T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

ERZİNCAN TULUM PEYNİRİNDEN İZOLE EDİLEN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* İZOLATRINDA ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN VE BİYOFİLM OLUŞTURMA ÖZELLİĞİNİN FENOTİPİK VE GENOTİPİK OLARAK BELİRLENMESİ

Proje No:
TSY-10-3085

Proje Türü
Yüksek Lisans Tezi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. K. Semih GÜMÜŞSOY
ERÜ Veteriner Fakültesi
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Araştırmacının Adı Soyadı
Necati ÖZPINAR

OCAK 2011

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı gerçekleştirmemde bana yol gösteren ve her konuda destek olan Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Fuat AYDIN'a, Danışman hocam Sayın Doç. Dr. K. Semih GÜMÜŞSOY'a ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Seçil ABAY'a, ayrıca çalışmamda yardım ve katkılarını esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Ali GÜCÜKOĞLU'na ve her konuda olduğu gibi bu çalışmamda da destek ve yardımlarını esirgemeyen eşim Hülya'ya ve kızım Ceren'e teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa no
TEŞEKKÜR	1
İÇİNDEKİLER	2
ÖZET	5
ABSTRACT…	6
1. GİRİŞ VE AMAÇ	7
2. GENEL BİLGİLER	9
2.1. TARİHÇE	9
2.2.*STAPHYLOCOCCUS*'LAR	9
2.2.1. *Staphylococcus*'ların Patojenik Önemi	11
2.2.2. *Staphylococcus aureus*	11
2.2.2.1. Yapısal ve Biyokimyasal Özellikleri	11
2.2.2.2. Hücre Duvarı	11
2.2.2.3. Toksinler ve Enzimler	13
2.2.2.3.1. Sitotoksik Toksinler	13
2.2.2.3.1.1. Hemolizinler	13
2.2.2.3.1.2. Alfa Toksin	13
2.2.2.3.1.3. Beta Toksin	13
2.2.2.3.1.4. Gama Toksin	14
2.2.2.3.1.5. Delta Toksin	14
2.2.2.3.2. Toksin Niteliğindeki Maddeler	14
2.2.2.3.2.1. Lökosidin	14
2.2.2.3.2.2. Enterotoksin	14
2.2.2.3.2.3. Eksfoliyatin	14
2.2.2.3.2.4. Toksik Şok Sendromu Toksini	14
2.2.2.3.3. Enzim Yapısındaki Maddeler	15
2.2.2.3.3.1. Katalaz	15
2.2.2.3.3.2. Koagülaz	15
2.2.2.3.3.3. Deoksiribonükleaz	15
2.2.2.3.3.4. Lipaz	15
2.2.2.3.3.5. Hiyalüronidaz	16
2.2.2.3.3.6. Stafilokinaz	16
2.2.2.3.3.7. Antifagositik Maddeler	16
2.2.2.3.3.8. Penisilinaz	16

Sayfa no

2.3.BİYOFİLM 16
2.3.1. Biyofilmin Tanımı ve Tarihçesi 17
2.3.2. Biyofilm Oluşum Mekanizması 18
2.3.3. Quorum Sensing Mekanizmaları 19
2.3.4. Biyofilm Mikroorganizma İlişkisi 20
2.3.5. Biyofilm Hastalık İlişkisi 21
2.3.5.1. Hücrelerin Ayrılması ve Hücre Agregatları 21
2.3.5.2. Endotoksin Üretimi 21
2.3.5.3. Konağın İmmün Yanıtına Direnç 21
2.3.5.4. Bakterilere Direnç Aktarımı 21
2.3.6. *Staphylococcus aureus* ve Biyofilm 22
2.4. *STAPHYLOCOCCUS* İNFEKSİYONLARI 23
2.4.1. Hayvanlarda *Staphylococcus* infeksiyonları 23
2.4.2. İnsanlarda *Staphylococcus* infeksiyonları 24
2.5. ANTİBİYOTİK DİRENCİ 24
2.5.1. Bakteriler ve Antibiyotik Direnci 24
2.5.2. *Staphylococcus*'ların Genom Yapısı ve Antibiyotik Direnci 26
2.5.3. Biyofilm ve Antibiyotik Direnci 27
3. GEREÇ VE YÖNTEM 29
3.1.GEREÇ 29
3.1.1. Numuneler 29
3.1.2. Besiyerleri 29
3.1.2.1. İzolasyon Besiyerleri 29
3.1.2.1.1. Baird-Parker Agar Base 29
3.1.2.2. İdentifikasyon Besiyerleri 29
3.1.2.2.1. Blood Agar Base 29
3.1.2.2.2. Kongo Red Agar 30
3.1.2.2.3. Tripton Soya Agar 30
3.1.2.2.4. Brain Heart Broth 30
3.1.2.2.5. Mueller Hinton Agar 30
3.1.2.3. Solüsyonlar 31
3.1.2.3.1. Peptonlu Fizyolojik Su 31
3.1.2.3.2. Bactident Coagulase 31
3.1.3. Antibiyotik Diskleri 31
3.1.4. Primerler 31
3.1.5. Kontrol Suşları 32

Sayfa no

3.2. YÖNTEM 32
3.2.1. *Staphylococcus aureus*'un İzolasyonu 32
3.2.2. *Staphylococcus aureus*'un İdentifikasyonu 32
3.2.2.1. Fenotipik Yöntemler 32
3.2.2.1.1. Gram Boyama Yöntemi 32
3.2.2.1.2. Hemoliz Testi 32
3.2.2.1.3. Koagulaz testi 33
3.2.2.2. Genotipik Yöntemler 33
3.2.2.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile nuc geni saptanması 33
3.2.2.2.2. DNA Ekstraksiyon Yöntemi 33
3.2.2.2.3. Fenol / Kloroform Ekstraksiyon Yöntemi 33
3.2.2.2.4. Reaksiyon Karışımının Hazırlanması 34
3.2.2.2.5. PZR ile nuc Geni Tespiti için Reaksiyon Karışımı 34
3.2.2.2.6. Bakteri DNA'sının Çoğaltılması 34
3.2.2.2.7. Amplifikasyon Döngüsü 34
3.2.2.2.8. Bakteri DNA'sının Gösterilmesi 34
3.2.3. Disk Difüzyon Yöntemi Antibiyotiklere Karşı Direnç Araştırılması 34
3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Metisilin Direnci Saptanması 35
3.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Vankomisin Direnci Saptanması.... 35
3.2.5.1. Reaksiyon Karışımının Hazırlanması 35
3.2.5.2. PZR ile vanA ve vanB Genleri Tespiti için Reaksiyon Karışımı 35
3.2.5.3. Bakteri DNA'sının Çoğaltılması 35
3.2.5.4. Amplifikasyon Döngüsü 36
3.2.5.5. Bakteri DNA'sının Gösterilmesi 36
3.2.6. Biyofilm Oluşturma Özelliğinin Saptanması 36
3.2.7. İstatistiksel Değerlendirme 36
4. BULGULAR 37
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 45
6. KAYNAKLAR 51

ERZİNCAN TULUM PEYNİRİNDEN İZOLE EDİLEN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* İZOLATLARINDA ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN VE BİYOFİLM OLUŞTURMA ÖZELLİĞİNİN FENOTİPİK VE GENOTİPİK OLARAK BELİRLENMESİ

ÖZET

Bu çalışmada Erzincan'da tüketime sunulan Erzincan tulum peynirinden izole edilen *Staphylococcus aureus*'ların biyofilm oluşturabilme yetenekleri ve antibiyotik dirençlilikleri fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırıldı.

Araştırmada 100 adet Erzincan tulum peyniri numunesi toplandı. Aseptik koşullarda alınan peynir örneklerinden *Staphylococcus aureus* izolasyonu için Baird-Parker Agar'a ekim yapıldı. Buradan ayrılan izolatlar gram boyama, hemoliz ve koagülaz testleriyle *Staphylococcus aureus* olarak identifiye edildi. İzolatlar Polimeraz Zincir Reaksiyonu kullanılarak nuc, mecA, vanA ve vanB geni yönünden incelendi. *Staphylococcus aureus* izolatlarının biyofilm oluşturma yeteneği için Kongo Red Agar ve antibiyotik dirençlilikleri içinde oksasilin (1µg), sefoksitin (30µg), vankomisin (30µg), amoksisilin-klavulonik asit (20µg) ve penisilin(10 unit) antibiyotik diskleri kullanıldı.

Test edilen örneklerin 72 (% 72)'si *Staphylococcus* spp. pozitif bulundu. Bunlardan 61 (% 84,7) örnek fenotipik ve genotipik olarak *Staphylococcus aureus* olarak identifiye edildi. İzolatların 37 (% 60,6)'sinin biyofilm oluşturduğu saptandı. Disk difüzyon yönteminde 61 izolattan 9 (% 14,7)'unda oksasilin (metisilin), 8 (% 13,1)'inde sefoksitin, 4 (% 6,5)'ünde amoksisilin-klavulonik asit, 28 (% 45,9)'inde ise penisilin dirençliliği tespit edilirken vankomisin dirençli izolata rastlanmadı. Polimeraz Zincir Reaksiyonu sonucunda 61 örnekten 10 (% 16,3)'unda mecA geni saptanırken vanA ve vanB genine rastlanmadı.

