma inokulumları 24 saatlik kültürler kullanılarak ve McFarland cihazındaki değer 0,5 olacak şekilde ayarlanmıştır. 100 µl McFarland’a göre ayarlanmış kültürden alınarak MHA besiyerine yayılmıştır. Hazırlanan antibiyotik çözeltileri 30 µl steril boş disklerle (disk emme kapasitesi 20-50 µl) emdirilmiştir. İnoküle edilen agar yüzeyine farklı antibiyotik konsantrasyonları (0,25-128 mg/L) içeren bu diskler yerleştirilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda diskler etrafındaki inhibisyon zonları kumpasla ölçülerek değerlendirme yapılmıştır. Disk difüzyon testinde her petriden 2 paralel olacak şekilde hazırlanmış ve disk etrafında oluşan her zondan 3 ölçüm alınmıştır. Üremenin olmadığı son dilüsyon MİK değeri olarak kabul edilmiştir.

3.5.2. Tüp Dilüsyon Yöntemi

Antibiyotiklerin MİK değerleri ayrıca tüp dilüsyon yöntemi kullanılarak makrodilüsyon uygulanarak belirlenmiştir. Bu yöntemde, incelenecek olan *Salmonella* suşu triptik soy sıvı besiyeri içerisinde 24 saat süreyle 37°C’de inkübe edilmiştir. Bulanıklık oluşan tüplerden belirli miktarlarda alınarak %0,9 NaCl çözeltisi içine aktarılıp ve McFarland 0.5 (10^8 kob/ml)’e göre ayarlanarak standart bir bulanıklık oluşturulmuştur. Bu bakteri hücrelerinden ve farklı konsantrasyonlardaki antibiyotik çözeltilerinden belirli miktarlarda alınarak muller hinton sıvı besiyerine (MHB) eklenmiştir. Sıvı besiyerleri 24-48 saat süreyle 37°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası bulanıklığın görülmediği ilk konsantrasyon MİK değeri olarak belirlenmiştir.

3.6. Kolesterolün MİK Değerleri Üzerine Ekisinin Belirlenmesi

Kolesterol varlığının ve miktarının bakterilerin dirençlilik profillerine etkisi disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. “Kolesterol Çözeltisinin Hazırlanması” kısmında (3.2) belirtilen şekilde kolesterol çözeltisi hazırlanmıştır. Antibiyotiklerin farklı konsantrasyonları (0,25-128 mg/L) kolesterol çözeltisi ile 1:1 oranında karıştırılarak steril boş disklere emdirilmiştir ve farklı konsantrasyonlarda antibiyotik ve kolesterol içeren bu diskler McFarland’a göre ayarlanmış bakteri hücresi yayılmış MHA besiyerine yerleştirilip 24-48 saat süreyle 37°C’de inkübe edilmiştir. Her petriden 2 paralel olacak şekilde hazırlanmış ve disk etrafında oluşan her zondan 3 ölçüm alınmıştır.

3.7. FT-IR Analiz Yöntemi

3.7.1. Örnek Hazırlama

FT-IR analizlerinde “Tüp Dilüsyon Yöntemi” kısmında (3.5.2) belirtilen şekilde farklı antibiyotiklerin kolesterollü ve kolesterolsüz ortamda belirlenen MİK değerleri için inkübe edilmiş sıvı besiyerleri kullanılmıştır. Ayrıca sadece kolesterol içeren ve sadece bakteri hücresi içeren besiyerleri de kontrol amacıyla hazırlanmıştır. Hazırlanan bu sıvı besiyerleri 9000 rpm, 25 °C de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra, pellet iki kez fosfat tamponu (pH 7, 1 M) ile yıkanmıştır. İkinci yıkamadan sonra örnekler liyofilize edilmiştir.

3.7.2. FT-IR Spektroskopi Analiz Yöntemi

FT-IR analizleri için MİK değerlerinde hazırlanıp liyofilize edilen örnekler FT-IR spektroskopi cihazının ATR aksesuarı üzerine yerleştirilmiştir. FT-IR absorpsiyon spektraları FT-IR spektrometresi (Perkin-Elmer Spektrum two) kullanılarak 4,000 and 450 cm^{-1} aralığında, 4 cm^{-1} spektral rezolusyonda ve 4 tarama sayısı sonucunda elde edilmiştir. Her örnek için en az 2 spektra elde edilmiştir.

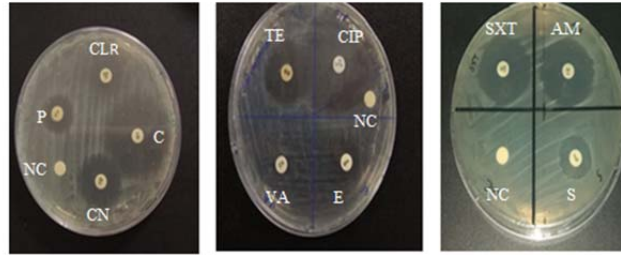
3.8. İstatistiksel Analiz

Çalışmada kolesterolün antibiyotik çözeltisi ile birlikte bakteri üzerindeki antimikrobiyal etkisinin belirlenmesi amacıyla varyans analizi ve Fisher’ın en küçük anlamlı fark yöntemi ($P<0,05$ düzeyinde) Minitab 17 programı kullanılarak uygulanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. *Salmonella* Typhimurium'un Antibiyotik Duyarlılığı

Salmonella Typhimurium suşunun antibiyotik duyarlılığı, 10 hazır antibiyotik diskleri (ampisilin, streptomisin, sulfametoksazol/trimetoprim, siprofloksazin, tetrasiklin, kloramfenikol, gentamisin, eritromisin, vanlomisin, klaritromisin ve penisilin) kullanılarak disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Disk difüzyon yöntemine göre *Salmonella* Typhimurium suşunun farklı antibiyotiklerle inhibisyon bölgesinin gösterimi (C- Kloramfenikol, P- Penisilin, CN- Gentamisin, CIP- Siprofloksazin, TE- Tetrasiklin, E- Eritromisin, VA- Vankomisin, AM- Ampisilin, SXT- Sulfametoksazol/Trimetoprim, S- Streptomisin, CLR-Klaritromisin, NC-Negatif kontrol).

Salmonella Typhimurium antibiyotik duyarlılık profili Klinik Laboratuvarlar Standartları Enstitüsü (CLSI)'nün belirlediği inhibisyon standardına göre duyarlı ve dirençli olarak Tablo 4.1 ve devamında sınıflandırılmıştır.

Tablo 4.1. *Salmonella* Typhimurium antibiyotik duyarlılık profili.

Antibiyotik	Disk içeriği (µg)	İnhibisyon Zon Çapı (mm)			Sonuç (mm)	Değerlendirme
		S	I	R		
Ampisilin	10	≥17	14-16	≤13	26,17±0,45	S
Streptomisin	10	≥15	12-14	≤11	16±0,74	S
Eritromisin	15	–	–	–	İnhibisyon zon çapı oluşmadı	*
Sulfametoksazol/Trimetoprim	23.75/1.25	≥16	11-15	≤10	26,4±0,67	S
Siprofloksazin	5	≥31	21-30	≤20	37,75±0,4	S

R: Dirençli , S: Duyarlı, I: Orta duyarlı, * Belirlenemedi

Tablo 4.1. *Salmonella* Typhimurium antibiyotik duyarlılık profili. (Devamı)

Antibiyotik	Disk içeriği (µg)	İnhibisyon Zon Çapı (mm)			Sonuç (mm)	Değerlendirme
Tetrasiklin	30	≥15	12-14	≤11	22,66±0,74	S
Penisilin	10U	>29	–	<28	16,21±1,83	R
Kloramfenikol	30	≥18	13-17	≤12	31,08±0,45	S
Gentamisin	10	≥15	13-14	≤12	20,6±0,18	S
Vankomisin	30	–	–	–	İnhibisyon zon çapı oluşmadı	R
Klaritromsin	15	–	–	–	14,16±0,96	*

R: Dirençli , S: Duyarlı, I: Orta duyarlı, * Belirlenemedi

Gözlenen inhibisyon zonunun sınır değerden büyük veya ona eşit olması durumunda, mikroorganizmanın antibiyotiğe duyarlı olduğu, gözlenen inhibisyon zonunun sınır değerden daha küçük olması durumunda ise mikroorganizmanın dirençli olduğu şeklinde yorumlanmaktadır. Mikroorganizma ilaca ne kadar duyarlı ise, diskin etrafında oluşan inhibisyon zonunun çapı o kadar geniş olacaktır. Çalışmamızda; *Salmonella* Typhimurium'un ampicilin, streptomisin, sulfametoksazol/trimetoprim, siprofloksazin, tetrasiklin, kloramfenikol ve gentamisine duyarlı olduğu görülmüştür. *S. Typhimurium*'un ampicilin, sulfametoksazol/trimetoprim ve kloramfenikole duyarlı olduğu görülmesine rağmen, bu antibiyotik disklerin etrafında bazı bakteri kolonileri görülmüştür, bu da bazı kolonilerin bu antibiyotiklere karşı direnç kazanmalarını sağlayan mutasyonlar geliştirmiş olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Ayrıca *Salmonella* Typhimurium'un penisilin ve vankomisin karşı dirençli olduğu gözlemlenmiştir. Klaritromisin için inhibisyon zon çapı oluşumu gözlemlenmiş olmasına rağmen, standart sınır değerleri belirlenemediği için değerlendirilmesi yapılamamıştır. Eritromisin için ise, inhibisyon zon çapı oluşumu gözlemlenmemiş fakat, standart sınır değerleri belirlenemediği için değerlendirilmesi yapılamamıştır

Ejo ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada, toplam 21 *Salmonella* izolatu, dokuz farklı antibiyotik kullanılarak antibiyotik duyarlılık testine tabi tutulmuştur. Genel olarak, antibiyotik duyarlılık testi sonucunda, seftriakzon, gentamisin ve nalidiksik asidin, bu çalışmadan izole edilen *Salmonella* spp.'e karşı etkili olan antibiyotikler olduğu ortaya konulmuştur.

CSPI'in yayınladığı bir raporda gıda kaynaklı antibiyotik direnç salgınlarında izole edilen *Salmonella* Typhimurium'un; ampisilin streptomisin, sülfametoksazol, tetrasiklin ve kloramfenikole dirençli olduğu tespit edilmiştir.

Kuang ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada, Şanghay'da insanlardan, yiyeceklerden, hayvanlardan ve sudan izole edilen 3680 *Salmonella* suşu içerisinde siprofloksasine direnç gösteren en yaygın suşun *Salmonella* Typhimurium olduğu bulunmuştur.

Fallah ve ark. (2015) tarafından ise tifodial olmayan *Salmonella* spp.'de antibiyotik direnç paterni belirlenmiştir. Bütün suşlar sefotaksim ve siprofloksasine duyarlı ve % 100'ü nalidiksik asit, tetrasiklin ve streptomisine karşı dirençli olarak bulunmuştur.

Almedia ve ark.'nın (2018) yaptığı çalışmada, 90 *Salmonella* Typhimurium suşu, Brezilya'daki farklı coğrafi bölgelerden insanlardan ve yiyeceklerden izole edilmiştir. İncelenen 90 *S. Typhimurium* suşu en yüksek dirençliliği sülfonamidlere karşı gösterirken sırasıyla streptomisine, tetrasikline, gentamisine ve seftriaksona da dirençli olarak bulunmuştur.

Thong ve ark.'nın (2011), pazarlarda ve hipermarketlerde çiğ tavuk etinde *Salmonella* Enteritidis ve *Salmonella* Typhimurium'un varlığını incelemek ve ayrıca *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium*'un antibiyotik duyarlılık profilini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada; çoklu ilaç dirençli *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium*'un tüm izolatları eritromisin, penisilin ve vankomisine dirençliken, gentamisin, tetrasiklin ve trimetoprim karşı duyarlı olarak bulunmuştur. Yptığımız çalışmada *S. Typhimurium* suşu Thong ve ark.'nın (2011) yaptığı çalışmadaki antibiyotiklere benzer dirençlilik profili göstermiştir.

El-Sharkawy ve ark.'nın (2017) yaptığı çalışmada ise, Mısır'daki tavuk çiftliklerinden izole edilen *S. enterica* serovars Typhimurium ve Enteritidis'in insidansı ve antimikrobiyal direnci araştırılmıştır. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ve *S. enterica* serovar Enteritidis, tavuk çiftliğinde bulunan baskın serotipler olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmada izole edilen *S. enterica* serovar Typhimurium ampisilin, kloramfenikol ve tetrasikline dirençli olarak bulunmuştur. Tüm izolatlar gentamisine duyarlı olarak belirlenmiştir. *S. enterica* serovar Typhimurium'un streptomisine ve trimetoprim / sülfometoksazole sırasıyla % 89,7 ve % 94,8 duyarlı olarak bulunmuştur.

Yapılan çalışmalara bakıldığında; *Salmonella* Typhimurium'un genellikle ampisiline, streptomisine, sülfametoksazola, tetrasikline, gentamisine, siprofloksazine, kloramfenikole, penisiline, vankomisine ve eritromisine karşı dirençli olduğu belirlenmiştir. Ancak bazı çalışmalarda; siprofloksazine, tetrasikline, trimetoprim ve gentamisine duyarlı *Salmonella* Typhimurium suşları tanımlanmıştır. Çalışmamızda kullandığımız *Salmonella* Typhimurium suşunun antibiyotik direnç profili çalışmaların aksine kullanılan bu antibiyotiklerin çoğuna karşı duyarlı olarak belirlenmiştir. Bu durum, *Salmonella* Typhimurium'un farklı suşlarında farklı direnç mekanizmalarına ve antibiyotik direnç profillerine sahip olduğunu göstermektedir.

4.2. MİK Değerlerinin Belirlenmesi

4.2.1. Agar-Disk Difüzyon Yöntemi

MİK, bir mikroorganizmanın büyümesini engelleyen antimikrobiyal maddenin en düşük konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır. Çalışmamızda *Salmonella* Typhimurium'un en fazla direnç gösterdiği dilüsyon halinde hazırlanan antibiyotiklerin MİK değerleri agar-disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Çalışmamızda kullanılan ampisilin, streptomisin, siprofloksazin ve sülfametoksazol/trimetoprim antibiyotik dilüsyonlarının MİK değerleri ve CLSI (2016) standardına göre değerlendirmesi Tablo 4.2 ve devamında verilmiştir.