Sonuç olarak Erzincan tulum peynirinde *Staphylococcus aureus*'un yüksek bir oranda bulunduğu görülmüştür. Bu durumun özellikle peynirin imalat safhasında yeterli hijyen kurallarına riayet edilmemesi ve olgunlaşma süresinin kısaltılarak satışa sunulmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu sonuçların ışığı altında bölge ile özdeşleşmiş olan Erzincan tulum peynirinin *Staphylococcus aureus* ile kontaminasyon oranının yüksek olması ve izolatların antibiyotik dirençliliği göz önünde bulundurulduğunda halk sağlığı açısından risk oluşturabileceği kanaatine varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Antibiyotik direnci, biyofilm, *Staphylococcus aureus,* Polimeraz Zincir Reaksiyonu, tulum peyniri

THE DETERMINATION OF ANTIBIOTIC RESISTANCE AND BIOFILM CREATING PROPERTIES OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLATES FROM ERZİNCAN TULUM CHEESE AS PHENOTYPIC AND GENOTYPIC

ABSTRACT

In this study, biofilm forming capabilities, and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* strains which were isolated from 100 different Erzincan tulum cheese consumed in Erzincan province, were investigated as phenotypic and genotypic.

In this study 100 samples of Erzincan tulum cheese were gained from Erzincan Province. Samples of cheese which were gained from aseptic conditions were inoculated into the Baird-Parker Agar for the isolation of *Staphylococcus aureus*. Isolates from agar separated that agar were identified as *Staphylococcus aureus* with gram staining, hemolysis and coagulase tests. Isolates were examined using the Polymerase Chain Reaction in terms of NUC, mecA, vanA and vanB genes. Congo Red Agar was used to determine biofilm formation capability of isolates of *Staphylococcus aureus* and oxacillin (1µg), cefoxitin (30µg), vancomycin (30µg), amoxicillin-clavulanic acid (20µg), and penicillin (10 units) antibiotic discs were used to remark antibiotic resistance analyzes.

72 (72%) of tested samples were found as positive for *Staphylococcus* spp. Among these 72 (72 %) samples, 61 (84.7 %) were identified as *Staphylococcus aureus* both phenotypic and genotypic. It was also determined that 37 (60.6 %) of isolates had formed biofilm. In the study with disc diffusion method, it was found that from 61 isolates 9 (14.7 %) were oxacillin (methicillin), 8 (13.1 %) were cefoxitin, 4 (6.5 %) were amoxicillin-clavulanic acid and 28 (45.9 %) were resistance to penicillin. On the other hand, vancomycin-resistant strain was not detected. In the examination performed by polymerase chain reaction in all of 61 strains of *Staphylococcus aureus*, nuc gene and 10 (16.3 %) mecA genes were detected. vanA and vanB genes were not detected.

As a result, high percentages of *Staphylococcus aureus* were determined in Erzincan tulum cheese. This is due to poor hygiene rules especially phase of cheese manufacturing and shortened ripening period for sale. In the light of these results it was concluded that Erzincan tulum cheese now identified with the region has a high rate of contamination with *Staphylococcus aureus* and considering its isolates have antibiotic resistance has risk to public health.

Key words: Antibiotic resistance, biofilm, *Staphylococcus aureus*, Polymerase Chain Reaction, Tulum cheese

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Süt ürünleri içinde en yaygın olarak bilinen ve üretileni peynirdir. Dünya genelinde bilinen peynir çeşidi 2000 civarındadır. Fakat bu peynirlerin büyük çoğunluğu birbirine yakın varyeteler olup temelde farklı 12 peynir çeşidi vardır. Türkiye'de ise üretilen peynir çeşidi, büyük çoğunluğu mahalli olmakla birlikte yaklaşık 20'dir (1).

Tulum peyniri üretimi kaşar ve beyaz peynirden sonra üçüncü sırada yer almaktadır. Üretimi yıldan yıla artış göstermekte olup 1976 yılında 2000 ton iken, 1989 yılında 29.000 tona ulaşmıştır (2).

Tulum peyniri Türkiye'nin her bölgesinde üretilmekle beraber gerek üretim ve gerekse üretim sonrası olgunlaştırma şekil ve süreleri farklılıklar göstermektedir. Bu nedenle standart kalitede tulum peyniri bulmak her zaman mümkün olmamaktadır. Tulum peynirinin geleneksel olarak yapılısında, genel olarak koyun sütü kullanılmaktadır. Sütlerin yağı alınmamaktadır. Sağımı müteakip sütler süzülüp herhangi bir ısı işlemi veya pastörizasyon uygulanmadan, hemen mayalanmaktadır. Sütlerin mayalanma sıcaklığı (+ 28) – (+ 30) °C arasında değişmekte, pıhtılaşma ise maya kuvvetine ve miktarına bağlı olarak 1.5 - 4 saat arasında tamamlanmaktadır (3).

Tulum peyniri, ismini ambalaj olarak kullanılan tulumlardan almaktadır. Tulum olarak genellikle daha dayanıklı olduğu için keçi derisi tercih edilmekle birlikte koyun derisi de kullanılmaktadır. Bugün piyasada satışa sunulan tulum peynirlerinin büyük bir çoğunluğu plastik bidonlar içerisindedir. Tulumda muhafaza, eskiden teneke ve diğer ambalaj malzemeleri bulunmadığından tercih edilmiştir. Ayrıca, yapılan araştırmalarda plastik bidonlardaki peynirlerin, keçi derisinden yapılmış tulumdakilerden görünüm, tat, koku ve yapı bakımından daha üstün olduğu belirtilmiştir (4)

Staphylococcus aureus gıda ilişkili önemli bir patojendir. İnsanlar ve hayvanlarda hafif deri enfeksiyonlarından pneumoni ve septisemi gibi daha ciddi hastalıklara kadar değişen birçok hastalığa neden olur. *Staphylococcus aureus* gıda üretiminde kullanılan hayvanların deri ve mukozalarında bulunur. Ruminantlarda özellikle subklinik mastitislerle ilişkilidirler. Bu durum süt ve süt ürünlerinin kontaminasyonuna neden olur. İnsanlarda ise sıklıkla gıda zehirlenmelerine yol açmaktadır (5). Gıdaların *Staphylococcus aureus* ile kontaminasyonu genellikle taşıyıcı insanlardan olur. İnsanların yaklaşık % 50'si *S. aureus*'un kommensal taşıyıcısıdır. Gıdaların üretim sonrası *Staphylococcus aureus*'la kontaminasyonu önemli bir sağlık tehlikesidir. Antibiyotik dirençli *Staphylococcus aureus*'lar süt ve süt ürünleri ayrıca et

ve et ürünleri ile taşınabilirler. Son yıllarda sıkça karşımıza çıkan Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)'ların taşınımında da gıda kaynaklı bulaşmalar önemli bir rol oynayabilir (6). *Staphylococcus aureus* uzun bir zamandır ciddi hastane infeksiyonları ile karşımıza çıkan ve böylelikle de halk sağlığı açısından önemli problemlere neden olan bir patojendir. *Staphylococcus aureus*'tan kaynaklanan hastane enfeksiyonlarının çoğu MRSA'lar tarafından oluşturulmuş ve tüm dünya çapında önemli kayıplara neden olmuştur (7). Metisilin dirençli suşlar multirezistans özelliğine sahiptirler bu durum onların tedavisinde ciddi zorluklara neden olur. Bu dirençli suşlar ile kontamine gıdaların insanlar tarafından tüketilmesi ile antibiyotik dirençli suşların insanlara bulaşması mümkündür. Bu yüzden kontamine gıdalar insan sağlığı açısından büyük bir risk potansiyeline sahiptir. Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının multirezistan özelliklerinden dolayı tedavilerinde vankomisin başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Ancak son yıllarda bu antibiyotiğe karşı orta düzey dirençlilik belirlenmiştir. Vankomisine karşı oluşan direnç MRSA'ların tedavisini kısıtlamaktadır. Bu yüzden vankomisin dirençli suşların belirlenmesi önem kazanmıştır (8).

Erzincan ekonomisinde önemli bir yeri oluşturan tulum peyniri, ülkemizce de tanınmış ve Erzincan'da olduğu gibi aranılan, tercih edilen ürünler grubunda yerini almıştır. Başlangıçta üretilen sütün yerinde değerlendirilmesi amacıyla yerel halkın bilgi ve becerisi ile üretilen tulum peyniri son zamanlarda büyük işletmeler tarafından üretilip diğer bölgelere de dağıtımı yapılmaktadır.

Bu çalışmada ülkemizde çok fazla tüketim potansiyeline sahip Erzincan tulum peynirinden izole edilen *Staphylococcus aureus* izolatlarında antibiyotik direnci ve biyofilm oluşturma yeteneğinin fenotipik ve genotipik testlerle araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. TARİHÇE

Staphylococcus'lar 100 yıldan fazla bir süredir enfeksiyon etkeni olarak tıp dünyasında söz konusu olan bir mikroorganizmadır. *Staphylococcus*'ları ilk kez 1878'de Robert Koch tanımlamış ve 1880'de Pasteur sıvı besiyerinde üretmiştir. Ardından, 1884'te Rosenbach hasta örneklerinden bu mikroorganizmaları izole etmiş ve beyaz renkli kolonileri "*Staphylococcus albus"*, sarı-portakal rengi kolonileri ise "*Staphylococcus aureus"* olarak isimlendirilmiştir. Bakterinin Kraus ve Clairmont tarafından 1900'da alfa toksini, Glenny ve Stevens tarafından 1935'te beta toksini bulunmuştur. Smith ve Price 1938'de gama toksin ve Williams ile Harper 1947'de delta toksin varlığını açıklamışlardır. Todd ve arkadaşları tarafından 1978'de yeni bir hastalık olarak "Toksik Şok Sendromu" tanımlanmıştır (9).

Fleming'in 1928 yılında penisilini bulmasına kadar *Staphylococcus*'lar ağır seyirli ve hatta ölümle sonuçlanabilen tedavisi sorunlu enfeksiyonlara sebep oluyordu. *Staphylococcus* tedavisinde ilk adım, 1940 yılında Oxford'da Florey, Chain ve arkadaşları tarafından penicillium kültürlerinden penisilinin saflaştırılmasıyla atılmıştır. Fakat penisilinin klinik kullanıma girmesinden kısa bir süre sonra penisiline dirençli *Staphylococcus*'lar görülmeye başlanmıştır (10).

İlk kez 1944 yılında Kirby tarafından penisilinaz üreten *Staphylococcus*'lar tespit edilmiştir. Penisilinaz üreterek penisiline direnç kazanmış *Staphylococcus aureus* suşları 1950'li yılların sorunlu bakterileri olmuşlardır. Penisilinlerin 1960'da kullanıma girmesinden iki yıl sonra görülen metisilin direnci, antimikrobiyal tedavi seçeneklerini önemli ölçüde sınırlandırmıştır. *Staphylococcus aureus* 1980'li yıllardan sonra tüm dünyada hastane enfeksiyonu etkenleri arasında önemli bir artış göstermiştir. Tüm beta-laktam antibiyotiklere dirençli MRSA suşları beta-laktam dışı antibiyotiklerin çoğuna da dirençli olduklarından, bu suşlarla oluşan ağır enfeksiyonların tedavisinde glikopeptid antibiyotikler tek seçenek haline gelmiştir (11).

İlk kez 1995 yılında Fransa'da vankomisine azalmış duyarlılık gösteren *Staphylococcus aureus* (VISA), 1996'da Japonya'da VISA ve sonunda 2002 yılında ABD'de vankomisin dirençli *Staphylococcus aureus* (VRSA) suşlarının saptanması ile *Staphylococcus*'larda çoğul antimikrobiyal direnç sorunu daha da ciddi hale gelmiştir (12).

2.2. *STAPHYLOCOCCUS'*LAR

Staphylococcus, *Micrococcaceae* familyası içinde incelenir. Bu familyada; yuvarlak, düzgün veya düzensiz kümeler oluşturan, gram pozitif, genellikle hareketsiz, nadiren hareketli koklar bulunur. Aerob veya fakültatif anaerob, kemoorganotrof koklardır. Bu familya üyeleri

Micrococcus, Staphylococcus, Stomatococcus ve *Planococcus* cinsinden oluşur. Bu cinslerin, DNA'daki G+C oranlarında (% 30-75 mol) ve hücre duvar yapılarında farklılıklar olmasına karşın; nükleik asit hibridizasyon deneyleri ve 16S rRNA sıralarının incelenmesi sonucunda bu dört cins bir familya altında toplanmıştır (13).

Staphylococcus'lar yaklaşık 1 mikrometre çapında, tama yakın yuvarlak, hareketsiz ve sporsuz koklardır. Bazılarında polisakkarit yapısında belirgin bir kapsül ya da mukus tabakası bulunabilmektedir. Kokların şeklinin tam yuvarlak ve bakterilerin birbirine benzer görünümde olması *Staphylococcus*'lar için karakteristiktir (14).

Staphylococcus'lar bazen 3-4 bakteriden ibaret tetrat ve kısa zincirler şeklinde de bulunabilirler. Bu görünümleri ile Streptokoklara son derece benzeyen *Staphylococcus*'lar, katalaz testinin pozitif olması ile ayırt edilirler Besiyerlerinde oluşturdukları koloniler; yuvarlak, opak keskin kenarlı yaklaşık 4mm çapında, düz (S) kolonilerdir (14).

Optimal olarak 37 °C ve pH 7,4'te üreyen *Staphylococcus*'lar, fakültatif anaerob olmalarına karşın (yalnız *S. saccharolyticus* anaerobdur) oksijenli ortamda üremeyi tercih ederler. Fakat az miktarda hatta tamamen oksijensiz ortamda bile üreyebilirler (15). Basit besiyeri dahil birçok besiyerinde ürerlerse de kanlı besiyerinde üremeleri daha iyidir. % 10 NaCl'lü ortamda ve 18 – 40 °C'ler arasında üreme özelliğine sahiptirler (13).

Hücre zarlarında bulunan ve keratenoid yapısında olan pigmentleri sayesinde, altın sarısı renkten, porselen beyazı rengine kadar değişebilen farklılıkta koloniler oluşturabilirler. Genel olarak pigment oluşumu için oksijen gereklidir. *Staphylococcus*'lar başta glikoz olmak üzere birçok karbonhidratı parçalayarak son ürün olarak laktik asit oluştururken, gaz yapamazlar. Şekerlerden mannitol üzerine olan etkileri, koagülaz testiyle beraber *Staphylococcus aureus*'u ayırt etmede kullanılan en önemli testlerdir (15).

Sporsuz olmalarına rağmen kuruluğa karşı son derece dayanıklıdırlar. Fakat kristal viyole ve malaşit yeşili gibi boyaların düşük konsantrasyonlarında bile çok çabuk harap olurlar. *Staphylococcus*'lar antijen özelliğinde olan 30'dan fazla maddeye sahiptirler. *Staphylococcus*'ların en önemli antijenik maddelerinden birisi hücre duvarlarında bulunan ve aşırı duyarlılık reaksiyonlarında rol oynayan teikoik asittir. *Staphylococcus*'ların kültür süzüntülerinden, eritrosit ve çeşitli hücreleri parçalayan ve deney hayvanları üzerinde öldürücü etkisi olan ekzotoksin niteliğinde maddeler izole edilmiştir (14).

Staphylococcus'lar; insan ve hayvanlar için fırsatçı patojendir. İnsan vücudunun çeşitli yerlerinde kolonize olurlar. *Staphylococcus aureus* normal insanların, hastanede çalışanların ve tedavi altındaki hastaların % 70'nin burun mukozasına kolonize olur (13).

2.2.1. *Staphylococcus*'ların Patojenik Önemi

Çeşitli kaynaklardan izole edilen ve tanımlanan *Staphylococcus*'ların in vivo ve in vitro olarak üretildiği ortama salgıladıkları konakçı üzerine etkili olan α-toksin, β- hemolizin, epidermolitik toksin, pirojenik toksin, leukosidinler, stafilokoagülaz, enterotoksinler, bakteriyosin ve mikotoksinler, lizozim, nükleazlar (DNaz ve RNaz), slime faktör, hiyalüronidaz gibi ekstraselüler, peptidoglikan, kapsüler substantlar, clumping faktör ve protein A gibi sellüler maddeler vardır (11).

Bunlardan ekstraselüler olanların patojenite ile yakından ilişkili olduğu uzun yıllardır bilinmektedir. Bu nedenle, *Staphylococcus*'larda bulunan ekstraselüler maddelerin tespit edilmesi bu mikroorganizmaların tanımlanmasında önemli yer tutmaktadır. Ayrıca, Uluslararası Taksonomi Komisyonu *Staphylococcus*'ların sınıflandırılmasında; koagülaz yapımı, aerobik koşullarda sakkaroz, trehaloz ve mannitolden asit oluşturması, fosfataz ve novobiyosine duyarlılık testleri gibi patojeniteyi etkileyen biyokimyasal testleri de önermektedir (12).

2.2.2. *Staphylococcus aureus*

2.2.2.1. Yapısal ve Biyokimyasal Özellikleri

Staphylococcus aureus, pigmentli, fakültatif anaerob çoğunlukla aerob üreyen, koagülaz ve beta-hemoliz pozitif, mannitol, sükroz, maltoz ve trehaloz'dan asit yapabilen, % 10 NaCl'de üreyebilen, alfa toksin yapan, novobiyosine duyarlı, sporsuz ve hareketsizdir. Lizozim etkisiyle erimez. Doğada her yerde yaygın olarak bulunur. Koagülaz pozitif olan tek stafilokok *Staphylococcus aureus*'tur. Diğer tüm *Staphylococcus*'lar koagülaz negatif *Staphylococcus* (KNS)'lar olarak adlandırılır. *Staphylococcus aureus* basit besiyerlerinde ürese de kanlı besiyerinde daha iyi çoğalır ve koloniler etrafında tam hemoliz meydana getirir. 37 °C'de ve pH 7,4'de iyi ürer. Jeloz besiyerinde yuvarlak kenarlı mat, kabarık, parlak yüzeyli, S tipinde ve 1-2 mm çapında koloniler yapar. *Staphylococcus aureus* altın sarısı renginde pigment oluşturur. Kolonilere altın sarısı rengini karotenoid pigmentleri vermektedir (14).