Tablo 4.2. Antibiyotiklerin MİK sonuçları ve standarda göre değerlendirilmesi

Antibiyotik	MİK (mg/L)			MİK aralık (128-0.25 mg/L)	Sonuç (mm)	Değerlendirme
	S	I	R			
Ampisilin	≤8	16	≥32	128	23,1±0,65	R
				64	18,73±0,17	R
				32	16,19±0,26	R
				16	11,69±0,93	I
Streptomisin	-	-	≥64*	128	8,98±0,61	R

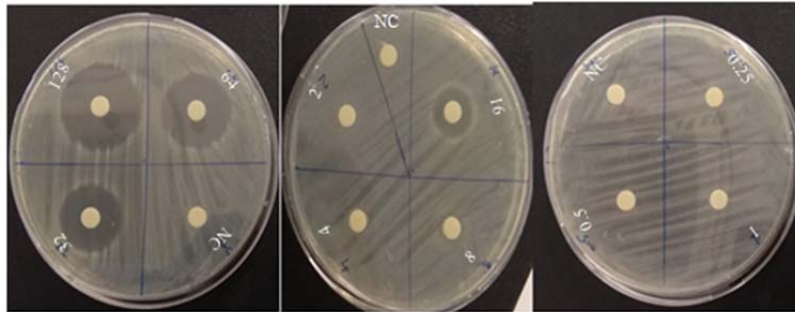
R: Dirençli, S: Duyarlı, I: Orta duyarlı, *Danimarka Bütünleşik Antimikrobiyal Direnç İzleme ve Araştırma Programı (Danmap,2006)

Tablo 4.2. Antibiyotiklerin MİK sonuçları ve standarda göre değerlendirilmesi (Devamı)

Antibiyotik	MİK (mg/L)			MİK aralık (128-0.25 mg/L)	Sonuç (mm)	Değerlendirme
	S	I	R			
Siprofloksazin	≤0.06	0.12-0.5	≥1	128	34,56±0,15	R
				64	32,61±1,71	R
				32	30,73±1,13	R
				16	28,2±0,40	R
				8	29,2±1,07	R
				4	24,87±0,08	R
				2	22,3±0,70	R
				1	19,74±0,40	R
				0.5	17,13±0,40	I
				0.25	12,88±1,90	I
Trimetoprim /sülfametoksazol	≤2/38	-	≥4/76	128	16,89±0,78	R
				64	15,69±2,64	R
				32	13,90±1,28	R
				16	8,86±0,91	R

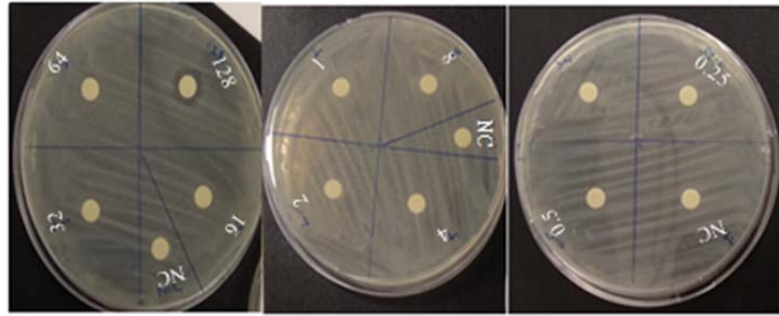
R: Dirençli, S: Duyarlı, I: Orta duyarlı

Ampisilin için; 128-0.25 mg/L konsantrasyon aralığında üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon 16 mg/L olarak belirlenmiştir (Şekil 4.2). Bakterinin antibiyotik direnç profili CLSI (2016) standardına göre belirlenen sınır değerlerindeki MİK konsantrasyonlarına göre değerlendirildiğinde; sınır değer 8 mg/L ve altındaki konsantrasyonlarda duyarlı, 16 mg/L’de orta duyarlı ve 32 mg/L ve üzerindeki konsantrasyonlarda dirençli olarak tanımlanmıştır. Bakterinin inhibisyonu için belirlenen farklı konsantrasyonlarda ampisiline karşı gösterdiği direnç profili incelendiğinde; belirlenen 16 mg/L’deki MİK değeri standarda göre orta duyarlı, belirlenen MİK değeri üzerindeki 32-128 mg/L aralığındaki konsantrasyonlarda ise dirençli olarak yorumlanmıştır.

**Şekil 4.2.** Ampisilin MİK inhibisyon zon çapları, NC:negatif kontrol

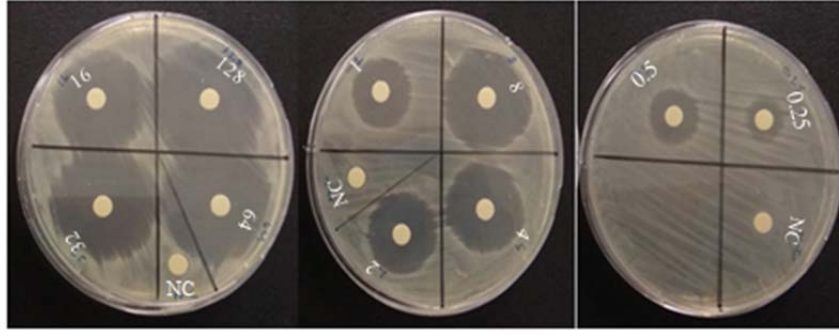
Streptomisin için; 128-0.25 mg/L konsantrasyon aralığında zon oluşumu sadece 128 mg/L’de gözlemlenmiştir (Şekil 4.3). Yani üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon 128 mg/L

olarak belirlenmiştir. Streptomisin için tabloda belirlenen MİK sınır değeri Danimarka Bütünleşik Antimikrobiyal Direnç İzleme ve Araştırma Programı (Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme, DANMAP) (2006)'e göre değerlendirilmiştir. Standarda göre; sınır değeri 64 mg/L konsantrasyonunun üzerindeki MİK konsantrasyonları dirençliliği tanımlamaktadır. Çalışmamızda; streptomisin için 128 mg/L olarak belirlenen MİK değeri standart sınır değerinin üzerinde bir değer olduğundan, bakteri bu konsantrasyondaki ilaca karşı dirençli olarak yorumlanmıştır.



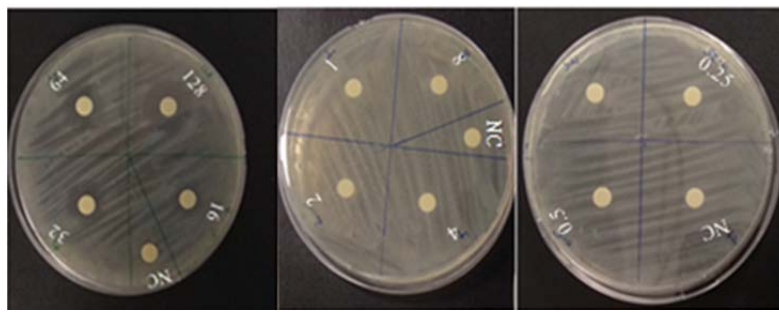
Şekil 4.3. Streptomisin MİK inhibisyon zon çapları, NC: negatif kontrol

Siprofloksazin için 128-0.25 mg/L konsantrasyon aralığındaki tüm konsantrasyonlar için inhibisyon zon çapları elde edilmiştir. 128-0.25 mg/L konsantrasyon aralığında üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon 0.25 mg/L olarak belirlenmiştir. Standarda göre siprofloksazin için belirlenen MİK sınır değerleri incelendiğinde; 0.06 mg/L sınır değerinin altındaki MİK değerlerinde bakterinin antibiyotik direnç profili duyarlı, 0.12-0.5 mg/L MİK değeri aralığında orta duyarlı ve 1 mg/L sınır değeri üzerindeki MİK değerlerinde dirençli olarak tanımlanmıştır. Çalışmamızda bakteri inhibisyonu için belirlenen 0.25 mg/L MİK değeri standarda göre orta duyarlı olarak yorumlanmıştır. Ayrıca bakteri inhibisyonu için belirlenen MİK değeri üzerindeki 1-128 mg/L aralığındaki konsantrasyonlarda bakteri direnç profili dirençli, 0.5 mg/L için ise orta duyarlı olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.4. Siprofloksazin MİK inhibisyon zon çapları, NC: negatif kontrol

Sülfametoksazol/trimetoprim için ise; 128-0.25 mg/L konsantrasyon aralığında üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon 16 mg/L olarak belirlenmiştir (Şekil 4.5). 8-0.25 mg/L konsantrasyon aralığında inhibisyon zon çapı oluşumu gözlemlenmemiştir. Standarda göre sülfametoksazol/trimetoprim için belirlenen MİK sınır değerleri incelendiğinde; 2 mg/L sınır değerinin altındaki MİK değerlerinde bakteri antibiyotiğe karşı duyarlı, 4 mg/L sınır değeri üzerindeki MİK değerlerinde dirençli olarak tanımlanmıştır. Yine, çalışmamızda bakteri inhibisyonu için belirlenen 16 mg/L MİK değeri standarda göre dirençli, belirlenen bu MİK değeri üzerindeki 128-32 mg/L aralığındaki konsantrasyonlarda da aynı şekilde bakteri direnç profili dirençli, MİK değerinin altındaki 8-0.25 mg/L aralığındaki konsantrasyonlarda ise standarda göre duyarlı olarak yorumlanmıştır.



Şekil 4.5. Trimetoprim/sülfametoksazol MİK inhibisyon zon çapları, NC: negatif kontrol

Sonuç olarak; bakteriler için MİK değeri kullanılan bu antibiyotiklerin ulaşabileceği konsantrasyon aralığında ise duyarlı; bakteri için antibiyotiğin MİK değeri uygulanan konsantrasyondan daha yüksekse bakterinin dirençli olduğu kabul edilir. Yaptığımız çalışma ile benzer olarak Onyuka ve ark.'nın (2015) agar disk difüzyon yöntemi ile MİK sonuçlarının

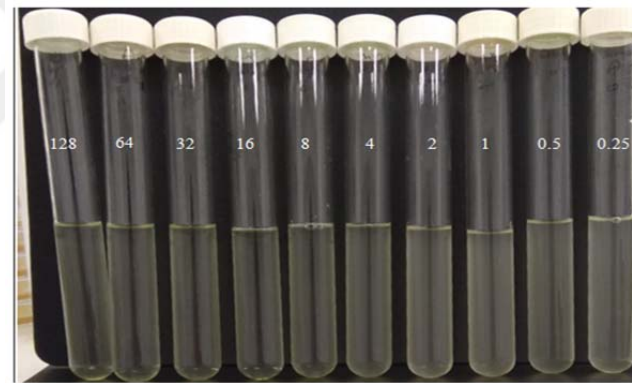
değerlendirildiği çalışmada, tifodial olmayan *Salmonella* izolatları ampisilin, sülfametoksazol ve streptomisine dirençli olarak bulunmuştur. Bakterilerin üremesini % 90 inhibe etmek için gerekli MİK değeri (MİK₉₀) ampisilin için 250 µg / ml, sülfametoksazol için 32 µg/ml, streptomisin için ise 252 µg /ml olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda ise; ampisilin için belirlenen 16 mg/L konsantrasyonundaki MİK değeri; Onyuka ve ark.'nın (2015) ampisilin için belirlediği MİK₉₀ değerine göre yorumlandığında *Salmonella* Typhimurium suşunun daha duyarlı olduğu yönünde değerlendirilmiştir. Çalışmamızda streptomisin için belirlenen 128 mg/L konsantrasyonundaki MİK değeri çalışmadaki MİK₉₀ değerine göre çalışmamızdaki *Salmonella* Typhimurium suşunu inhibe etmek için daha yüksek bir konsantrasyon gerektiği şeklinde yorumlanmıştır. Sülfametoksazol/trimetoprim için belirlenen 16 mg/L'deki MİK değeri çalışmadaki 32 µg/ml MİK₉₀ değerine göre çalışmamızdaki *Salmonella* Typhimurium suşunun orta düzeyde bir dirençlilik profili gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır.

Yapılan bir başka çalışmada ise; Habrun ve ark.'nın (2012) kümes hayvanlarından izole edilen *Salmonella* spp. antibiyotik dirençliliği üzerine yaptığı çalışmada; ampisilin ve streptomisin için belirlenen MİK sınır değeri Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Authority) (EFSA) standardı, siprofloksazin için ise Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) (EUCAST) standardı kullanılmıştır. *Salmonella* Typhimurium için MİK değerleri; ampisilin için MİK₉₀ değeri 0.75 mg/L ve bakterilerin üremesini % 50 inhibe etmek için gerekli MİK değeri (MİK₅₀) 0.5 mg/L, siprofloksazin için MİK₉₀ değeri 0.023 mg/L ve MİK₅₀ değeri 0.012 mg/L, streptomisin için ise MİK₉₀ değeri 12 mg/L ve MİK₅₀ değeri 6 mg/L olarak bulunmuştur. EFSA (2010) standardına göre belirlenen ampisilin MİK sınır değerine (≥ 4 mg/L) ve streptomisin sınır değerine (≥ 32 mg/L), EUCAST (2010) standardına göre siprofloksazin MİK sınır değerine (0.125 mg/L) göre test edilen 9 *S. Typhimurium* izolatının tümü, ampisilin ve streptomisine duyarlı, toplam 8 izolat ise siprofloksazine duyarlı olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda ise bakteri inhibisyonunda ampisilin ve siprofloksazin için belirlenen MİK sınır değerleri CLSI (2016) standardına, streptomisin ise DANMAP 'e (2005) göre değerlendirilmiştir. Çalışmamızda CLSI (2016) standardına göre ampisilin direnç sınır değeri ≥ 32 mg/L, siprofloksazin ≥ 1 mg/L ve streptomisin ≥ 64 mg/L olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızda ampisilin, streptomisin ve siprofloksazin için belirlenen MİK değerleri standarda göre yorumlandığında ampisilin için belirlenen MİK değerinde (16 mg/L), streptomisin için belirlenen MİK değerinde (128 mg/L) ve siprofloksazin için

belirlenen MİK değeri (16 mg/L) bakterinin dirençli olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Habrun ve ark.'nın (2012) yaptığı çalışmada kullanılan farklı standartlara göre belirlenen MİK sınır değerlerinde ve konsantrasyon aralığındaki farklılıklardan dolayı çalışmamızdaki sonuçlarla farklılık göstermiştir.

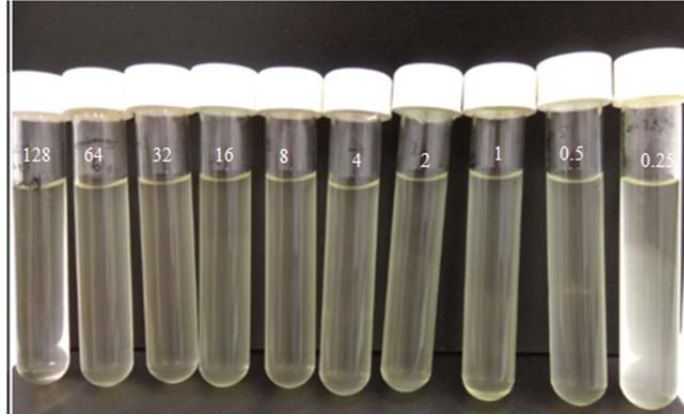
4.2.2. Tüp Dilüsyon Yöntemi

Tüp dilüsyon yöntemi, hem nicel (MİK) hem de nitel (kategori yorumlama) sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır. MİK, belirli bir bakteri suşunun direnç seviyesinin oluşturulmasını ve bazı antimikrobiyal ajanların kullanılmasını büyük ölçüde etkileyebilmektedir. Bu inhibisyon görünür bakteriyel büyümenin yokluğu ile doğrulanır. Çalışmamızda uygulanan tüp dilüsyon yönteminde ampisilin için agar disk difüzyon yönteminde olduğu gibi inkübasyon sonrası bulanıklığın oluşmadığı ilk konsantrasyon 16 mg/ L olarak gözlemlenmiştir (Şekil 4.6).