Isıya ve kuruluğa dayanıklıdır. Antibiyotik maddelere karşı diğer bakterilere göre daha dayanıklı oldukları gibi hızla kemoterapötiklere karşı direnç kazanarak onlardan etkilenmeyen kökenler haline dönüşürler (13).

2.2.2.2. Hücre Duvarı

Gram pozitiflerin hücre duvarı başlıca iki önemli kimyasal yapıdan oluşmaktadır. Bunlardan, peptidoglikan tabakasının içine dağılmış, antijenik bir özelliğe sahip olan, teikoik asit, poliribitol veya poligliserol fosfat moleküllerinden meydana gelmiş lineer polimer bir yapıya sahiptir ve peptidoglikan tabakasındaki N-asetil muramik asit (NAMA) molekülüne

fosfodiester bağlarıyla kovalent olarak birleşmiştir. Teikoik asidin, yüzey antijenik determinantları oluşturmada katkıları oldukça fazladır. Teikoik asidin, antijenik özelliği yanı sıra, kuvvetli polar ve negatif yüklü dış yüzey karakteri oluşturmada ve iyon değişiminde de etkinliği fazladır. Kalınlığı bakteri türüne göre değişmek üzere, yaklaşık, 10-12 nm arasında olduğu belirlenmiştir. *Staphylococcus*'ların tiplendirilmesinde teikoik asitlerin önemi fazladır. Teikoik asitler bulundukları yerlere göre de başlıca iki kısma ayrılırlar. Bunlar; hücre duvarı teikoik asitleri ve membran teikoik asitleridir. Duvar teikoik asitleri, Gram pozitif bakterilerde peptidoglikan tabakasına bağlanmış olup temel yapısında poliribitol fosfat (*S. aureus*) veya poligliserol fosfat (*S. epidermidis*) vardır. Membran teikoik asitleri ise sitoplazmik membranın dış yüzeyinde lokalize olmuştur ve duvar teikoik asitlerine benzer kimyasal yapıya sahip olmakla beraber gliserol fosfat molekülleri hakim durumdadır (16).

Gram pozitif mikroorganizmalarda, teikoik asit yapısından ayrı olarak ve buna fosfodiester bağları ile bağlanmış olan diğer ikinci ve çok önemli antijenik yapı daha bulunmaktadır ki bu da peptidoglikan (murein, mukopeptid, glikopeptid) olarak adlandırılmaktadır. Bu yapı, bakteriye şekil, elastikiyet, sağlamlık kazandırır. Yapısında N-asetil glikoz amin (NAGA) ve NAMA bulunur (16).

Hücre duvarının bu anlatılan özelliklerinin yanı sıra, bakteriyofajların, plasmidlerin, antikorların, komplementin, çeşitli bakteriosinlerin, genetik materyallerin, vs. maddelerin bağlanmasında reseptör bölgelerini oluşturması bakımından da önemi fazladır. *Staphylococcus aureus* (veya diğer bakterilerin) hücre duvarının özel kimyasal karakteri, ancak kendine özgü fajlar için spesifik bağlanma bölgelerini meydana getirirler. Diğer mikroorganizmalara ait fajlar, *Staphylococcus*'ların yüzeylerindeki reseptörlere bağlanma aktivitesine sahip değildirler. Bakterilerin hücre duvarında plasmidler için de sınırlı sayıda reseptör bölge vardır. Plasmidler, hücre duvarına absorbe olduktan sonra, ancak bu bölgeden içeri girebilirler. Bu nedenle hücre duvarının kimyasal yapısı ile plasmidlerin, fajların, bakteriosinlerin ve diğer genetik elementlerin bağlanmaları arasında spesifik kimyasal bir ilişki vardır (16).

Gram pozitiflerin hücre duvarında bulunan teikoik asit ve peptidoglikan ile protein yapılarının bakterilerin tür spesifik antijenik maddelerini ve virulanslarını sağlamada etkin bir aktivitesi vardır. Hücre duvarını kaybeden bakterilerde, antijenik karakterler ve virulans büyük ölçüde zayıflar veya kaybolur (17).

Ökaryotik hücre duvarlarının gergin yapıları selüloz ve benzeri bileşiklerden kaynaklanırken, eubakterilerde peptidoglikandan oluşmaktadır. Ökaryotik hücreler ile eubakteriyal hücreler arasında kimyasal kompozisyondaki bu temel farklılık, penisilin gibi ilaçların seçici özelliklerinin oluşmasını sağlar (17).

Bitki ve hayvanlara toksik olmayan penisilin, peptidoglikan yapının düzenlenmesini inhibe ederek Gram pozitif bakterilerin çoğalmasına zarar verdiğinden pek çok eubakterinin büyümesine engel olur (18).

Staphylococcus aureus hücre duvarı ve yüzeyinin karakteristikleri;

- Kapsüler polisakkarit; organizmanın fagositozuna karşı direnç sağlayan yapıdır.
- Peptidoglikan; konakçı hücre duvarına yapışmayı sağlayan ve uygunsuz çevresel koşullara direnci sağlayan hücre duvarı yapısı
- Teikoik asit'dir (17).

2.2.2.3. Toksinler ve Enzimler

Staphylococcus aureus'un neden olduğu hastalıkların çoğunda patogenez çoklu faktörler tarafından sağlanır. Bu yüzdende hangi faktörün hastalığa neden olduğunu kesin olarak tanımlamak zordur. Konakçı dokularda *S. aureus*'un yayılımı yüksek miktarda ekstraselüler proteinlerin üretimi ile gerçekleşir. *Staphylococcus aureus* pek çok virulans faktör salınımı yapar (19).

2.2.2.3.1. Sitotoksik Toksinler

2.2.2.3.1.1. Hemolizinler

Membrana hasar veren toksinlerdir. Ökaryotik hücre membranlarının lizisini sağlarlar (11). *S. aureus*; antijenik özelliklerine, hayvan eritrositleri üzerinde hemolitik etki yapıp yapmamalarına, hemoliz için gerekli ısı derecelerine ve toksisite derecelerine göre farklı dört tip hemolizin (ekzotoksin) üretir (14). Bunlar;

2.2.2.3.1.2. Alfa Toksin (α-Toksin)

Staphylococcus aureus'ların membrana zarar veren en etkili toksinidir. Bu toksine özellikle trombosit ve monositler daha duyarlıdırlar. Purifiye toksinlerle hayvanlar ve organ kültürlerinde yapılan çalışmalarda önemli bir virülens faktörü olduğu görülmüştür. Alfa toksinler için duyarlı hücrelerin üzerinde reseptörler bulunmaktadır. Bu reseptörlere bağlanarak hücre membranı üzerinde porlar oluştururlar (20).

2.2.2.3.1.3. Beta Toksin (β-Toksin)

Glenny ve Stevens tarafından 1935'de tanımlanmıştır. Stafilokokal sphingomyelinase olarak da bilinir. En iyi koyun, daha az olarak da insan ve tavşan alyuvarlarını lize ederler. Sığır mastitislerinden izole edilen suşların çoğunda üretilmektedir ve mastitisin patogenezinde önemlidirler. Mastitis fare modellerinde β-toksin mutantlarında virülensin azaldığı gösterilmiştir (20).

2.2.2.3.1.4. Gama Toksin (γ-Toksin)

Smith ve Price tarafından 1938 yılında tanımlanmıştır. Wadstron tarafından elde edilmiştir. İnsan, tavşan ve koyun alyuvarları duyarlı iken, at ve kanatlı alyuvarları dirençlidirler. Gama toksin ve lökosidinler duyarlı hücrelerin membranlarına zarar veren iki tamamlayıcı proteindirler. Ancak birlikte membrana zarar verirler (20).

2.2.2.3.1.5. Delta Toksin (δ-Toksin)

1947 yılında Williams ve Harper tarafından tanımlanan çok küçük peptidlerdir. *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *S. lugdunensis* tarafından üretilirler. Bu toksinin enfeksiyonlardaki rolü tanımlanamamıştır (20).

2.2.2.3.2. Toksin Niteliğindeki Maddeler

2.2.2.3.2.1. Lökosidin

Lökosit ve makrofajları parçalar, diğer hücreleri etkilemez. Toksin birbirinden ayrı S (Slow) ve F (Fast) adında iki protein komponentinden oluşur. Toksin aktivitesi için bu alt birimlerin ikisi de gereklidir. Lökositler tarafından fagosite edilseler de lökosidin üreten *Staphylococcus*'lar hücre içerisinde üremeye devam ederler. *Staphylococcus* enfeksiyonlarında fagositoz en önemli savunma faktörüdür bu yüzden lökosidin önemli virulans faktörüdür (19).

2.2.2.3.2.2. Enterotoksin

Süperantijen özelliğine sahiptir. *Staphylococcus* kaynaklı besin zehirlenmelerinden sorumludur. Karbonhidratlı ve proteinli besiyerlerinde üreyen *Staphylococcus*'lar tarafından oluşturulur. Isıya dirençli, 100 °C'ye 30 dakika dayanabilen, polipeptit yapısındadır. *Staphylococcus aureus* suşlarının yarıya yakını bu toksini oluşturabilmektedirler. Enterotoksinler; A, B, C1, C2, C3, D, E ve F olmak üzere 8 serolojik grup oluştururlar (19).

2.2.2.3.2.3. Eksfoliyatin

Epidermolitik toksin olarak da bilinirler. Yeni doğanlarda sıklıkla rastlanılan "Haşlanmış Deri Sendromundan" sorumludurlar. *Staphylococcus aureus* tarafından ve özellikle de bakteriyofaj II grubu tarafından oluşturulur. Kimyasal ve immunojenik özelliklerine göre eksfoliyatin toksin A (ETA) ve Eksfoliyatin toksin B (ETB) olmak üzere iki ayrı proteinden oluşmaktadır. Eksfoliyatin toksin A kromozomal, ETB ise plazmidlere bağlı genlerce oluşturulurlar (21).

2.2.2.3.2.4. Toksik Şok Sendromu Toksini (TSST-1)

Önceleri pirojenik ekzotoksin C ve enterotoksin F olarak bilinen toksin şimdi "TSST-1" olarak bilinmektedir. TSST-1 sistemik olarak salınır ve toksik şok sendromuna neden olur. Alfa toksinin ve enterotoksinlerin sistemik salınımı da toksik şok nedenidir. Toksik şok sendromu;

ateş, eritroderma, kusma, diyare, böbrek yetmezliği ve hipertansiyon gibi klinik belirtileriyle bir multisistem rahatsızlık olup adet kanamalarında tampon kullanan ve vajinal *Staphylococcus aureus* taşıyıcısı olan kadınlarda sık rastlanmaktadır (19).

2.2.2.3.3. Enzim Yapısındaki Maddeler

2.2.2.3.3.1. Katalaz

Fagositik hücreler tarafından *Staphylococcus*'lar hücre içerisine alındıktan sonra oluşturulan toksik hidrojen peroksiti yıkarak su ve oksijene dönüşümünü katalizleyen enzimdir. Tüm *Staphylococcus*'larca üretilir. Bakteriler, bu enzim sayesinde fagositlerin içinde öldürülmeye karşı direnç kazanır (20).

2.2.2.3.3.2. Koagülaz

Staphylococcus aureus tarafından üretilen bir plazma pıhtılaştırma proteinidir. *Staphylococcus aureus* suşlarında iki tip koagülaz bulunur. Bunlar, fibrinojeni direkt olarak fibrine değiştiren "bağlı koagülaz" ve fibrinojenden fibrin oluşumunu serumdaki coagulase-reacting factor adı verilen ve hemen her serumda bulunan bir faktör yardımıyla yapabilen "serbest koagülaz"dır. Bağlı koagülaz ayrıca *Staphylococcus*'ların kümeleşmelerini de sağlar. Bu özelliklere sahip *Staphylococcus*'lar girdikleri organizmada fibrin bir zırh ile kaplanarak fagositoza karşı korundukları gibi aynı zamanda serumun bakterisid etkisini de önlediklerinden patojenlik kazanmış olurlar. Koagülaz deneyi *S. aureus*'un araştırılmasında en önemli testlerden biridir. Koagülaz enziminin varlığı lam deneyi ve tüp deneyi olarak iki şekilde araştırılmaktadır. Lam deneyi ile kültür süzüntülerinde bulunmayan bağlı koagülaz ortaya konurken, tüpte yapılan koagülaz deneyi ile kültür süzüntülerinde de bulunabilen serbest koagülaz tespit edilmektedir (14, 15).

2.2.2.3.3.3. Deoksiribonükleaz

DNA'yı hidrolize eden bir enzimdir. Genellikle koagülaz pozitif *Staphylococcus*'lar tarafından üretilmektedir. Deoksiribonükleazın araştırılması için yapılan deneyde; içerisinde % 0,2 DNA bulunan besiyerlerine ekilen *Staphylococcus*'ların üredikleri yerdeki ve çevrelerindeki DNA'yı eritmeleri araştırılır (14).

2.2.2.3.3.4. Lipaz

Plazma ve deri yüzeyinde biriken yağlı maddeleri hidrolize eden bu enzim, tüm *Staphylococcus aureus* suşları ve birçok KNS tarafından sentezlenir. Böylece *Staphylococcus*'ların deri ve deri altı bölgelerde yayılmasını sağlar (14, 21).

2.2.2.3.3.5. Hiyalüronidaz

Yayılma faktörü olarak da bilinir. *Staphylococcus aureus* suşları tarafından % 90 oranında sentezlenir. Bağ dokusunun yapısındaki hiyalüronik asidin depolimerizasyonunu sağlayarak *Staphylococcus*'ların doku içerisinde yayılmasını kolaylaştırır. Antijen özelliği vardır (14).

2.2.2.3.3.6. Stafilokinaz

Fibrinolizin olarak da bilinir. *Staphylococcus*'lar tarafından ortama salınan kinazlar, plazmada bulunan plazminojeni aktive ederek plazmin oluşturur. Fibrinolitik etki bu madde aracılığıyla oluşur ve fibrini parçalayarak organizmanın yayılmasına yardımcı olur. Bu enzimin yapımı bir faj genomunun yönetimindedir (14).

2.2.2.3.3.7. Antifagositik Maddeler

Staphylococcus'ların yüzeyindeki Protein A ve kapsül niteliğindeki polisakkarid maddelerin fagositozu engelleyici özelliği vardır. Kapsül niteliğindeki polisakkarid maddelere "slime faktör"de denir. Bu faktör *Staphylococcus*'ların kateter ve diğer sentetik maddelere kolayca yapışmasını ve orada kolonize olmalarını sağlar. Slime faktör, hücresel immün yanıt, kemotaksi ve lökositlerin fagositozuna engel olan önemli bir patojenite göstergesidir (15).

2.2.2.3.3.8. Penisilinaz

Beta-laktamaz olarak da bilinirler. *Staphylococcus*'lar salgıladıkları bu madde ile penisilin grubu antibiyotiklerdeki beta-laktam halkasının hidroksil grubunu parçalayarak etkisizleştirir. Sonuçta bakteriler, bakteri hücre duvarı sentezini inhibe ederek etkilerini gösteren Penisilin ve sefalosporin gibi antibiyotiklere karşı dirençli hale gelirler. Genetik taşınma plazmid ve transpozonlarla sağlanır (14).

2.3. BİYOFİLM

Bakteriyel adhezyon, enfeksiyonun oluşumuna katkıda bulunan önemli bir virülens özelliğidir. Bu bağlanmada görevli olan çok çeşitli proteinler belirlenmiştir. *Staphylococcus aureus* suşları da polisakkarit yapısında biyofilm olarak bilinen bir adhezyon proteine sahip oldukları belirlenmiştir. Biyofilm oluşturan suşların oluşturmayanlara göre daha virülent olduğu ve bu özelliğe sahip olan suşların çeşitli antibiyotiklere karşı direnç gösterdikleri belirlenmiştir (22).

Biyofilm, bir yüzeye yapışarak, belirli bir yapısal bütünlük içerisinde toplu halde yaşayan ve birbirleriyle haberleşerek varlıklarının devamı için gerekli işlevlerin yerine getirilmesini sağlayan bakterilerin oluşturduğu bir organizasyondur. Bakteriler kendi ürettikleri ekstraselüler polimerik maddeler olarak da bilinen ve bir dizi polisakkarid, nükleik asit ve protein içeren bir matriks içerisinde gömülü olarak bulunurlar (23, 24).

2.3.1. Biyofilmin Tanımı ve Tarihçesi

Mikroorganizmalar bir süre öncesine kadar, hızlı çoğalan ve tek başlarına hareket ederek serbestçe dolaşan canlılar olarak görülmekteydi. Araştırmacılar bu yüzden bugüne kadar, planktonik olarak da adlandırılan ve diğer bakterilerden bağımsız olarak, tek başlarına dolaşan mikrobiyal hücrelerin davranışlarını incelemiş ve araştırmalarını bu yönde geliştirmişlerdir. Bununla beraber, bakterilerin planktonik formdan çok, bir yüzeye tutunarak ve biyofilm adı verilen bir yapı oluşturarak hayatlarını devam ettirdiğine dair kanıtların ortaya konduğu birçok çalışma gerçekleştirilmiştir (25).

Carpentier ve Cerf bakterilerin gömülü olarak bulunduğu ve yüzeye yapışmış olan organik polimer matriks olarak tanımlamışlardır (26).

Bir yüzeyde koloniler halinde tutunarak yaşayan mikroorganizmaların oluşturdukları her tabaka biyofilm yapısının özelliklerini taşımamaktadır. Gerçek biyofilm yapısında olmayan topluluklar, bulundukları yüzeylerde planktonik hücre davranışı sergilemeye devam etmektedirler. Bunlarda biyofilm içerisindeki bakterilerde gösterilen rezistans ve irreversibl yapışma gibi özellikler bulunmamaktadır. Bununla beraber, biyofilm içerisindeki bakterilerinde zamanla matriksten koparak ayrıldıkları, dolaşıma geçtikleri ve planktonik formda olmalarına rağmen, ayrıldıkları topluluğun tüm rezistans karakterlerini taşıdığı bildirilmiştir (25).