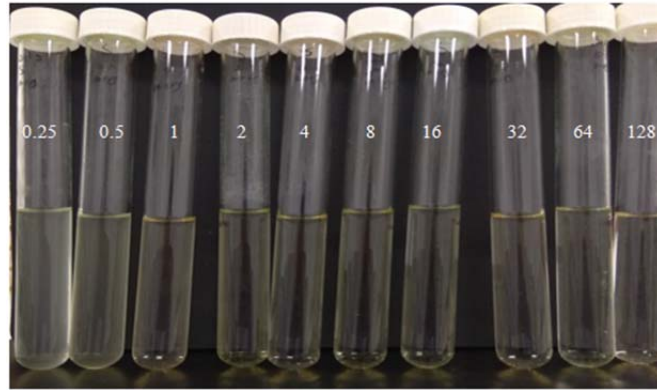
Şekil 4.6. Ampisilin tüp dilüsyon yöntemi

Streptomisin için 128-0.25 mg/L konsantrasyon aralığında Şekil 4.7’de de görüldüğü gibi 0.25-64 mg/L aralığında bulanıklık yani üremenin olduğu, ancak 128 mg/L inkübasyon sonrası bulanıklığın gözlemlenmediği ilk konsantrasyon yani MİK olarak belirlenmiştir. Sonuçlar agar disk difüzyon yöntemi ile paralellik göstermektedir.



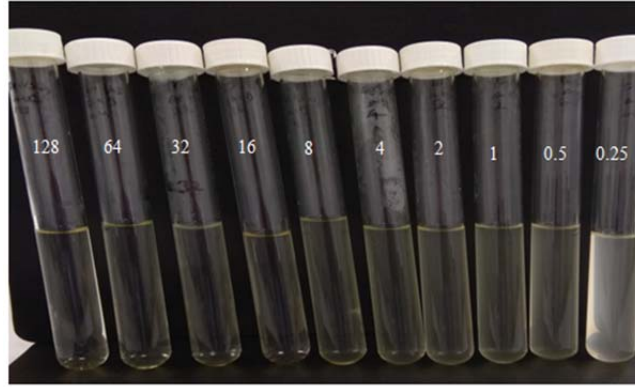
Şekil 4.7. Streptomisin tüp dilüsyon yöntemi

Siprofloksazinde ise; 0.25 ve 0.5 mg/L konsantrasyonlarında bulanıklık gözlemlenirken 1-128 mg/L aralığındaki konsantrasyonlarda bulanıklık gözlemlenmedi (Şekil 4.8). Bu konsantrasyonlarda gözlemlenmeyen bulanıklık agar disk difüzyon yönteminde ölçülen geniş inhibisyon zon çapı ile paralellik göstermektedir. Sayısal olarak ne kadar bakterinin inhibe edildiği tespit edilemese de 0.25 ve 0.5 mg/L’de birbirine yakın bir bulanıklık gözlemlendi.



Şekil 4.8. Siprofloksazin tüp dilüsyon yöntemi

Sulfametoksazol/trimetoprim için ise; 128-0.25 mg/L konsantrasyon aralığında bulanıklığın gözlemlenmediği ilk konsantrasyon 16 mg/L MİK değeri olarak belirlenmiştir (Şekil 4.9). Sonuçlar agar disk difüzyon yöntemi ile paralellik göstermektedir.



Şekil 4.9. Sulfametoksazol/trimetoprim tüp dilüsyon yöntemi

San Martín ve ark.'nın (2008) yaptığı çalışmada domuzdan izole edilen 54 *Salmonella* spp. suşlarında elde edilen MİK değeri, direnç ve dağılım yüzdesi belirlenmiştir. 54 suştan % 65'i (35 suş) test edilen antimikrobiyal reaktiflerin en az birine karşı dirençli olarak bulunmuştur. Çalışmada kullanılan streptomisin için DANMAP (2005) tarafından verilen sınır değer, CLSI'nın sınır değerleri ise diğer antibiyotikler için kullanılmıştır. San Martín ve ark.'nın (2008) yaptığı çalışmada domuzdan izole edilen 54 *Salmonella* spp. suşlarında elde edilen MİK değerleri; streptomisin için izolatların çoğunda (21 izolat) 64 mg/L'de görülmüştür. Yani izole edilen *Salmonella* spp. suşlarının çoğu DANMAP (2005) standardında streptomisin için belirlenen sınır değerine (≥ 64 mg/L) göre; dirençli olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda ise *Salmonella* Typhimurium inhibisyonunda streptomisin için belirlenen 128 mg/L'deki MİK, kullandığımız *Salmonella* Typhimurium suşunun streptomisine bu çalışmadaki suşlar gibi direnç gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır. Çalışmada; siprofloksazin için belirlenen MİK konsantrasyonlarından 0.125 ve 4 mg/L'de izolatlar gözlemlenmiştir. Çalışmada CLSI'nın siprofloksazin direnç sınır değeri (≥ 2 mg/L) için belirlediği MİK değeri kullanılarak *Salmonella* spp. suşlarının büyük çoğunluğunun siprofloksazine karşı duyarlı olduğu bulunmuştur. Çalışmamızda ise kullandığımız *Salmonella* Typhimurium suşunun siprofloksazin için belirlenen 0.25 mg/L'deki MİK değerine göre çalışmadaki suşlara göre daha duyarlı olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Çalışmada trimetoprim/sülfametoksazol için izole edilen *Salmonella* spp. suşlarının çoğu (41 izolat) 2 mg/L 'de belirlenmiştir. Çalışmada trimetoprim/sülfametoksazol için belirlenen sınır değerine (≥ 4 mg/L) göre; izole edilen *Salmonella* spp. suşlarının çoğu dirençli olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda ise trimetoprim/sülfametoksazol için belirlenen 16 mg/L'deki MİK değeri çalışmadaki *Salmonella* suşlarına göre daha dirençli olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

Yapılan bir başka çalışmada ise; Banerjee ve ark.'nın (2018) hastalardan izole edilen *Salmonella* Typhimurium izolatının CLSI (2014) standardına göre *Salmonella* Typhimurium'a karşı çeşitli antibiyotiklerin MİK değerlerinin yorumlanması yapılmıştır. Çalışmada test edilen izolatın MİK değeri ≥ 4 mg/L olarak belirlenmiştir. Araştırmacılar tarafından elde edilen sonuç CLSI (2014) standardına göre dirençlilik için verilen MİK sınır değeri (≥ 1 mg/L) üzerinde bir değer göstermiştir ve bu durum izolatın dirençliliğini göstermiştir. Çalışmamızda ise *Salmonella* Typhimurium inhibisyonunda siprofloksazin için belirlenen 0.25 mg/L'deki MİK değeri çalışmadaki MİK değerinden daha düşük bulunmuştur. Bu durum kullandığımız *Salmonella* Typhimurium suşunun siprofloksazin için MİK değeri (0.25 mg/L), Banerjee ve ark.'nın (2018) yaptığı çalışmadaki suşa göre ve çalışmamızda referans alınan CLSI (2016) standardına göre dirençlilik için verilen MİK sınır değeri (≥ 1 mg/L) altında bir değer göstermiştir. Bu durum *Salmonella* Typhimurium belirlenen MİK değerindeki konsantrasyonda siprofloksazine karşı orta duyarlı olarak yorumlanmıştır.

4.3. Kolesterolün MİK Değerleri Üzerine Etkisi

Kolesterolün *Salmonella* bakterilerinin dirençlilik profillerine etkisi disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Antibiyotiklerin kolesterol eklenmiş ve eklenmemiş halinde inhibisyon zon çaplarındaki değişim Tablo 4.3.'de verilmiştir. Kolesterol eklenen ve eklenmeyen örnekler zon çaplarına göre istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, ampisilin (128-32 mg/L), siprofloksasin (128-1 mg/L) ve sulfametoksazol/trimetoprim (64 mg/L) için farklı antibiyotik konsantrasyonlarında örnekler arasında önemli bir fark olduğunu göstermektedir ($P < 0,05$). Sulfametoksazol/trimetoprim antibiyotiğinin 128 mg/L konsantrasyonunda kolesterol eklenen ve eklenmeyen örnekler arasında önemli bir fark olmadığı belirlenmiştir ($P > 0,05$).

Ampisilin için kolesterol eklenmemiş halinde 128-0.25 mg/L aralığındaki konsantrasyonlarda MİK değeri 16 mg/L olarak belirlenmiştir. Ancak daha önce 16 mg/L de gözlemlenen zon oluşumu kolesterol eklendikten sonra gözlemlenmemiştir (Şekil 4.10). MİK değeri kolesterol eklemeyen önce 16 mg/L iken, kolesterol eklendikten sonra 32 mg/L olarak belirlenmiştir. Ayrıca inhibisyon zon çaplarında kolesterol eklenmemiş haline göre azalma görülmüştür.

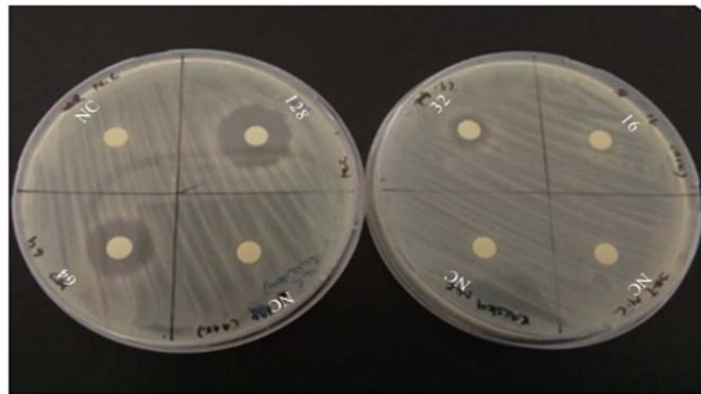
Tablo 4.3. Antibiyotiklerin kolesterol eklenmiş ve eklenmemiş halinde inhibisyon zon çaplarındaki değişim

Antibiyotik	Antibiyotik konsantrasyonu* (mg/L)	Zon çapı (mm) (Antibiyotik ve bakteri)	Zon çapı (mm) (Kolesterol, bakteri ve antibiyotik)
Ampisilin	128	23,1±0,65 ^a	18,83 ± 0,04 ^b
	64	18,73±0,17 ^a	14,41 ± 0,22 ^b
	32	16,19±0,26 ^a	7,98 ± 0,07 ^b
	16	11,69±0,93	-
Streptomisin	128	8,98±0,61	-
Siprofloksazin	128	34,56±0,15 ^a	31,82 ± 1,46 ^b
	64	32,61±1,71 ^a	29,36 ± 0,88 ^b
	32	30,73±1,13 ^a	28,29 ± 1,51 ^b
	16	28,2±0,40 ^a	24,74 ± 2,54 ^b
	8	29,2±1,07 ^a	22,59 ± 1,56 ^b
	4	24,87±0,08 ^a	18,47 ± 0,66 ^b
	2	22,3±0,70 ^a	17,04 ± 0,71 ^b
	1	19,74±0,40 ^a	12,4 ± 0,57 ^b
	0.5	17,13±0,40	-
	0.25	12,88±1,90	-
Sulfametoksazol/Trimetoprim	128	16,89 ± 0,78 ^a	16,83 ± 0,72 ^a
	64	15,69 ± 2,64 ^a	11,46 ± 0,91 ^b
	32	13,90 ± 1,28	-
	16	8,86 ± 0,91	-

^{a-b} Aynı satırdaki farklı üstel harfler örnekler arasında önemli bir fark olduğunu göstermektedir. ($P < 0.05$)

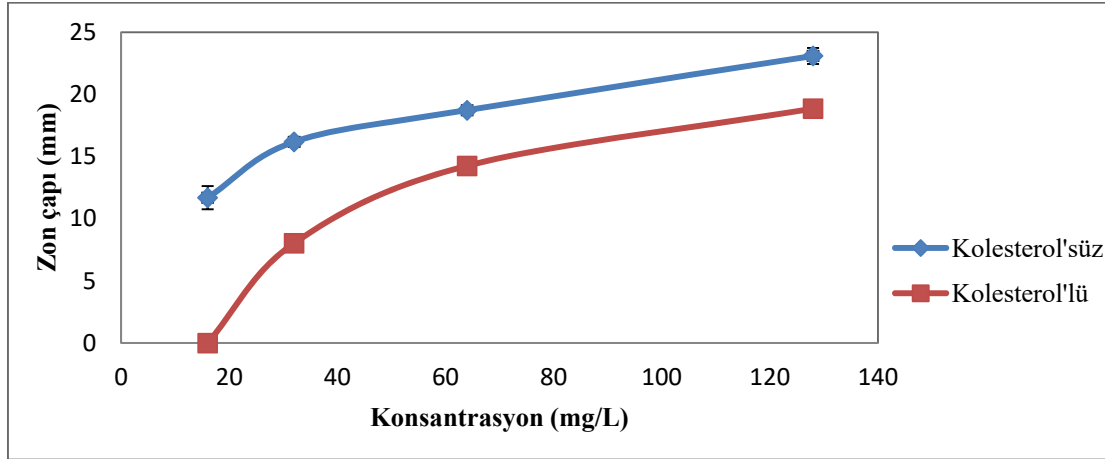
*Kolesterol eklenen ve eklenmeyen çözeltilerdeki antibiyotik konsantrasyonları çözelti içerisine eklenen konsantrasyonlardır.

Sonuçların değerlendirilmesinde, MİK değeri artarken, inhibisyon zon çaplarındaki azalma bakterinin kolesterol eklenmemiş haline göre direnç kazandığının; yani bakterinin ilaca karşı gösterdiği duyarlılığın azaldığı şeklinde yorumlanmıştır.



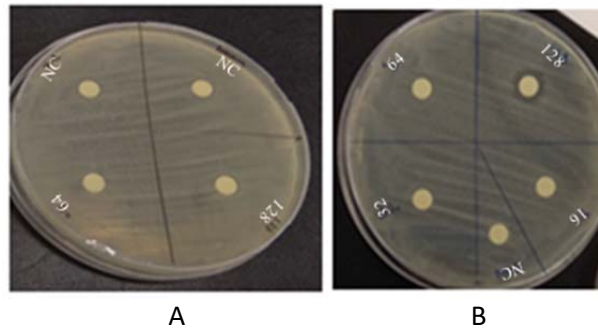
Şekil 4.10. Ampisilin kolesterol eklenmiş inhibisyon zon çapı halı, NC: negatif kontrol

Kolesterol eklenmiş ve eklenmemiş ortamda konsantrasyona bağlı zon çaplarındaki değişimler Şekil 4.11'deki grafikte karşılaştırılmalı olarak verilmiştir. Grafikte görüldüğü gibi kolesterol bulunmayan ortamda farklı antibiyotik konsantrasyonlarına karşı ölçülen zon çapları daha yüksek ölçülmüştür.



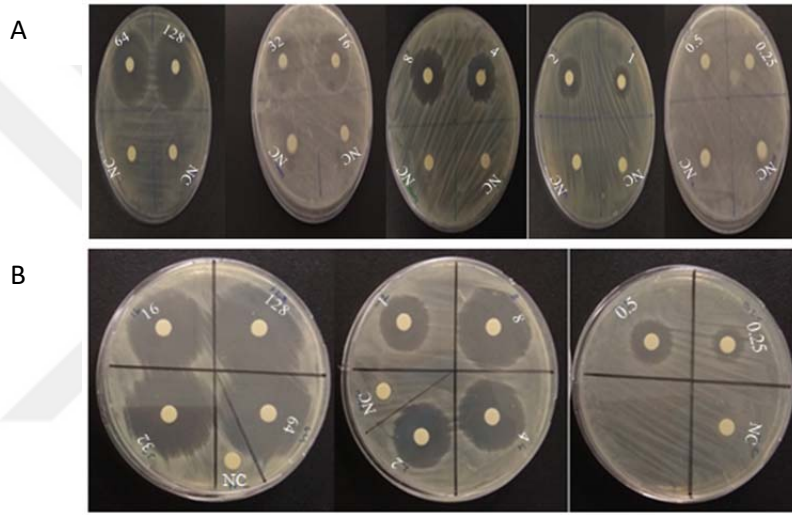
Şekil 4.11. Ampisilin için kolesterolü ve kolesterolsüz ortamdaki inhibisyon zon çaplarındaki değişim

Streptomisin için ise; Şekil 4.12'de verildiği gibi kolesterol eklenmemiş halinde 128-0.25 mg/L konsantrasyon aralığında sadece 128 mg/L'de inhibisyon zon oluşumu gözlemlenirken, kolesterol eklendikten sonra 128 mg/L'de zon oluşumu gözlemlenemedi. Ampisilinde olduğu gibi inhibisyon zon çapında azalma görülmüştür (Tablo 4.3). Bu durum yine bakterinin antibiyotiğe karşı dirençli hale geldiği şeklinde yorumlanmıştır.

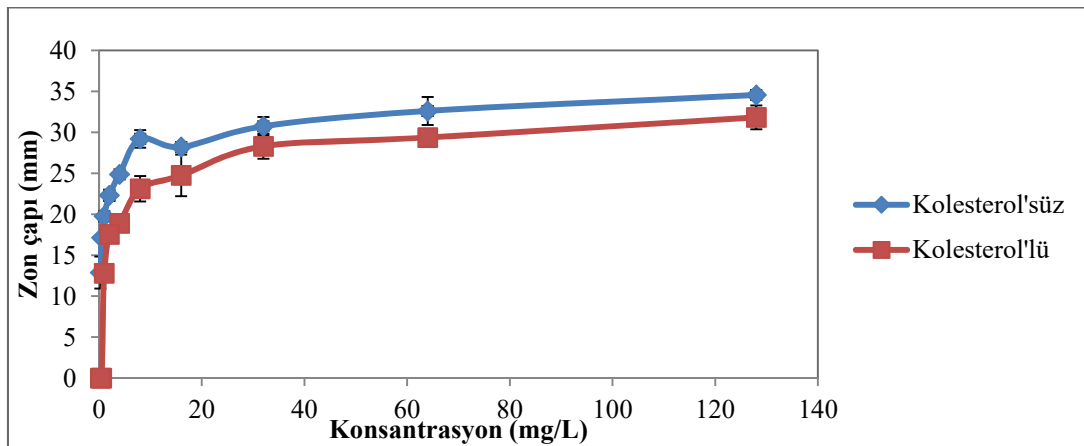


Şekil 4.12. Streptomisin inhibisyon zon çapı değişimi , A: Kolesterol eklenmiş, B: Kolesterol eklenmemiş NC: negatif kontrol

Siprofloksazinde ise; Şekil 4.13’de verildiği gibi 128- 0.25 mg/L konsantrasyon aralığında tüm konsantrasyonlarda zon oluşumu gözlemlenirken; kolesterol eklenmiş halinde 0.25 ve 0.5 mg/L konsantrasyonlarında inhibisyon zonu oluşmamış (Şekil 4.13-A) ve diğer konsantrasyonların zon çaplarında da azalma görülmüştür (Tablo 4.3). Kolesterol eklenmeden önce 0.25 olan MİK değeri, kolesterol eklendikten sonra 1 mg/L olarak bulunmuştur. Bu durum kolesterol eklendikten sonra MİK değerinin artmasına, zon çaplarının azalmasına bağlı olarak bakterinin direnç kazandığı şekline yorumlanmıştır. Ayrıca kolesterol eklenmiş ve eklenmemiş durumlarında konsantrasyona bağlı zon çaplarındaki değişimler aşağıdaki grafikte (Şekil 4.14) karşılaştırılmalı olarak verilmiştir.

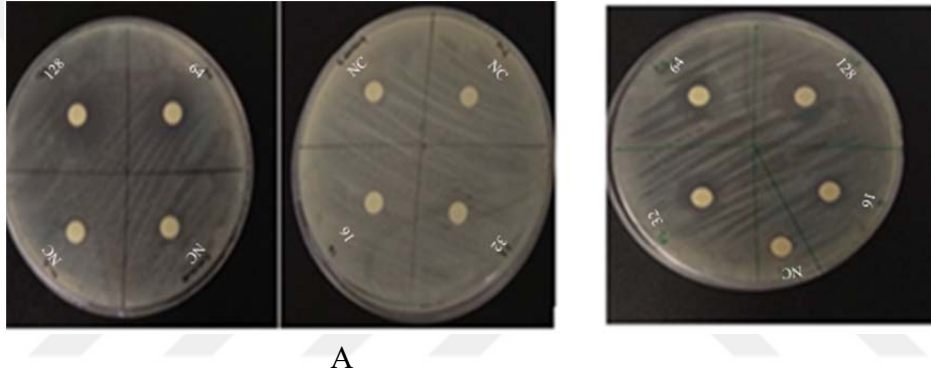


Şekil 4.13. Siprofloksazin inhibisyon zon çaplarındaki değişim, A: kolesterol eklenmiş, B: kolesterol eklenmemiş, NC: negatif kontrol

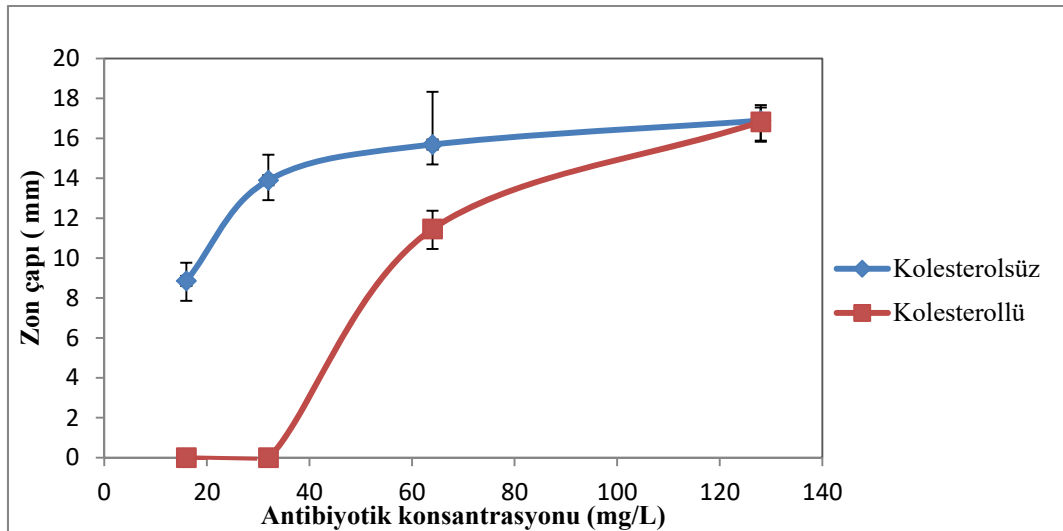


Şekil 4.14. Siprofloksazin için kolesterollü ve kolesterolsüz ortamda inhibisyon zon çaplarındaki değişim

Sulfametoksazol/trimetoprim için ise; Şekil 4.15-B’de verildiği gibi kolesterol eklenmeden önce 128-16 mg/L konsantrasyon aralığında inhibisyon zon oluşumu gözlemlenirken, kolesterol eklendikten sonra 16 ve 32 mg/L konsantrasyonlarında inhibisyon zonu oluşmadı (Şekil 4.13-A). Diğer konsantrasyonlarda oluşan zonların çaplarında azalma görüldü. Kolesterol eklenmeden önce 16 mg/L olan MİK değeri, eklendikten sonra 64 mg/L olarak değişmiştir. Diğer incelenen antibiyotiklerde olduğu gibi; bakterinin antibiyotiğe karşı olan duyarlılığında bir azalma görülmüştür. Sulfametoksazol/trimetoprim için kolesterol eklenmiş ve eklenmemiş ortamda konsantrasyona bağlı zon çaplarındaki değişimler grafikte (Şekil 4.16) karşılaştırılmalı olarak verilmiştir.



Şekil 4.15. Sulfametoksazol/trimetoprim inhibisyon zon çaplarındaki değişim, A: kolesterol eklenmiş, B: kolesterol eklenmemiş, NC: negatif kontrol



Şekil 4.16. Sulfametoksazol/trimetoprim için kolesterolü ve kolesterolsüz ortamdaki inhibisyon zon çaplarındaki değişim

Yapılan literatür araştırmaları sonucunda kolesterolün *Salmonella* bakterilerinin antibiyotik dirençliliği üzerine etkisinin incelendiği herhangi bir çalışmanın bulunmadığı görölmüştür. Kolesterolün ve türevlerinin farklı bakterilerin antibiyotik dirençlilikleri üzerine etkisinin incelendiği çalışmalarda; Tintino ve ark.'ları (2017), ergosterol ve kolesterolün çoklu ilaca dirençli *Staphylococcus aureus*'un suşlarında aktif pompa sistemlerine karşı etkisini araştırmışlardır. Kolesterol ve ergosterolün akış pompalarına etkisi gözlemlenmemiştir. Ancak mutasyona uğramamış suşlarında membran değişiklikleri nedeniyle bir sinerji gözlemlenmiştir.

Andrade ve ark.'ları (2014) tarafından ise kolesterol ve ergosterol'ün *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli*'ye karşı etkisi araştırılmış fakat antibakteriyel etkileri olmadığı ancak antibiyotiklerle birleştirildiğinde MİK değerini azalttığı sonucuna varılmıştır. Bizim çalışmamızda ise kolesterolün MİK değerini artırdığı ve *Salmonella* Typhimurium suşunun antibiyotiğe karşı duyarlılığının azalabileceği sonucuna varılmıştır.

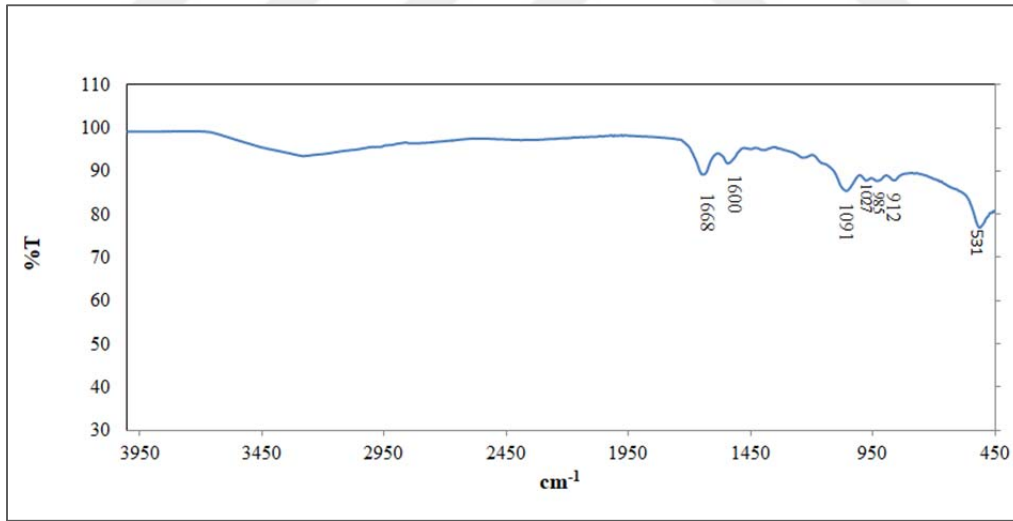
McGee ve ark.'nın (2011) yaptığı çalışmada ise *Helicobacter pylori* bakteri hücrelerinin 12 antimikrobiyal ajana kolesterol olmayan ortamda büyüyen hücrelere oranla daha dirençli oldukları gösterilmiştir. Çalışmamızda ise kolesterolün bakteri hücrelerinin sayısında nasıl bir değişime neden olduğu belirlenememiştir. Bu durumun *Salmonella* Typhimurium'un kolesterol varlığında gösterdiği yapısal değişiklikten kaynaklanabileceği veya kolesterolün *Salmonella* Typhimurium'un sayımı için kullanılan besiyerinin yapısını etkilemiş olabileceği tahmin edilmektedir.

4.4. FT-IR Sonuçları

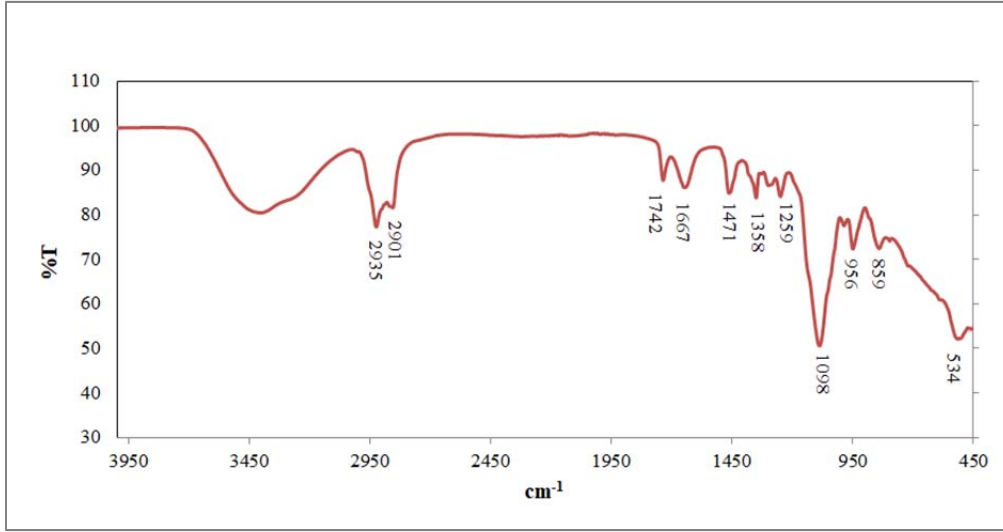
Kolesterolün antibiyotikler ile birlikte *Salmonella* Typhimurium'un yapısında meydana getirdiği değişimler FT-IR yöntemi kullanılarak fonksiyonel gruplardaki değişime göre değerlendirilmiştir. *Salmonella* Typhimurium ve kolesterolün FT-IR spektroskopisi yöntemi ile analizi sonucunda elde edilen spektrumlar sırasıyla Şekil 4.17 ve Şekil 4.18'de verilmiştir. *Salmonella* Typhimurium için elde edilen spektrum incelendiğinde 1668, 1600, 1091, 1027 , 985 ve 912 cm⁻¹'dalga boylarında pikler olduğu görölmektedir. Proteinlerin amid gruplarının C=O germe titreşimleri 1668 ve 1600 cm⁻¹'deki pikler için amid bölgesi olarak belirlenmiştir. 1300 ile 900 cm⁻¹ arasındaki bölge, hücresel proteinlerin, nükleik asitlerin, hücre zarının ve hücre çeperi bileşenlerinin titreşimsel özellikleri ile karakterizedir (Goodacre ve ark., 1996).

Hücre duvarı peptidoglikan tabakası ve lipopolisakkarit dış membranındaki polisakkaritlerin C-O-C germe titreşimleri $1091\text{-}912\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığında belirlenen pikler için polisakkarit bölgesi olarak belirlenmiştir (Naumann ve ark., 1991a, b).