Biyofilmler inert veya canlı yüzeylerde oluşabilirler. Bu yüzeyler arasında canlı dokular, medikal implantlar, endüstriyel veya içme suyu sistemlerinin boruları ve doğal akuatik sistemler yer alır. Biyofilm oluşumunda hücresel olmayan mineral kristalleri, korozyon partikülleri, kil veya çamur parçaları ya da kan bileşenleri bulunabilir. Biyofilm, mikroplar tarafından oluşturulan, herhangi bir yüzeye, ara yüzeye veya birbirlerine yapışmalarını sağlayan ve büyüme oranları ve gen transkripsiyonuna bağlı olarak farklı fenotip gösterebilen ve oluşturan mikroorganizmanın içinde gömülü olarak bulunduğu ekstraselüler polimerik maddeden oluşmuş matriks olarak tanımlanmıştır (25).

Fosil kayıtlarından edinilen bilgiler prokaryotların 3 milyar yıldan daha uzun bir süreden beri biyofilmler içerisinde yaşadıklarını ortaya çıkarmışlardır (27). Günümüzde derin yeraltı suları ve okyanusların derinlikleri hariç biyofilmin tüm doğal ekosistemde oluşabildiği kabul edilmektedir (28). Biyofilmler endüstriyel su ve petrol boru sistemlerinde önemli bir sorun olarak bilinirken, artık tıptaki önemi sadece disteki plaklardan ibaret olmayıp özellikle yabancı cisim infeksiyonları başta olmak üzere, birçok kronik enfeksiyonda rol oynadığı gösterilmiştir (29).

Adherans, antibiyotik direnci ve fagositoza karşı önemli rolünün olduğunun bilinmesi son yıllarda tıbbi önemini arttırırken bakterinin birbiriyle konuşarak bir topluluk oluşturmaları ve

gen modülasyonu aracılığıyla ortama adapte olmalarında rol oynaması tıbbi önemini daha da arttırmıştır (30). Mikrobiyoloji tarihinin büyük bir kısmında, mikroorganizmalar planktonik hücreler olarak görülmüş ve zengin kültür ortamlarında gösterdikleri büyüme özelliklerine göre tanımlanmışlardır. İlk olarak Van Leeuwenhoek tarafından bildirilmiş olan ‘‘mikroorganizmaların bir yüzey üzerinde tutunarak yaşayabildikleri’’ şeklindeki mikrobiyolojik fenomenin yeniden keşfedilmesi sonucu gerçekleştirilen çalışmalar, yüzeyle ilişkili mikroorganizmaların (biyofilmler) gen transkripsiyonu ve büyüme hızları açısından farklı bir fenotip gösterdiğini ortaya çıkarmaktadır (25).

Dağlardaki akarsuların içerisinde yaşayan bakterileriler incelediğinde % 99.99’unun bir yüzeye yapışarak, balçık benzeri bir yapı içerisinde yaşadıkları gösterilmiştir. Daha önce yapılan çalışmaların da ışığında, bu toplulukları tanımlamak amacıyla biyofilm terimi kullanılmıştır. Endüstriyel su sistemlerindeki mikrobiyal toplulukların sadece yüzeye kuvvetle tutunmadıklarını, aynı zamanda klor gibi dezenfektanlara karşı çok dirençli oldukları bildirilmiştir (25).

2.3.2. Biyofilm Oluşum Mekanizması

Biyofilmler cansız veya canlı yüzeylerde oluşabilirler. Bu yüzeyler arasında canlı dokular, medikal implantlar, endüstriyel veya içme suyu boru sistemleri veya doğal yaşamda yer alır. Bakteriler bir yüzeye yapıştıktan ve biyofilm oluşturduktan sonra o yüzeyden hafif durulama ile uzaklaştırılamazlar. Biyofilm matrikslerinin içerisinde hücresel olmayan mineral kristalleri, korozyon partikülleri, kil veya çamur parçaları bulunabilir (24, 25).

Bakteriler gerek in vitro gerekse in vivo ortamlarda biyofilm oluşturmak suretiyle bir dizi avantaja sahip olurlar. Biyofilmler bakterileri nem, ısı ve pH değişiklikleri gibi çevresel koşullardaki flüktüasyonların ve ultraviyole ışığa maruz kalmanın doğuracağı zararlardan korur. Besinlerin depolanmasının ve atıkların uzaklaştırılmasının kolaylaştırılması da biyofilm oluşumunun getirdiği diğer avantajlardır. Bakterilerin kümeler halinde ve ekzopolisakkarid matriks içerisinde bulunmaları sonucu fagosite edilmeleri güçleşir ve humoral immün sistem bileşenlerinin bakterilere ulaşmaları engellenmiş olur (23).

Biyofilm oluşumu bakterilerin bir yüzeye tutunmaları ile başlayan dinamik bir süreçtir. Bu tutunma sonucu biyofilm fenotipinin ortaya çıkmasına neden olan bir dizi genetik işlem başlatılır. Bakterilerin bir yüzeye tutunabilmeleri için, kendilerinin bir yüzey ile ne zaman temas kurduklarını anlamaları gereklidir. Bakteriler bu çevresel stimulusları fenotipik değişiklere çevirebilmek amacıyla, bir verici ve bir alıcıdan oluşan düzenleyici bir sisteme sahiptir. Tutunma işleminden sonra biyofilm oluşturmak yönünde farklılaşma işleminin başlaması, quorum - sensing sistemi denilen başka bir haberleşme sisteminden gelen yanıtlara bağlıdır. Bu sistem ile bakteriler çevrelerindeki bakteriyel popülasyonun

yoğunluğunu belirlerler. Bir yüzeye tutunan her bakteri, yerini belirleyen bir molekül salgılar. Yüzeye tutunan bakterilerin sayısı arttıkça, bu sinyalin lokal konsantrasyonları artmaktadır. Bu sinyal molekülünün konsantrasyonundaki artış ile birlikte, biyofilm oluşumuna yönelik işlemler başlatılmış olur. Yani, biyofilm içerisindeki bakteriler intraselüler, düşük molekül ağırlıklarına sahip haberciler aracılığıyla haberleşmektedirler. İkinci aşama ise bakterilerin yüzeye yapışma veya kuvvetli bir şekilde tutunma işlemidir. Daha sonra bakteriler mikrokoloniler haline dönüşürler. Oluşan mikrokoloniler büyürler ve kompleks, mantar şeklindeki yapılara veya kulelere dönüşürler. Çeşitli yükseklikler de kuleler oluşturan mikrokolonilerin aralarında, besinlerin ulaştırılması ve metabolik atık ürünlerin uzaklaştırılması için primitif bir dolaşım sistemi olarak görev yapan su kanalları bulunmaktadır. Biyofilm gelişiminin bir sonraki evresi ise kopma veya ayrılma evresidir. Bu evrede tek bir bakteri veya bakteri kümeleri biyofilm tabakasından koparak ortama yayılır. Bu ayrılma işlemi dış kuvvetlerin etkisiyle olabileceği gibi, biyofilm oluşum ürünlerinin bir parçası olarak tek bir hücrenin veya multiple hücrelerin emboli şeklinde kopmasının bir sonucu olarak da gerçekleşebilir (23, 31).

2.3.3. ‘‘Quorum Sensing (QS)’’ Mekanizmaları

Biyofilm oluşumu bakterilerin bir araya gelip belirli bir yüzeye tutunarak yapışmaları ve o yüzeydeki diğer türlerle birlikte yaşamaya devam ettikleri, rastgele gerçekleşen bir olay değildir. Bazı bakterilerde biyofilm oluşumunun, bakteriyel hücreden hücreye iletişim dizgeleri ile kontrol edildiği açıktır. Ökaryot ve prokaryot hücrelerden salınan ve hücreler arası sinyal iletimini sağlayarak, bakterinin gen ekspresyonunu düzenleyen moleküllerle (‘‘acylated homoserine lactonase’’ vs.), biyofilm yapımının düzenlenebileceği gösterilmiştir. Bu veriler biyofilmin patojenite ve çevreye adaptasyonda önemini arttırmıştır. Çoğunluğu algılama ‘‘quorum sensing’’ (QS) olarak adlandırabileceğimiz bu dizgeler, geniş bir organizma topluluğunda virulans etkenlerinin düzenlenmesinde de yer alırlar (32, 33).

Özellikle Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen ve "autoinducer" peptidler (AIP) olarak ifade edilen QS moleküllerinin birçoğu translasyon sonrası değişikliğe uğrayan büyük peptidlerden üretilir. AIP, Gram negatif bakterilerin aksine hücre içinden dışarıya difüzyonla değil genellikle hücre zarında bulunan ‘‘ATP-binding cassette’’ (ABC transporter) sistemince aktif olarak salgılanır. Hücre dışı QS molekülleri, ya membrana bağlı sensör kinazlara bağlanır ve hücre içinde bir veya daha fazla sayıda genin ekspresyonunu kontrol eden düzenleyicilerin fosforilasyonu yoluyla hücrede transkripsiyonel değişikliklere neden olur, ya da bazı bakterilerde olduğu gibi oligopeptid permeazlar aracılığı ile doğrudan hücre içine girerek hücre içi reseptörler ile kendileri etkileşime geçer (34).