Kolesterol için elde edilen spektrumda belirlenen bantlar ise; 2935 , 2901 , 1742 , 1667 , 1471 , 1358 , 1259 , 1098 , 956 ve 859 cm^{-1} dalga boylarında görülmektedir (Şekil 4.18). 2935 cm^{-1} dalgaboyundaki pik CH_2 asimetric gerilmesinden dolayı oluşmaktadır. 2901 cm^{-1} dalgaboyundaki pik ise; CH_2 simetric gerilmesinden, 1742 cm^{-1} 'deki pik C=O gerilme titreşimlerinden, 1667 cm^{-1} 'de ise C=O gerilme (Zheng ve ark., 1986), C-C vibrasyonu ve C=C gerilmesinden kaynaklanmaktadır. 1471 cm^{-1} dalgaboyundaki pik; CH_2 ve CH_3 simetric gerilme, 1358 cm^{-1} 'deki pik ise CH_2 ve CH_3 eğilmeden olduğu düşünülmüştür (Raman ve ark.,2008). CH_2 bağ yapısında meydana gelen deformasyon 1259 cm^{-1} dalga boyundaki piki vermiştir. 1098 cm^{-1} dalgaboyunda ise C-C gerilme, 956 cm^{-1} 'deki pik ise; CH=CH_2 ve CH_2 eğilme titreşimlerine karşılık olarak tanımlanmıştır. C-H düzlem dışı gerilme titreşimi ise 859 cm^{-1} dalga boyundaki pik olarak yorumlanmıştır (Gupta ve ark., 2014).



Şekil 4.17. *Salmonella Typhimurium*'un FT-IR spektrumu



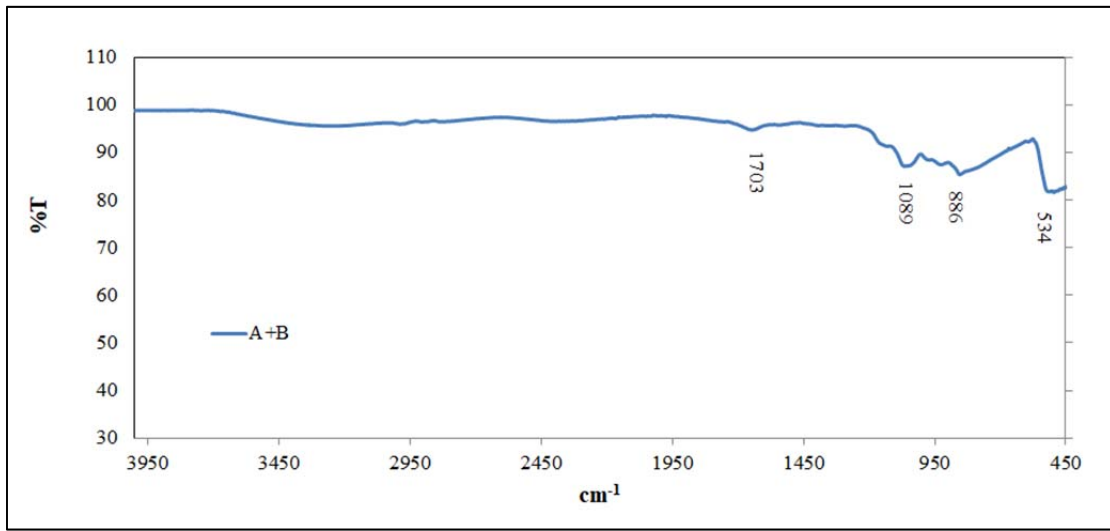
Şekil 4.18. Kolesterolün FT-IR spektrumu

FT-IR spektroskopi yöntemi ile öncelikle ampisilin, siprofloksazin, streptomisin ve sülfametoksazol/trimetoprimin *Salmonella* Typhimurium üzerine etkileri incelenmiştir. Daha sonra ise antibiyotik ve bakteri içeren bu ortama kolesterol eklenerek *Salmonella* Typhimurium'un kolesterol olmayan ortama göre antibiyotik direnç profilindeki değişimler yine FT-IR spektroskopi yöntemi ile incelenmiştir.

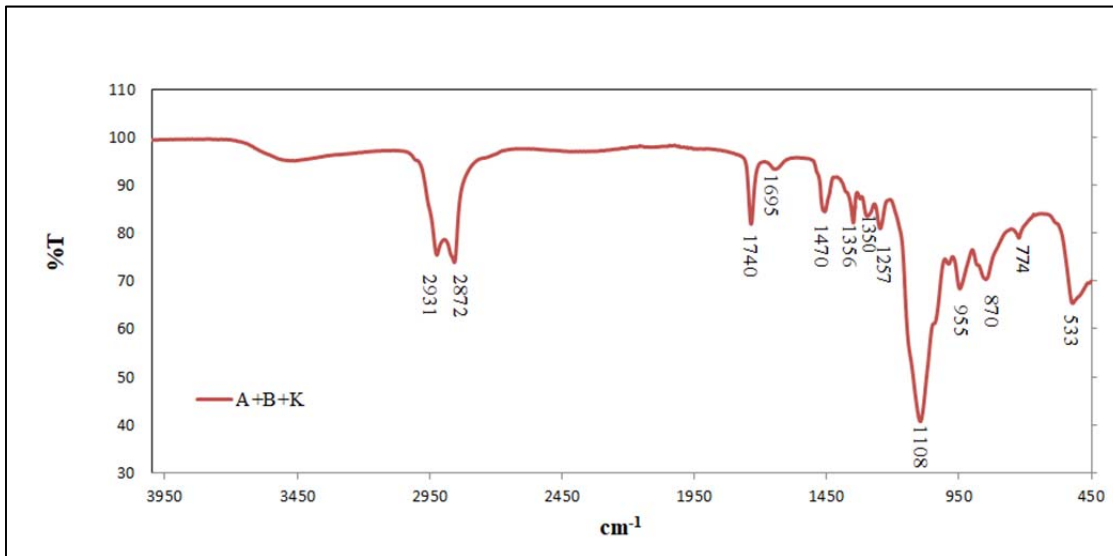
Ampisilin ve bakteri etkileşimi için elde edilen bantlar; 1703, 1089, 886 ve 534 cm^{-1} 'deki dalgaboylarında (Şekil 4.19) bulunmuştur. 1703 cm^{-1} 'deki pik C=O gerilme titreşiminden, 1089 cm^{-1} C-C ve C-O gerilme ve C-N fonksiyonel gruplarındaki değişimlerden, C-H düzlem dışı eğilme 886 cm^{-1} dalga boyundaki piki vermiş olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Ampisilin bakterinin amid bölgesi olarak yorumlanan 1668 ve 1600 cm^{-1} dalga boylarında değişikliğe neden olmuştur. Ayrıca *Salmonella* Typhimurium'da polisakkarit bölgesi olarak yorumlanan 912, 985 ve 1027 cm^{-1} dalga boylarındaki pik oluşumu ampisilin eklenince belirlenememiştir.

Ampisilin ve bakteri ortamına kolesterol eklenince elde edilen spektrum Şekil 4.20'te verilmiştir. Elde edilen pikler; 2931, 2872, 1740, 1695, 1470, 1356, 1350, 1257, 1108, 955, 870, 774 ve 533 cm^{-1} 'deki dalga boylarında elde edilmiştir. 2931 cm^{-1} 'deki pik C-H asimetric gerilme, 2872 cm^{-1} dalga boyundaki pik C-H simetric gerilme, 1740 cm^{-1} C=O gerilme titreşimi, 1695 cm^{-1} C=O eğilme, 1470 cm^{-1} asimetric C-H eğilme, 1356 cm^{-1} 'deki pik C-N gerilme titreşimi, C-C eğilme ve C-O gerilme titreşimleri 1257 ve 1108 cm^{-1} 'deki pikleri, 955 cm^{-1} dalga boyundaki pik C-O gerilme, 870 cm^{-1} C-O-O- gerilme ve 774 cm^{-1} 'deki elde edilen

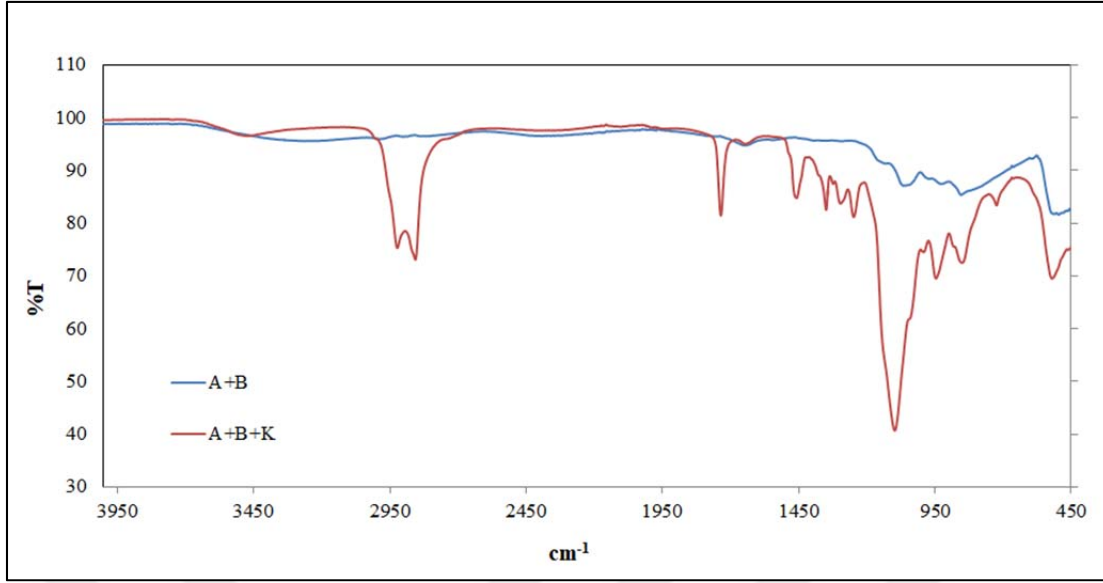
pik ise O-H düzlem dışı eğilme ve C-H düzlem dışı eğilme olarak farklı fonksiyonel gruplar şeklinde tanımlanmıştır (Beşergil, 2019). Şekil 4.21’de kolesterol eklenmiş ve eklenmemiş ortamların FT-IR spektrumu karşılaştırılmalı olarak verilmiştir. Kolesterol eklenmemiş ortamda 4 fonksiyonel grup gözlemlenirken; kolesterol eklenmiş ortamda 12 fonksiyonel grup belirlenmiştir. Antibiyotik ve bakteri içeren ortama kolesterol eklenince, kolesterol olmayan ortamda elde edilen 1703 ve 1089 cm^{-1} dalga boylarındaki piklerde değişim gözlemlenmiştir. Kolesterol içermeyen ortama göre kolesterol içeren ortamda aldehit, keton, aromatik bileşikler, asit halojenler ve alkol gibi farklı fonksiyonel gruplar belirlenmiştir.



Şekil 4.19. Ampisilin ve bakteri etkileşimi FT-IR spektrum A: antibiyotik; B: bakteri



Şekil 4.20. Ampisilin, bakteri ve kolesterol etkileşimi FT-IR spektrumu A: antibiyotik; B: bakteri; K: kolesterol

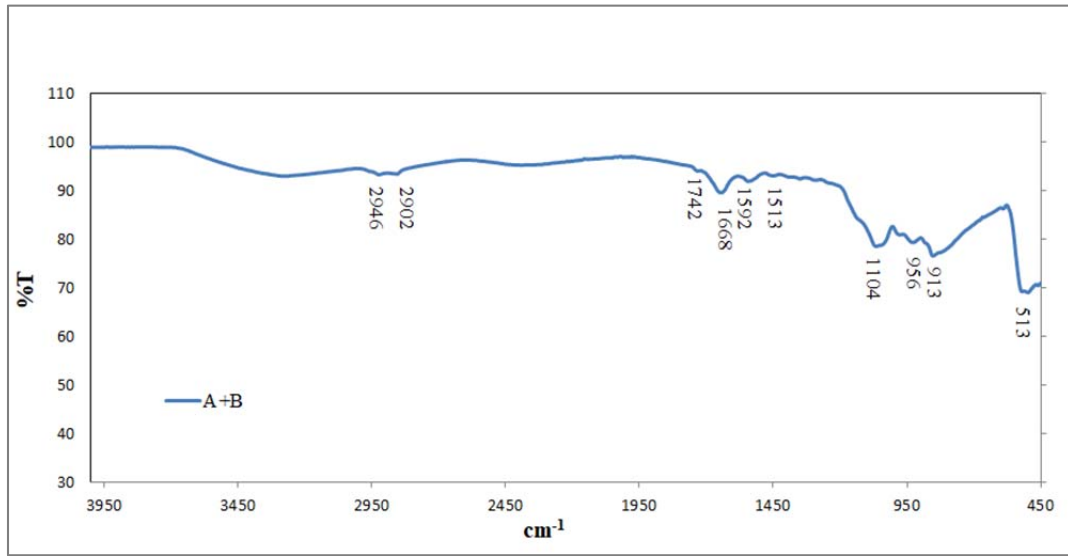


Şekil 4.21. Ampisilin için kolesterol eklenmiş ve eklenmemiş ortamdaki FT-IR spektrumları

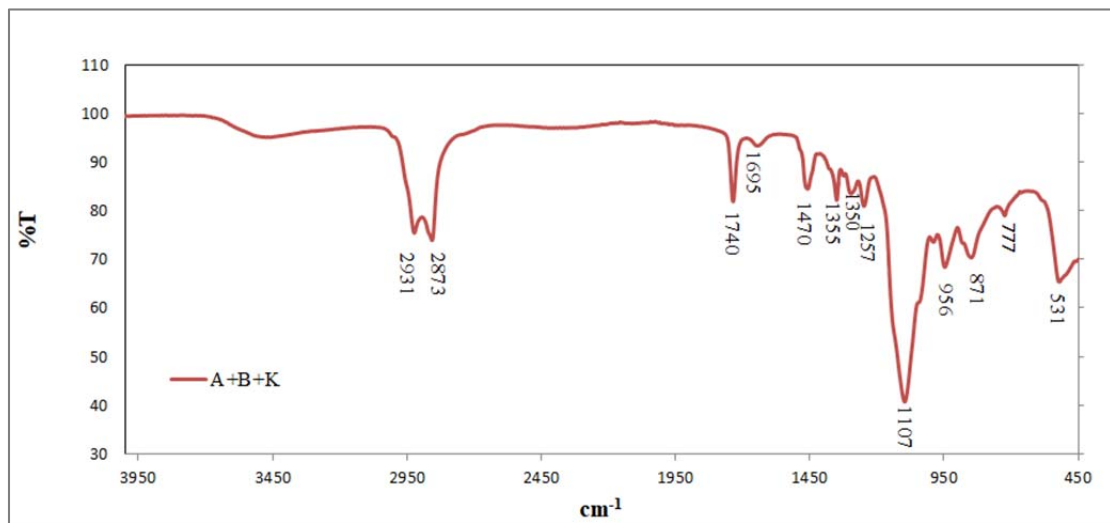
Streptomisin ve bakteri için elde edilen pikler 2946, 2902 1747, 1668, 1592, 1513, 1104, 956, 913, 519 cm^{-1} dalga boyunda (Şekil 4.22) elde edilmiştir. 2946 ve 2902 cm^{-1} 'deki pikler; O-H ve C-H gerilmesi, 1747 cm^{-1} 'de C=O gerilme titreşimi, 1668 cm^{-1} 'deki dalga boyu C=C ve C=O gerilmesi ve C-C vibrasyonu, 1592 cm^{-1} ise C=O gerilme titreşiminden , C-C vibrasyonu ve N-H eğilmesi ve 1513 cm^{-1} 'deki pik ise C-C vibrasyonu olarak belirlenmiştir. 1104 cm^{-1} 'deki pik; C-C eğilme ve C-O gerilme, 956 cm^{-1} dalga boyundaki pik O-H eğilme ve 913 cm^{-1} 'de ise C-H düzlem dışı eğilme fonksiyonel gruplarındaki değişimler olarak belirlenmiştir. Streptomisinin *Salmonella* Typhimurium üzerine etkisi incelendiğinde; bakterinin belirlenen amid bölgesindeki bant yapısında bir değişikliğe neden olmamıştır. 2946 ve 2902 cm^{-1} dalga boylarındaki pikler oluşmuştur ve bu dalga boylarında yeni fonksiyonel gruplar tanımlanmıştır. Ancak polisakkarit bölgesi olarak belirlenen 1091 ve 912 cm^{-1} 'deki dalga boylarında antibiyotik eklendikten sonra değişim gözlemlenmiştir.