Staphylococcus aureus'da QS moleküllerinin miktarının azlığı biyofilm oluşumunu tetiklemekte, miktarının artması ise bakterilerin biyofilmden ayrılarak invazyon yapmalarına neden olmaktadır. Ayrıca, QS inhibitörü varlığında üretilen biyofilmlerin de antibiyotik ve dezenfektanlara daha duyarlı oldukları bilinmektedir. Bir diğer ilginç nokta ise, *S. aureus*'un QS moleküllerinin *S. epidermidis* üzerinde etkisi yokken, *S. epidermidis*'in QS molekülü *S. aureus*'un epidermal invazyon yeteneğini kontrol etmektedir (34).

2.3.4. Biyofilm Mikroorganizma İlişkisi

Bakterinin vücudun herhangi bir bölgesinde sabit kalabilmesini sağlamak için bir takım stratejileri vardır. Bakteri yüzey proteinleri, konakçının fibrinojen, fibronektin, vitronektin, elastin gibi ekstrasellüler matriks proteinlerine yapışırlar. Bu adezin ve matriks proteinleri konakçı ile bakterinin adheransında anahtar rol oynarlar (35).

Adherans sonrası bakteriler bir yandan belli bir popülasyona ulaşmak için çoğalırken diğer yandan da biyofilm oluşturma özelliğine göre biyofilm yapımına başlarlar. Bakteriler gerek in vitro gerekse in vivo ortamlarda biyofilm oluşturarak bir dizi avantaja sahip olurlar (27).

1. Çevresel Faktörlere Direnç

Biyofilmler bakterileri nem, ısı ve pH değişiklikleri gibi çevresel koşullardaki değişimlerden ve ultraviyole ışığa maruz kalmanın doğuracağı zararlardan korur. Biyofilmin kan akımı ve tükürüğün yıkama gücü gibi bir takım fiziksel güçlere karşı dayanıklılığı vardır. Ortamın besin durumu dışında, sıcaklık, ozmolarite, pH, demir ve oksijen gibi diğer çevresel faktörler de biyofilm oluşumu üzerinde rol oynarlar (27).

2. Besinlerin Depolanması ve Atıkların Uzaklaştırılması

Biyofilm içerisindeki mikrokolonileri çevreleyen alanlardan geçen yüksek geçirgenliğe sahip dolaşım sistemine benzeyen su kanalları bulunmaktadır. Bu sistem hem besinlerin biyofilm içerisinde eşit bir şekilde dağıtılması, hem de potansiyel olarak toksik metabolitlerin uzaklaştırılması görevini üstlenir (27).

3. Fagositozdan ve Antibiyotiklerden Korunma

Bakterilerin kümeler halinde ve ekzopolisakkarid matriks içerisinde bulunmaları sonucu fagosite edilmeleri güçleşir ve humoral immün sistem bileşenlerinin bakterilere ulaşmaları engellenmiş olur. Biyofilmin büyük bir bölümünü oluşturan ekzopolisakkaritler savunmada önemli rol oynayan moleküllerdir. Ekzopolisakkaritler bulunduğu bakteriyi güç alanlarından (elektrik çekimi) uzaklaştırarak inflamatuar hücrelerin fagositozundan korurlar. Biyofilme sahip organizmalar, oksijen radikalleri, dezenfektanlar, fagositoza ve antibiyotiklere karşı planktonik hücrelerden daha dirençlidir. Biyofilm, kronik seyirli enfeksiyonlara bu özelliği kazandıran önemli bir faktör olduğu bilinmektedir (25).

4. Metabolik İşbirliği, Yeni Genetik Özelliklerin Kazanılması

Bakterilerin ortama adaptasyonundaki beraberlik biyofilm oluşturmada sıklıkla görülmektedir. Bakteriler biyofilm oluşturdukları gibi ortamdan aldıkları uyaranlar (besin, pH, ısı vs.) sonucu hızla da planktonik hale geçebilmektedirler. Bu durum ortama uygun olarak eksprese ettikleri genler aracılığı ile olmaktadır. Tüm bakterilerin çevre faktörlerine aynı yanıtı vermiş olmaları ve fenotipik değişiklikler sergilemeleri ortak yaşamlarının en önemli göstergesidir. Horizontal gen transferi doğal mikrobiyal toplulukların evrimi ve genetik çeşitliliği için çok önemlidir. Bu durum özellikle çoklu ilaç dirençli bakterilerin ortaya çıkmasında önemlidir. Özellikle biyofilm içerisindeki kapalı ortam konjügasyonun kolaylıkla yapılabilmesine imkân sağlamaktadır (36).

Çevreden almış olduğu sinyaller sonucunda tehlikede olduğunu algılayan bakteri mevcut genler ile biyofilm oluşturarak kendini koruma altına almaktadır. Karbon katabolitlerinin konakçıda yapışmış bakterinin gen regülasyonunu indükleyerek biyofilm oluşumunda kritik rol oynaması, bakterinin konakçıda uygun bir ortam oluşturarak kalabilmesindeki mekanizmalar için biyofilm gerekliliği hipotezini ciddi bir şekilde desteklemektedir (37).

2.3.5. Biyofilm Hastalık İlişkisi

2.3.5.1. Hücrelerin Ayrılması ve Hücre Agregatları

Hücrelerin büyümesi ve aynı zamanda çevreden gelen streslerin artması bazen biyofilm içindeki bakteriyi kopartabilmektedir. Ayrıca biyofilmin düzenleyicisi olarak bilinen açil homoserin lakton molekülü biyofilmin oluşumunu sağladığı gibi kopmaya neden olarak, dolaşım sisteminde enfeksiyona neden olabilir (32).

2.3.5.2. Endotoksin Üretimi

Biyofilm üreten Gram negatif bakteriler endotoksin üretimini arttırarak hastada daha fazla immün yanıta da neden olmaktadır. Oluşan inflamatuar yanıtın büyüklüğü enfeksiyonun şiddetini de etkilemektedir (38).

2.3.5.3. Konağın İmmün Yanıtına Direnç

Biyofilm oluşturan bakterilere karşı makrofaj fagositik aktivitesi veya yapılan opsonik antikorlar yetersizdir (39).

2.3.5.4. Bakterilere Direnç Aktarımı

Bakteride bulunan direnç genlerinin, plazmidlerin biyofilmlere konjugasyonu ile türler arasında aktarılabilmektedir (40).

2.3.6. *Staphylococcus aureus* ve Biyofilm

Staphylococcus'larda biyofilm oluşumu iki basamakta oluşur. Bakteriler ilk aşamada bir yüzeye yapışarak kolonize olurlar (erken adherans). İlk adımdan ''microbial surface components recognizing adhezive matrix molecules'' (MSCRAMM) adı verilen değişik yüzey proteinleri sorumludur. Bakteriyel yüzey proteinleri, ekstrasellüler (fibronektin, fibrinojen, vitronektin, kollajen, elastin vb.) konak-doku ligandlarına bağlanabilir ve solid yüzeylere adheransın başlamasında anahtar rol oynarlar (35, 41).

Bunu takiben ikinci basamakta hücre-hücre adhezyonu olmakta ve çok tabakalı biyofilm oluşumu şekillenmektedir (intersellüler adhezyon). *Staphylococcus*'larda biyofilm oluşumundan icaADBC operonu ve ürünü olan ''polysaccharide intercellular adhesin'' (PIA) sorumlu tutulmaktadır. icaADBC operonu ilk kez *S. epidermidis*'de bulunmuştur. Bununla birlikte *S. aureus*'da da bulunduğu ve benzer fonksiyonlar gösterdiği bildirilmiştir (35).

Staphylococcus aureus ve *S. epidermis'in* biyofilm oluşturmasında icaA ve icaD genleri daha önemli bulunmuştur. İcaADBC operonu *Staphylococcus*'larda biyofilm oluşumunun intersellüler adhezyon kısmında görev yapan PIA oluşumundaki ''poly- N-acetyl-beta-1-6–glucosamine'' (PNAG) oligomerlerini sentezlettirir (35). IcaA ve icaD genlerinin görevi UDP-N-asetil glukozamini substrat olarak kullanarak şeker oligomerleri sentezlettirmektedir. IcaA tek başına düşük N-asetilglukozamin transferaz aktivitesi gösterirken, icaB ile arasında yerleşmiş bulunan icaD geni varlığında enzim aktivitesinde belirgin artış gösterilmiştir. IcaA ve icaD geninin sentezlettiği oligomerlerin maksimum uzunluğu 20 rezidüdür. IcaC'ninde deasetilasyon basamağında görev yaparak oligomerleri uzattığı gösterilmiştir. Bu oligomerler PIA spesifik anti-serumlarla reaksiyon verebilir. IcaB'nin deasetilasyon basamağında katalizör görevi yaptığı düşünülmektedir (42).

Çeşitli bakteri türlerinin biyofilm oluşumunda yapısal bir grup yüzey proteinleri önemli bulunmuştur. Bu grubunda ilk üyesi olarak *S. aureus* mastitisli sığırdan izole edilen ''biyofilm associated protein'' (bap) biyofilm oluşumu için gerekli yapılardan birisidir. Bap genine sahip *S. aureus* suşları daha güçlü biyofilm oluştururlar. *Staphylococcus aureus*'da çeşitli MSCRAMM'larla diğer önemli yüzey bileşenleri (PIA ve bap) bir arada bulunur ve biyofilm oluşumuna katkı sağlar. Bap bakteri yüzeyinde yerleşmiş, yüksek molekül ağırlıklı, ardı ardına tekrarlayan C- domainleri içeren, bakterilere yüksek biyofilm oluşturma kapasitesi sağlayan ve infeksiyon sürecinde önemli rol oynayan 2276 aminoasitlik bir proteindir. Yapılan çalışmalarla abiyotik yüzeylere yapışma ve intersellüler adhezyon basamaklarının her ikisinde de görev yaptığı gösterilmiştir (43).