Streptomisin ve bakteri ortamına kolesterol eklenince elde edilen elde edilen spektrumlar Şekil 4.23'te verilmiştir. Elde edilen pikler; 2931, 2873, 1740, 1695, 1470, 1355, 1350, 1257, 1107, 956, 871, 777 ve 531 cm^{-1} 'deki dalga boylarında elde edilmiştir. 2931 cm^{-1} 'deki pik C-H asimetric gerilme, 2873 cm^{-1} dalga boyundaki pik C-H simetric gerilme, 1740 cm^{-1} C=O gerilme titreşimi, 1695 cm^{-1} C=O eğilme, 1470 cm^{-1} asimetric C-H eğilme, 1355 cm^{-1} 'deki pik C-N gerilme titreşimi, C-C eğilme ve C-O gerilme titreşimleri 1257 ve 1107 cm^{-1} 'deki pikleri , 955 cm^{-1} dalga boyundaki pik C-O gerilme, 871 cm^{-1} C-O-O- gerilme ve 771 ve 531 cm^{-1} 'de elde edilen pik ise O-H düzlem dışı eğilme ve C-H düzlem dışı eğilme olarak farklı

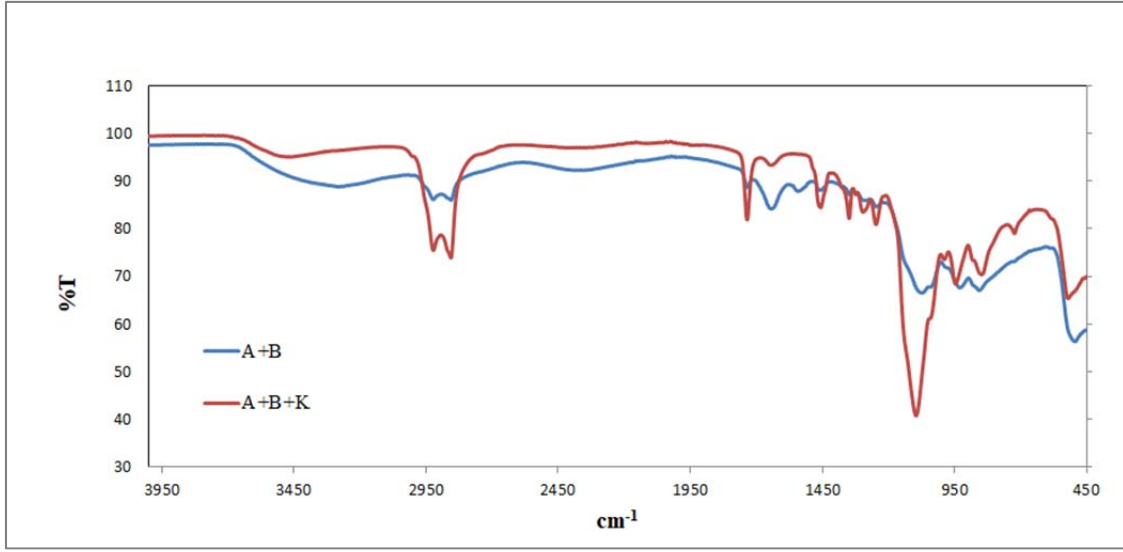
fonksiyonel gruplar şeklinde yorumlanmıştır (Beşergil, 2019). Kolesterol eklenmemiş ortamda 10 fonksiyonel grup gözlemlenirken; kolesterol eklenmiş ortamda 12 fonksiyonel grup belirlenmiştir. 1668, 1592, 1513 ve 913 cm^{-1} dalga boylarında belirlenen piklerdeki fonksiyonel gruplarda değişikliğe neden olmuştur. Kolesterolü ortamda gözlenemeyen alkol ve aromatik bileşikler gibi fonksiyonel gruplar kolesterol varlığında belirlenmiştir. Şekil 4.24'te kolesterol eklenmiş ve eklenmemiş ortamların FT-IR spektrumu karşılaştırılmalı olarak verilmiştir.



Şekil 4.22. Streptomisin ve bakteri etkileşimi FT-IR spektrumu A: antibiyotik; B: bakteri



Şekil 4.23. Streptomisin, bakteri ve kolesterol etkileşimi FT-IR spektrumu A: antibiyotik; B: bakteri; K: kolesterol

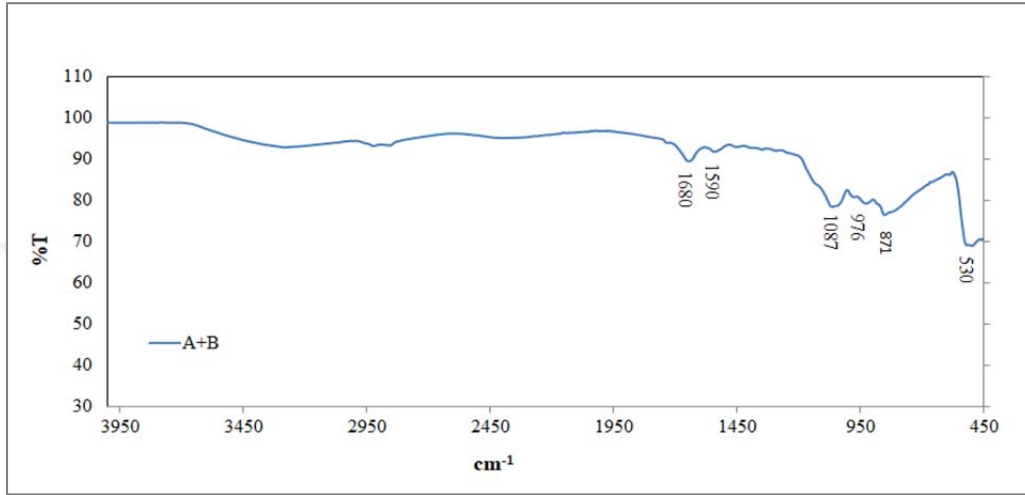


Şekil 4.24. Streptomisin için kolesterol eklenmiş ve eklenmemiş ortamdaki FT-IR spektrumları

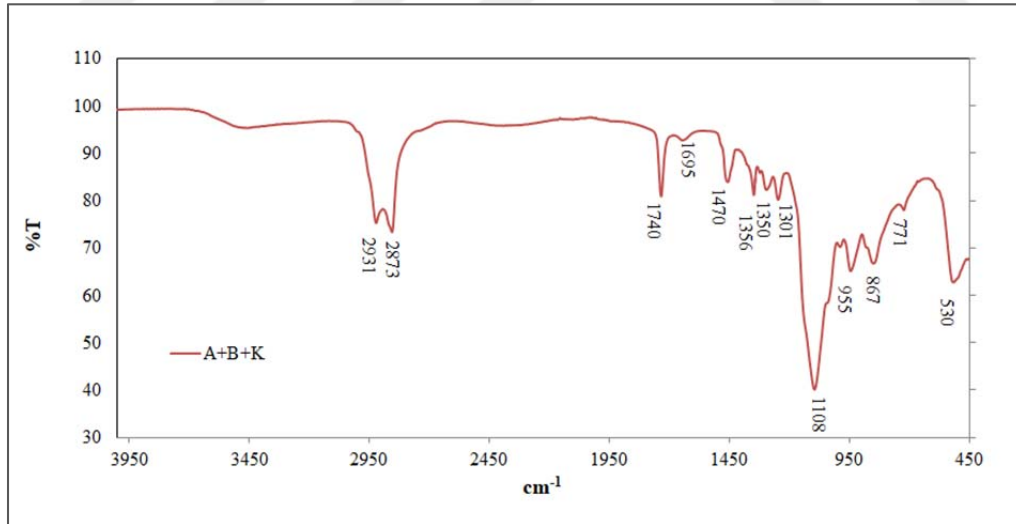
Siprofloksazin ve bakteri etkileşimi sonucu oluşan pikler ise; 1680, 1590, 1087, 976, 871 ve 530 cm^{-1} 'de (Şekil 4.25) elde edilmiştir. 1680 cm^{-1} dalga boyundaki pik C-C vibrasyonu, C=C, C=O fonksiyonel gruplarındaki gerilmelere karşılık olarak tanımlanmıştır. 1590 cm^{-1} 'deki pik N-H eğilme ve C-C vibrasyon olarak, 1087 cm^{-1} 'deki pik C-O ve C-N gerilme, 976 cm^{-1} C-O gerilme ve 871 cm^{-1} 'deki pik ise C-O-O- gerilme olarak tanımlanmıştır. Siprofloksazinin *Salmonella* Typhimurium, üzerine etkisi incelendiğinde; daha çok polisakkarit bölgesi olarak yorumlanan bant aralıklarında değişime neden olmuştur. Amid bölgesi olarak yorumlanan 1668 ve 1600 cm^{-1} dalga boylarında çok fazla bir değişim gözlemlenmemiştir.

Siprofloksazin ve bakteri ortamına kolesterol eklenince elde edilen elde edilen spektrumlar Şekil 4.26'te verilmiştir. Elde edilen pikler; 2931, 2873, 1740, 1695, 1470, 1356, 1350, 1301, 1108, 955, 867, 771 ve 530 cm^{-1} 'deki dalga boylarında elde edilmiştir. 2931 cm^{-1} 'deki pik C-H asimetrik gerilme, 2873 cm^{-1} dalga boyundaki pik C-H simetrik gerilme, 1740 cm^{-1} C=O gerilme titreşimi, 1695 cm^{-1} C=O eğilme, 1470 cm^{-1} asimetrik C-H eğilme, 1356 ve 1350 cm^{-1} 'deki pikler C-N gerilme titreşimi, 1301 cm^{-1} dalga boyundaki pik C-H düzlem içi eğilme, C-C gerilme ve vibrasyonu, C-C eğilme ve C-O gerilme titreşimleri 1108 cm^{-1} 'deki pikleri, 955 cm^{-1} dalga boyundaki pik C-O gerilme, 867 cm^{-1} C-O-O- gerilme ve 771 cm^{-1} 'de elde edilen pik ise O-H düzlem dışı eğilme ve C-H düzlem dışı eğilme olarak farklı fonksiyonel gruplar şeklinde tanımlanmıştır (Beşergil, 2019). Şekil 4.27'de kolesterol eklenmiş ve eklenmemiş ortamların FT-IR spektrumu karşılaştırılmalı olarak verilmiştir. Kolesterol eklenmemiş

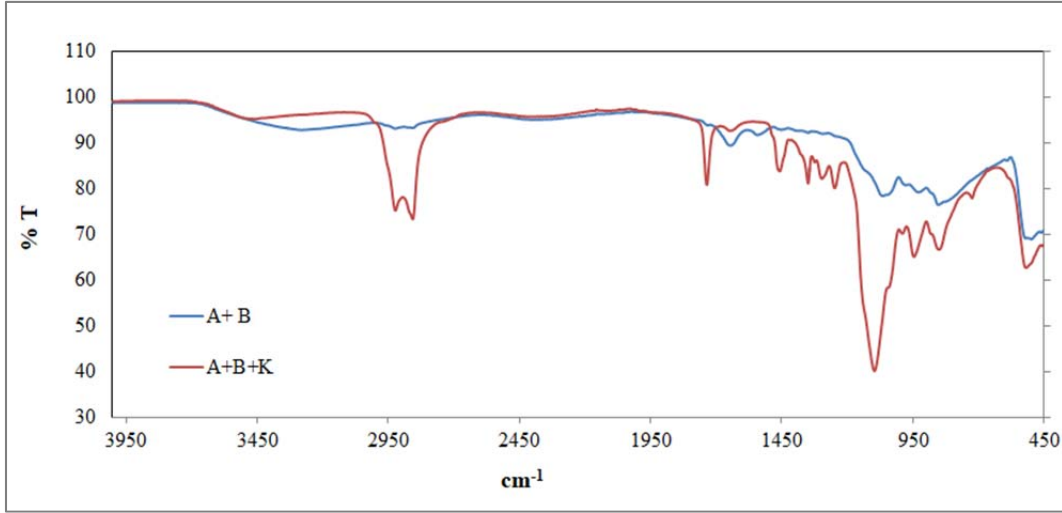
ortamda 6 fonksiyonel grup gözlemlenirken; kolesterol eklenmiş ortamda 12 fonksiyonel grup belirlenmiştir. Kolesterol eklenmeden önce 1680,1590 ve 1087 cm^{-1} dalga boylarındaki pikler kolesterol eklendikten sonra gözlemlenmemiştir. Farklı dalga boylarında yeni fonksiyonel gruplar belirlenmiştir. Diğer antibiyotik, bakteri ve kolesterol etkileşimlerinde olduğu gibi aromatik bileşikler, aldehit, keton, alkoller ve asit halojen grupları gözlemlenmiştir.



Şekil 4.25. Siprofloksazin ve bakteri etkileşimi FT-IR spektrumu A: antibiyotik; B: bakteri



Şekil 4.26. Siprofloksazin, bakteri ve kolesterol etkileşimi FT-IR spektrumu A: antibiyotik; B: bakteri; K: kolesterol

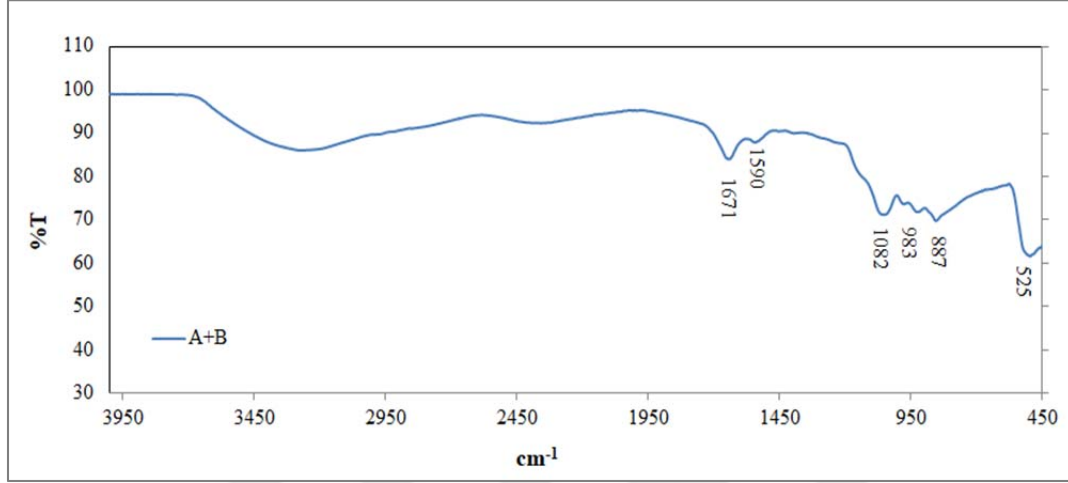


Şekil 4.27. Siprofloksazın için kolesterol eklenmiş ve eklenmemiş ortamdaki FT-IR spektrumları

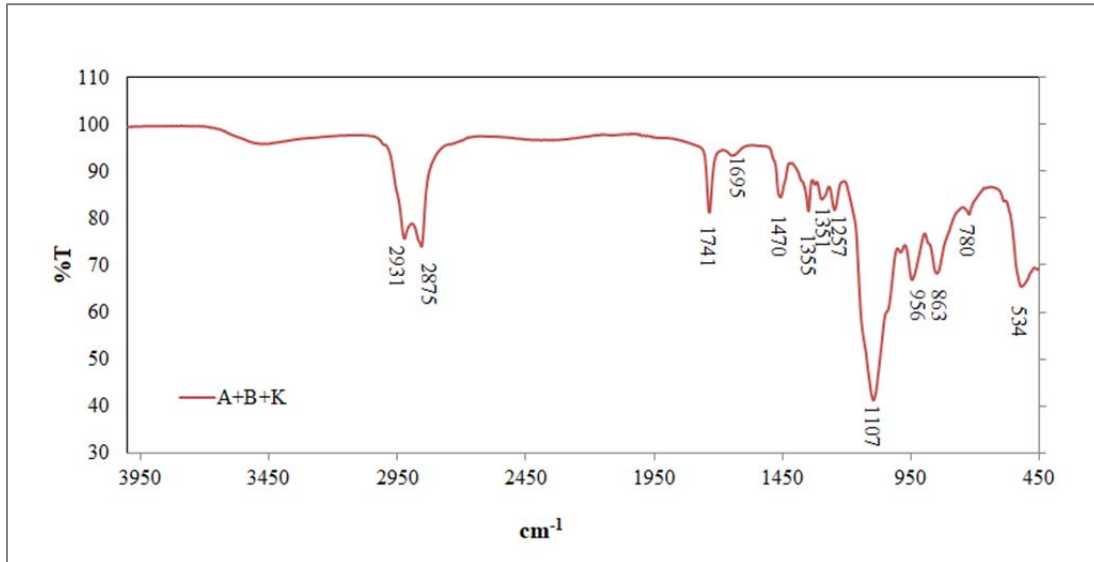
Trimetoprim/sülfametoksazol ve bakteri etkileşimi için elde edilen spektrumlar Şekil 4.28’de verilmiştir. Elde edilen spektrum incelendiğinde 1671, 1590, 1082, 983, 887 ve 525 cm^{-1} ’dalga boylarındaki pikler olduğu görülmektedir. 1671 cm^{-1} ’deki pik C=C ve C=O fonksiyonel gruplarındaki gerilme, 1590 cm^{-1} dalga boyundaki pik N-H eğilme ve C-C vibrasyon, 1082 cm^{-1} ’deki pik C-O ve C-N gerilme, 983 cm^{-1} ’de elde edilen pik C-O gerilme ve 887 cm^{-1} ’deki pik ise C-H düzlem dışı eğilme ve C-O-O- gerilme olarak tanımlanmıştır. Trimetoprim/sülfametoksazolun *Salmonella* Typhimurium üzerine etkisi incelendiğinde; daha çok polisakkarit bölgesi olarak yorumlanan 1027,985 ve 912 cm^{-1} dalga boylarının olduğu pik aralıklarında değişime neden olmuştur.

Trimetoprim/sülfametoksazol ve bakteri ortamına kolesterol eklenince elde edilen elde edilen spektrumlar Şekil 4.29’da verilmiştir. Elde edilen pikler; 2931, 2874,1741,1695, 1470, 1355, 1351, 1257, 1107, 956, 863, 780 ve 534 cm^{-1} ’deki dalga boylarında elde edilmiştir. 2931 cm^{-1} ’deki pik C-H asimetric gerilme, 2874 cm^{-1} dalga boyundaki pik C-H simetric gerilme, 1741 cm^{-1} C=O gerilme titreşimi, 1695 cm^{-1} C=O eğilme, 1470 cm^{-1} asimetric C-H eğilme, 1355 cm^{-1} ve 1351 cm^{-1} ’deki pik C-N gerilme titreşimi, 1257 cm^{-1} dalga boyundaki pik C-C eğilme ve C-O gerilme titreşimleri ,C-C gerilme ve vibrasyonu , C-C eğilme ve C-O gerilme titreşimleri 1107 cm^{-1} ’deki pikleri , 956 cm^{-1} dalga boyundaki pik C-O gerilme, 863 cm^{-1} C-O-O- gerilme ve 780 cm^{-1} ’de elde edilen pik ise O-H düzlem dışı eğilme ve C-H düzlem dışı eğilme olarak farklı fonksiyonel gruplar şeklinde tanımlanmıştır (Beşergil, 2019). Şekil 4.30’da kolesterol eklenmiş ve eklenmemiş ortamların FT-IR spektrumu karşılaştırılmalı

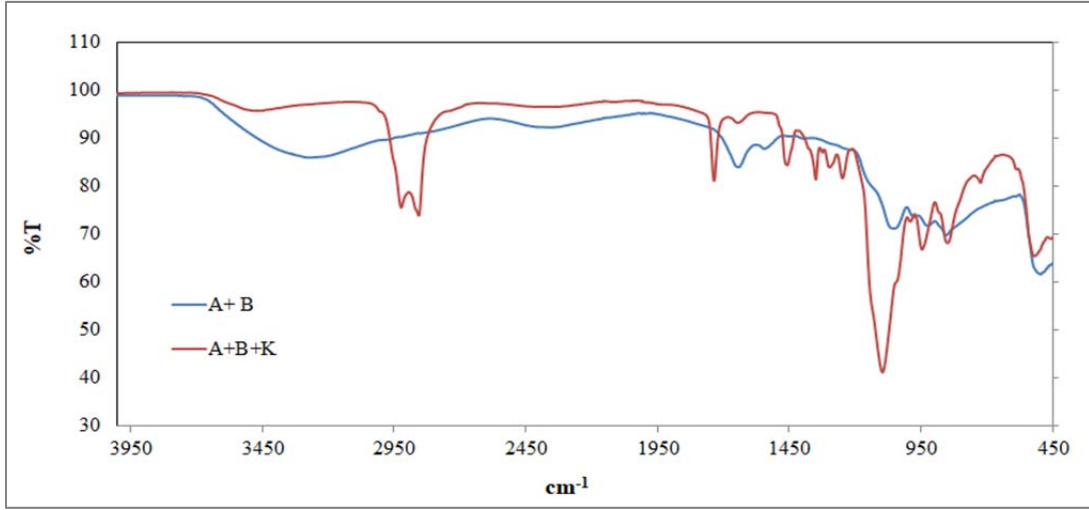
olarak verilmiştir. Kolesterol eklenmemiş ortamda 6 fonksiyonel grup gözlemlenirken; kolesterol eklenmiş ortamda 12 fonksiyonel grup belirlenmiştir. Kolesterol eklendikten sonra farklı bant aralıklarında pikler gözlemlenmiştir. Kolesterol­süz ortamda gözlenemeyen alkol, aldehit, keton ve aromatik bileşikler gibi fonksiyonel gruplar kolesterol varlığında belirlenmiştir.



Şekil 4.28. Trimetoprim/sülfametoksazol ve bakteri etkileşimi FT-IR spektrumu. A: antibiyotik; B: bakteri



Şekil 4.29. Trimetoprim/sülfametoksazol, bakteri ve kolesterol etkileşimi FT-IR spektrumu
A: antibiyotik; B: bakteri; K: kolesterol



Şekil 4.30. Trimetoprim/sülfametoksazol için kolesterol eklenmiş ve eklenmemiş ortamdaki FT-IR spektrumlar

5. SONUÇLAR

Kolesterolün antibiyotik dirençli *Salmonella* Typhimurium bakterisinin farklı antibiyotiklere ve konsantrasyonlarına karşı dirençliliği üzerine olan etkisi disk difüzyon yöntemi ile kolesterolün antibiyotikler ile birlikte *Salmonella* Typhimurium'un moleküler yapısında ve fonksiyonel gruplarında meydana getirdiği değişimler ise FT-IR spektroskopi yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

- *Salmonella* Typhimurium suşunun antibiyotik direnç profili, disk difüzyon yöntemi ile belirlenerek suşun ampisilin, streptomisin, sulfametoksazol/trimetoprim, siprofloksazin, tetrasiklin, kloramfenikol ve gentamisine duyarlı; penisilin ve vankomisine karşı dirençli olduğu gözlemlenmiştir.
- Toz antibiyotiklerin MİK değerleri agar-disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Çalışmada ampisilin, streptomisin, siprofloksazin ve sülfametoksazol/ trimetoprim toz antibiyotikleri kullanılmıştır. Ampisilin için; 128-0.25 mg/L konsantrasyon aralığında MİK değeri 16 mg/L, streptomisin için 128 mg/L, siprofloksazin için 0.25 mg/L ve sülfametoksazol/trimetoprim için ise 16 mg/L olarak belirlenmiştir.
- MİK değerinin belirlenmesinde ayrıca tüp dilüsyon yöntemi de uygulanmıştır. Çalışmada uygulanan tüp dilüsyon yönteminin sonuçları agar disk difüzyon yönteminde belirlenen MİK değerleri ile paralellik göstermiştir.
- Kolesterol varlığının ve miktarının bakterilerin dirençlilik profillerine etkisi öncelikle disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Bakteri ve antibiyotik etkileşimin olduğu ortama kolesterol eklenince MİK değerlerinde kolesterol olmayan ortama göre artış gözlemlenmiştir. Ayrıca kolesterol olmayan ortama göre inhibisyon zon çaplarında azalmalar belirlenmiştir.
- Kolesterol içeren bakteri ve antibiyotik ortamındaki MİK değerlerindeki artış ve inhibisyon zon çaplarındaki azalış; kolesterolün *Salmonella* Typhimurium'un ampisilin, streptomisin, siprofloksazin ve sülfametoksazol/ trimetoprim karşı olan duyarlılığında azalmaya neden olabilecek yani dirençliliğini artırabilecek antagonistik bir etkiye sahip olabileceği şeklinde belirlenmiştir.

- Kolesterolün antibiyotikler ile birlikte *Salmonella* Typhimurium'un yapısında meydana getirdiği değişimler ve antibiyotiklerin bakteriler üzerine etkisinin incelendiği FT-IR spektroskopi yönteminde; streptomisin, trimetoprim/sülfametoksazol ve siprofloksazin genel olarak bakterinin hücre duvarı sentezi ve lipopolisakkarit dış membrandaki polisakkarit bölgesi olarak yorumlanan dalga boylarındaki piklerde değişikliğe neden olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Ampisilin ise diğer antibiyotiklerden farklı olarak bakterinin hücre duvarı sentezi bileşeni olan peptidoglikan sentezinde yer alan proteinin sentezindeki amino asitlerinin yapısındaki amid bölgesinde gözlemlenen dalga boylarında değişikliğe neden olmuş olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.
- Kolesterol içeren ortam ise kolesterol olmayan ortamda elde edilen bazı dalga boylarında değişikliğe neden olmuştur. Farklı dalga boylarında tanımlanan yeni fonksiyonel grupların oluşumu gözlemlenmiştir Genel olarak kolesterolsüz ortamda gözlenmeyen alkol ve aromatik bileşikler gibi fonksiyonel gruplar kolesterol varlığında belirlenmiştir.
- Kolesterolün *Salmonella* Typhimurium'un antibiyotik dirençliliği üzerine etkisinin belirlendiği bu çalışmada kolesterolün bakterinin antibiyotik dirençliliğinde artışa neden olduğu saptanmıştır.
- Bakterilerin antibiyotiklere karşı göstermiş oldukları direncin artmasından dolayı bakteriyel enfeksiyonların tedavisi için yeni ilaçlar ve etkili tekniklerin geliştirilmesi giderek daha gerekli hale gelmektedir. Çalışmamızda kolesterolün *Salmonella* Typhimurium'un antibiyotik dirençliliği üzerine olan etkisi antibiyotikler ile birlikte sinerjik bir etki olarak belirlenememiş olsa bile bakterilerin çok çeşitli direnç mekanizmalarına karşı gösterdikleri bu direnci engelleme kapasitesine sahip aktivite değiştirici maddelerin bulunması ve bunların antibiyotiklerle birlikte yeni ilaç formülasyonlarında kullanılma potansiyeli açısından araştırılması oldukça önemlidir.

KAYNAKLAR

- Abatcha, G., Kaur, G., and Thong, L. (2014). Review Article: A trends of *Salmonella* and antibiotic resistance. *Advances in Life Science and Technology*, 17, 9–21. <http://iiste.org/Journals/index.php/ALST/article/view/10821>.
- Alcaine, S.D., Warnick, L.D., and Wiedmann, M. (2016). Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella*. *Journal of Food Protection*, 70, 780–90.
- Almeida, F., Seribelli, A.A., Medeiros, M.I.C., Rodrigues, D.D.P., De MelloVarani, A., Luo, Y., Allard, M.W., Falcão, J.P. (2018). Phylogenetic and antimicrobial resistance gene analysis of *Salmonella* Typhimurium strains isolated in Brazil by whole genome sequencing. *PubMed Central*, 83, 1–16.
- Andrade, J.C., Morais-Braga, M.F., Guedes, G.M., Tintino, S.R., Freitas, M.A., Menezes, I.R., Coutinho, H.D. (2014). Enhancement of the antibiotic activity of aminoglycosides by alpha-tocopherol and other cholesterol derivates. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 68, 1065–69.
- Angulo, F.J., Johnson, K.R., Tauxe, R.V., ve Cohen, M.L. (2000). Origins and consequences of antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella*: implications for the use of fluoroquinolones in food animals. *Microbial Drug Resistance*, 6, 77–83.
- Arakawa, Y., Murakami, M., Suzuki, K., Ito, H., Wacharotayankun, R., Ohsuka, S., Kato, N., Ohta, M. A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39, 1612-1615.
- Aslam, M., Checkley S., Avery B., Chalmers G., Bohaychuk V., Gensler G., Reid-Smith R., Boerlin, P. (2012). Phenotypic and genetic characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella* serovars isolated from retail meats in Alberta, Canada. *Food Microbiology*, 32, 110-117.
- Babakhani, S. ve Oloomi, M. (2018). Transposons: The agents of antibiotic resistance in bacteria. *Journal of Basic Microbiology*, 58, 905–17.
- Banerjee, K., Sekar, P., Krishnan, P., Wattam, A.R., Roy, S., Hays, J.P., Menezes, G.A. (2018). Whole genome sequence analysis of NDM-1, CMY-4, and SHV-12 coproducing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from a case of fatal burn wound infection. *Infection and Drug Resistance*, 2491–95.

- Basri, D. F., Mahyudin, N.A., Thung, T.Y. (2016). Prevalence and antibiotic resistance of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium in raw chicken meat at retail markets in malaysia. *Poultry Science*, 95, 1888–93.
- Bengtsson-Palme, J. (2017). Antibiotic resistance in the food supply chain: where can sequencing and metagenomics aid risk assessment?. *Current Opinion in Food Science*, 14, 66–71.
- Bergogne-Bérézin, E. (1997) Who or What is the source of antibiotic resistance?. *Journal of Medical Microbiology*, 46, 461–470.
- Beşergil, B. (2019, 10 Mayıs). IR Spektrumlar; Organik Fonksiyonel Grupların Tanımlanması. Erişim adresi: http://bilsenbesergil.blogspot.com/p/blog-page_586.html.
- Black, J. G. (2008). Microbiology: Principles and explorations. ISBN: 978-1-118-91458-8.
- Blake, D.P., Hillman, K., Fenlon, D.R., Low, J.C. (2003). Transfer of antibiotic resistance between commensal and pathogenic members of the Enterobacteriaceae under ileal conditions. *Journal of Applied. Microbiology*, 95, 428 – 436.
- Bogaard, .AE., Stobberingh, E.E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14, 327-35.
- Bradford, P.A. (2001). Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 933-951.
- Calderon, C. B. ve Sabundayo, B. P. (2007). Antimicrobial classifications: Drugs for bugs *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*. ISBN 978-0-8247-4100-6.
- Callaway, T. R., Edrington, T. S., Anderson, R. C., Byrd, J. A., Nisbet, D. J. (2008). Gastrointestinal microbial ecology and the safety of our food supply as related to *Salmonella*. *Journal of animal science*, 86, 163-72.
- Canton, M., Onofre, S.B. (2010). Interference from extract of *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae, on the activity of antibiotics used in clinic. *Public Health Research*, 20, 348–54.
- Carrasco, E., Morales-Rueda, A., ve Garc’ia-Gimeno, R. M. (2012) Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: a review. *Food Research International*, 2, 545–556.

- Chen, Stephanie. (2019). Identification of the enteric organism *Salmonella* Typhimurium.
<http://static1.squarespace.com/static/547fe1dbe4b0a782f71f75ef/t/54e2893ae4b0406fb3dffb4/1424132410535/Microbiology.pdf>
- Cloeckaert, A., Chaslus-dancla, E. (2001). Mechanisms of quinolone resistance in *Salmonella*. *Veterinary Research, Biomedical Central*, 32, 291–300.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. (2016). *CLSI supplement M100S*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Codex Alimentarius Commission. (2011). Guidelines for risk analysis of foodborne antimicrobial resistance. *Food and Agriculture Organization of the United Nations & World Health Organization*.
- Cui, M., Zhang, J., Zhang, C., Li, R., Chan, E.W., Wu, C., Chen, S. (2017). Distinct mechanisms of acquisition of mcr-1 -bearing plasmid by *Salmonella* strains recovered from animals and food samples. *Scientific Reports*, 7, 1–9.
- Da Costa, P. M., Loureiro, L., ve Matos, A. J. F. (2013). Transfer of multi-drug resistant bacteria between in termingled ecological niches: the interface between humans, animals and the environment. *International Journal of Environmental Research Public Health*, 10, 278–294. doi: 10.3390/ijerph10010278
- Davis, R. (2015). Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy : A Rapid tool for detection and analysis of foodborne pathogenic bacteria Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy.
- Duygu, D., Baykal, T., Açıkgöz, İ., ve Yıldız K. (2009). Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy for biological studies. *Journal of Science*, 22, 117–21.
- Dzidic, S., Suskovic, J., ve Kos, B. (2008). Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Biochemical and genetic aspects. *Food Technology and Biotechnology*, 46, 11–21.
- Ejo, M., Garedew, L., Alebachew, Z., ve Worku, W. (2016). Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from animal-origin food items in Gondar, Ethiopia . *Biomedicine Research International*, 1–8.
- El-Sharkawy, H., Tahoun, A., El-Gohary, A., El-Abasy, M., El-Khayat, F., Gillespie, T., Kitade, Y., Hafez, M., Neubauer, H., ve El-Adawy. (2017). Epidemiological, molecular characterization and antibiotic resistance of *Salmonella* enterica serovars isolated from chicken farms in Egypt. *Gut Pathogens*, 9, 1–12.

- Elumba, Z.S., Allera, M.L., ve Taganas, R.R. (2018). Occurrence and antibiotic sensitivity of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in retail chicken meat at selected Mmarkets in Valencia City, Bukidnon, Philippines. *Asian Journal of Biological and Life Sciences*, 7, 53–58.
- Etebu, E., ve Ariekpar, I. (1997). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research*, 96, 535–41.
- Faldynova, M., Pravcova, M., Sisak, F., Havlickova, H., Kolackova, I., Cizek, A., Karpiskova, R., Rychlik, I. (2005). Evolution of antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains isolated in the Czech Republic between 1984 and 2002. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, 2002–5.
- Fallah, S.H., Asgharpour, F., Naderian, Z., ve Moulana, Z. (2015). Isolation and determination of antibiotic resistance patterns in non-typhoid *Salmonella* spp. isolated from chicken. *International Journal of Enteric Pathogens*, 1, 17–21.
- Frezard, F., Schettini, D.A. (2005) Liposomes: Physicochemical and pharmacological properties, applications in antimony-based chemotherapy. *Química Nova*, 28, 511–518.
- Gal-Mor, O., Boyle, E.C., ve Grassl, G.A. (2014). Same species different diseases: How and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. *Frontiers in Microbiology*, 5, 1–10.
- Giraud, E., Cloeckert, A., Kerboeuf, D., Chaslus-Dancla, E. (2000) Evidence for active efflux as the primary mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 44, 1223–1228.
- Goodacre, R., Timmins, E.M., Rooney, P.J., Rowland, J.J., Kell, D.B. (1996). Rapid identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* species using diffuse reflectance absorbance Fourier transform infrared spectroscopy and artificial neural networks. *FEMS Microbiology Letters*, 140, 233–9.
- Gossman, D. (2019, 10 Mayıs). How does Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy work? Erişim adresi: <https://www.gossmanforensics.com/pdf-library/pdf-analytical-methods/fourier-transform-infrared>.
- Guerra, B., Soto, S., Helmuth, R., ve Mendoza, M.C. (2002). Characterization of a self-transferable plasmid from *Salmonella enterica* serotype Typhimurium clinical isolates carrying two integron-borne gene cassettes together with virulence and drug resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, 2977–81.

- Gupta, U., Singh, V.K., Kumar, K. ve Khajuria, Y. (2014). Spectroscopic studies of cholesterol: Fourier Transform Infra-Red and vibrational frequency analysis. *American Scientific Publishers*, 3, 211–17.
- Habrun, B., Šimpraga, B., Kompes, G. and Krstulovi F. (2012). Antimicrobial resistance and serotyping of *Salmonella enterica* subsp . Enterica isolated from poultry in Croatia. *Veterinary Archives*, 82, 371–81.
- Helm, D., Labischinski, H., Schallehn, G., Naumann, D. (1991). Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Journal of General Microbiology*, 137, 69-79.
- Heuer, O. E., Agersø, Y., Emborg, H. D., Seyfarth, A. M., Jensen, U.S., Hammerum, A. M., Muller, A., Skov, R. L., Monnet, D. L. Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme (Danmap) (2006). Erişim adresi: www.danmap.org
- Hurley, D., McCusker, M.P., Fanning, S. ve Martins, M. (2014). *Salmonella*-host interactions modulation of the host innate immune system. *Frontiers in Immunology*, 5, 481.
- Kaufman, G. (2013). Antibiotics: Mode of action and mechanisms of resistance. *Nursing Standard*, 25, 49–55.
- Kemboi, W.K., Raphael, W., ve Ramesh, F. (2014). Horizontal gene transfer of drug resistance genes between *Salmonella* and *Escherichia*. *International Journal of Bioassays*, 3066–72.
- Khan, S.B., Khan, M.A., Ahmad, I., Ur Rehman, T., Ullah, S., Dad, R., Sultan, A., Memon, A.M. (2019). Phenotypic, genotypic antimicrobial resistance and pathogenicity of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis in poultry and poultry products. *Microbial Pathogenesis*, 129, 118–24.
- Kim, S., Reuhs, B.L. ve Mauer, L. J. 2005. Use of Fourier Transform Infrared Spectra of crude bacterial lipopolysaccharides and chemometrics for differentiation of *Salmonella enterica* serotypes. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 411–17.
- Kuang, D., Zhang, J., Xu, X., Shi, W., Chen, S., Yang, X., Su, X., Shi, X., Meng, J. (2018). Emerging high-level ciprofloxacin resistance and molecular basis of resistance in *Salmonella enterica* from humans , food and animals. *International Journal of Food Microbiology*, 280, 1–9.

- Larry, D., Hanke, P.E. (2014). Handbook of analytical methods for materials Fourier Transform-Infrared Spectroscopy. *Materials Evaluation and Engineering, Inc* , 19–20.
- Leanca, C.C., Passarelli, M., Nakandakare, E.R., Quintão, E.C.R. (2010) HDL: the yin-yang of cardiovascular disease. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*, 54, 777–84.
- Lee, G. M., Bishop, L. and Bishop, P. (2009). Microbiology and infection control for health professionals. *Pearson Education Australia Levesque*, 39,185-191.
- Li, X.Z. (2005). Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid mediated mechanisms. *International. Journal of Antimicrobial Agents*, 25,453-463.
- Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L.F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J. H., Shen, J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism mcr1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infectious. Diseases*, 16, 161–168.
- López, F. E., María de las M. P., Roberto M. ve Mónica, A. D. (2012). *Salmonella* Typhimurium general virulence factors: A Battle of David against Goliath *Food Research International*, 45, 842–51.
- Ludke, M.C.M.M., Lo'pez, J.(1999). *Fatty Acids Concentration and Level of Cholesterol In Diets For Humans and Present In Swine Carcasses. Ciencia Rural*, 29, 181–7.
- Mąka, Ł. and Magdalena, P. (2016). Antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. isolated from food. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, 67, 343–58.
- Maquelin, K., Kirschner, C., Choo-Smith, L. P., Ngo-Thi, N. A., Bruining, H. A., Naumann, D., and Puppels, G. J. (2003). Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 324-329.
- Marshall, B. M., ve Levy, S. B. (2011). Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clinical. Microbiology Review*, 24, 718–733.
- Martinez, N., Mendoza, M. C., Guerra, B., Gonzalez-Hevia, M. A. ve Rodicio, M. R. (2005). Genetic basis of antimicrobial drug resistance in clinical isolates of *Salmonella* enterica serotype Hadar from a Spanish region. *Microbial Drug Resistant*, 11, 185-193.
- Mascaretti, O. A. (2003). Bacteria versus antimicrobial agents: An Integrated Approach. *American Society For Microbiology*. doi: 10.1128/9781555817794

- McGee, D. J., George, A. E., Trainor, E. A., Horton, K. E., Hildebrandt, E., Testerman, T. L. (2011). Cholesterol enhances *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics and LL-37. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55, 2897–2904.
- Naumann, D. (1998). In: J. A. De Haseth (ed): Fourier Spectroscopy: 11. International Conference AIP Conference Proceeding 430, (96109). Woodbury, New York.
- O'Bryan, C. A., Crandall, P. G. ve Rieke, S.C. (2017). Antimicrobial resistance in foodborne pathogens. *Food and Feed Safety Systems and Analysis*, 4, 99–115.
- Naumann, D., Helm, D., Labischinski, H. ve Giesbrecht, P. (1991b) The characterization of micro-organisms by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). In *Modern Techniques for Rapid Microbiological Analysis* ed. Nelson, 43–96.
- Naumann, D., Helm, D., ve Labischinski, H. (1991a). Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature, International Journal of Science*, 351, 81-82.
- O'Neill, Jim. (2014) Antimicrobial resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Review on Antibiotic Resistance*.
- Ribot, E. M., Wierzbza, R. K., Angulo, F. J. ve Barrett, T. J. (2002). *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 isolated from humans, United States, 1985, 1990, and 1995. *Emerging Infectious Diseases*, 8, 387–391.
- Roca, I., Akova, M., Baquero, F., Carlet, J., Cavaleri, M., Coenen, S., Cohen, J., Findlay, D., Gyssens, I., Heuer, O. E., Kahlmeter, G., Kruse, H., Laxminarayan, R., Liébana, E., López-Cerero, L., MacGowan, A., Martins, M., Rodríguez-Baño, J., Rolain, J. M., Segovia, C., Sigauque, B., Tacconelli, E., Wellington, E., Vila, J. (2015). The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New Microbes and New Infections*, 22–29.
- San Martín, B., Lapierre, L., Cornejo, J. ve Bucarey, S. (2008). Characterization of antibiotic resistance genes linked to class 1 and 2 integrons in strains of *Salmonella* spp. isolated from swine. *Canadian Journal of Microbiology*, 54, 569–76.
- Scallan, E. (2011). Foodborne illness acquired in the United States major pathogens. *Emerging. Infectious Diseases*, 17, 7–15.
- Schultz, C., ve Naumann, D. (1991). In vivo study of the state of order of the membranes of gram-negative bacteria by FT-IR spectroscopy. *Febs Letters*, 294, 43-46.

- Thai, T.H., Hirai, T., Lan, N.T., Shimada, A., Ngoc P.T., Yamaguchi, R. (2012) Antimicrobial resistance of *Salmonella* serovars isolated from beef at retail markets in the North Vietnam. *The Journal of Veterinary Medicine Science*, 74, 1163-1169.
- Thong, K.L., Modarressi, S. (2011) Antimicrobial resistant genes associated with *Salmonella* from retail meats and street foods. *Food Research International*, 44, 2641–2646.
- Tintino, S. R., Oliveira-Tintino, C.D., Campina, F.F., Costa, M.S., Cruz, R.P., Pereira, R.L., Andrade, J.C., Sousa, E.O., Siqueira-Junior, J.P., Coutinho, H.D., Leal-Balbino, T.C., Balbino, V.Q. (2017). Cholesterol and ergosterol affect the activity of *Staphylococcus aureus* antibiotic efflux pumps. *Microbial Pathogenesis*, 104, 133-136.
- Torpdahl, M., Tsai-Ling, L., Shiu-Yun, L., Ishien, L., Sung-Hsi, W., ve ChienShun, C. (2013) Human Isolates of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from Taiwan displayed significantly higher levels of antimicrobial resistance than those from Denmark. *International Journal of Food Microbiology*, 161, 69-75.
- V. T. Nair, D., Venkitanarayanan, K. ve Kollanoor Johny, A. (2018). Antibiotic-resistant *Salmonella* in the food supply and the potential role of antibiotic alternatives for control. *Foods*, 7, 167.
- Van Eldere, J. (2012). The significance of in vitro antibiotic resistance. Erişim adresi: www.sbimc.org/2005/spring/slides/Vaneldere/Vaneldere.pdf
- Verraes, C., Van Boxtael, S., Van Meervenne, E., Van Coillie E., Butaye, P., Catry, B., de Schaetzen, M.A., Van Huffel, X., Imberechts, H., Dierick, K., Daube, G., Saegerman, C., De Block, J., Dewulf, J., Herman, L. (2013). Antimicrobial resistance in the food chain: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10, 2643–69.
- WHO (World Health Organization) (2012). The evolving threat of antimicrobial resistance: options for action . Erişim adresi: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44812>
- WHO (World Health Organization) (2014). Antimicrobial Resistance: Global report on surveillance.
- Zheng, S., ve Tu, A.T. (1986). Raman spectroscopic identification of bilirubin-type gallstone. *Applied Spectroscopy*, 40, 1099–1103.

ÖZGEÇMİŞ

06.02.1991 yılında Adana’da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimini Adana’ da tamamladım. Lise eğitimimi Başkent Üniversitesi Özel Başkent Anadolu Lisesi’nde tamamladım. 2011-2016 yılları arasında Gaziantep Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği bölümünde lisans eğitimi aldım. 2017 yılında Adana Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında başladığım yüksek lisans eğitimime devam etmekteyim.