Bu adhezinlerin tespiti saflaştırılmış matriks proteinleri kullanılarak yapılabilir. Fakat bazı adhezinlerin iki veya daha fazla matriks molekülü bağlaması nedeniyle tespitinde Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) kullanılması tercih edilmektedir (43).

2.4. STAFİLOKOK İNFEKSİYONLARI

2.4.1. Hayvanlarda *Staphylococcus* İnfeksiyonları

Koagülaz pozitif *Staphylococcus*'lar sıcakkanlı hayvanların tümünde, konakçı türlerine göre değişen klinik bulgulara neden olmaktadırlar. *Staphylococcus*'lar inek, koyun ve keçilerde mastitislere; kuzularda (2-5 haftalık) kene ateşine; koyunlarda peri orbital ekzemalara (dermatitis); kedi ve köpeklerde osteomiyelitis (özellikle diskospondilit), artritis ve mastitis enfeksiyonlarına; kanatlılarda stafilokokkozis'e; domuz yavrularında eksudatif epidermitis gibi enfeksiyonlara neden olmaktadırlar (44, 45).

Çok sayıda mikroorganizma türü sığırlarda mastitise neden olmaktadır. Mastitisli inek sütlerinden, yaygınlığına göre sırasıyla *Staphylococcus*'lar (*S. aureus*, *S. epidermidis),* streptokoklar (*S. agalactiae, S. dysgalactiae*, *S. uberis, S. bovis*), koliformlar (özellikle *E. coli* ve *K. pneumoniae*), *Pseudomonas aeruginosa Mycoplasma* spp. ve *Candida* spp. izole edilmektedir (46).

Son yıllarda yapılan çalışmalarla KNS'ların sığırların meme bezinde oluşturdukları enfeksiyonların önemi vurgulanmaktadır (46). Koagülaz negatif *Staphylococcus*'lar laktasyondaki ineklerden en çok izole edilen bakteriler arasındadır. En çok izole edilen KNS'lar, *S. chromogenes*, *S. epidermidis* ve *S. simulans*'dır. Yapılan çalışmalarda mastitisli ineklerin sütlerinden, *S. xylosus*, *S. chromogenes*, *S. sciuri*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S simulans*, *S. saprophyticus*, *S. hyicus*, *S. epidermidis*, *S. felis* ve *S. lentus* gibi çok çeşitli *Staphylococcus* türleri izole edilmiştir (47).

Kedi ve köpeklerden izole edilen *Staphylococcus* türleri üzerinde yapılan çalışmalarda, en yaygın bulunan *Staphylococcus* türünün *S. intermedius* olduğu belirlenmiştir. *S. intermedius* köpeklerde piyoderma, endometritis, sistitis ve dış kulak yangısı gibi enfeksiyonlara da neden olmaktadırlar. Kedilerin çeşitli klinik örneklerinden *Staphylococcus*'lar tek başlarına ya da diğer bakterilerle birlikte izole edilebilmektedirler. Igimi ve ark. (48)'nın Tokyo da yaptıkları çalışmada kedilerin çeşitli klinik örneklerinden izole edilen 93 *Staphylococcus* suşunun biyokimyasal analizini yapmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre sırasıyla % 45 *S. felis*, % 14 *S. simulans*, % 13 *S. aureus*, % 10 *S. intermedius*, % 6 *S. sciuri*, % 6 *S. epidermidis*, % 2 *S. haemolyticus*, % 2 *S. xylosus*, % 1 *S. capitis*, % 1 *S. equorum*, % 1 *S. gallinarum* ve *S. lentus* tanımlamışlardır. Atlarda *Staphylococcus aureus* ile ilişkili olarak; mastitis, pektoral apseler (daha çok *Corynebacterium pseudotuberculosis* tarafından meydana gelirler), piyoderma ve kastrasyon sonucu oluşan apseler meydana gelmektedir (49).

Staphylococcus'lar bütün kanatlı türlerinde artritis, tenosinovitis, taban yastığı nekrozu ve civcivlerde septisemik enfeksiyonlara neden olmaktadırlar. *S. hyicus* ise domuz yavrularında (7 haftalık), çok bulaşıcı bir infeksiyon olan eksudatif epidermitis'e neden olmaktadır (50).

Domuz yavrularında (7 haftalık), *S. hyicus* tarafından eksudatif epidermitis oluşturulmaktadır. Genellikle akut generalize bir enfeksiyondur. Derinin dökülmesi ve vücut boşluklarında eksudat birikimi, hastalıkta görülen klinik bulgular arasındadır. Bulaşma domuz sürülerinde % 90'a kadar çıkabilmektedir. Ayrıca travma ile derinin bütünlüğünün bozulması sonucu *S. aureus* tarafından, deride, özellikle yüz ve kulakların etrafında lezyonlar oluşturulmaktadır (49).

2.4.2. İnsanlarda *Staphylococcus* İnfeksiyonları

Staphylococcus'lar, sahip oldukları virülens faktörleri nedeniyle insanların tüm vücut sistemlerinde infeksiyon yapabilmektedirler. *S. aureus*, deri dokusunda akne, arpacık ve furunkulozise, vücudun değişik yerlerinde apselere, osteomiyelitis, endokarditis gibi enfeksiyonlara neden olurlar. Ayrıca, *S. aureus* şirurjikal yara kaynaklı, *S. epidermidis* medikal aletlerle ilişkili olarak hastane enfeksiyonlarına (nozokomiyal) yol açabilmektedirler. *S. aureus*'un salgıladığı toksinlerin gıdalarla alınması sonucu zehirlenmeler ve yine süper antijenlerinin kana karışması ile toksik şok sendromu oluşabilmektedir. *S. saprophyticus* üriner sistem enfeksiyonlarına neden olur. *S. lugdunensis*, *S. haemolyticus, S warneri*, *S. schleiferi* ve *S. intermedius* daha az patojendirler (51, 52).

Staphylococcus aureus özellikle MRSA izolatları, hastane kaynaklı enfeksiyonların önemli bir etkenidir. Ayrıca son yıllarda nozokomiyal enfeksiyonların % 8'ini KNS'lar oluşturmaktadır. *S. epidermidis, S. haemolyticus* ve *S. warneri* türleri yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda katater ilişkili enfeksiyonlara neden olmaktadırlar (51).

Doğal kalp kapağı endokarditlerinin nedenleri arasında *S. epidermidis ve S. lugdunensis* gibi KNS'ların etkileri nadirdir. Ancak kalp kapak operasyonlarından sonra görülen endokarditlerde % 40-50 arasında etken olarak tespit edilmektedirler (51). Yeni doğanlarda göbek kordonu infeksiyonları sonrasında ya da bir odaktan hematojen yayılım sonucu, *S. aureus* tarafından oluşturulur. Daha çok çocuklarda meydana gelir ve oluşan osteomiyelit, uzun kemiklerin diyafizinde görülür (52).

2.5. ANTİBİYOTİK DİRENCİ

2.5.1. Bakteriler ve Antibiyotik Direnci

Antibiyotikler, bakteriler ve mantarlar gibi mikroorganizma türleri tarafından biyosentez edilen ve diğer mikroorganizmaları öldüren veya gelişmelerini önleyen hücre metabolizması ürünleridirler. *Pseudomonas aeruginosa* tarafından oluşturulan pyocyaneus pigmentinin

deney tüpündeki diğer bakterilerin üremesini baskıladığına dair 1880'li yıllardan gelen bulguları, Paul Erlich'in bir kimyasal olan savlarsan üzerinde yaptığı çalışmalar ve 1928'de Sir Aleksader Fleming tarafından Penicillium mantarı ile kontamine jeloz besiyerlerinde *Staphylococcus*'ların üremesinin inhibe olduğu keşfi izlemiştir. Böylece mikroorganizmalara karşı kemoterapi çağı 1930'larda sülfonamidlerin, 1940'larda penisilinlerin ve 1940'ların ortalarında streptomisinin keşfi ile başlamıştır (53).

Bundan sonraki yıllarda antibiyotikler tüm dünyada en çok kullanılan ilaçlar arasında ilk sırada yer almıştır ve her yeni antibiyotik veya antibiyotik sınıfının kullanıma girmesinden sonra dirençli mikroorganizmalar ortaya çıkmaya başlamıştır (54).

Antibiyotiklerin etki mekanizmaları birkaç grupta toplanabilmektedir (55).

1- Bakteri hücre duvarı sentezinin inhibe edilmesi ve litik enzimlerin aktive edilmesi

2- Hücre membranının permeabilitesinin artırılması

3- Ribozomlardaki protein sentezinin bozulması

4- Nükleik asit sentezinin bozulması

5- Ara metabolizmanın bozulması

Direnç, bir mikroorganizmanın (değişik örnekleri bakteri, mantar, virüs ve parazitlerde görülmektedir) antimikrobiyal bir ajanın öldürücü veya üremeyi durdurucu etkisine karşı koyabilme yeteneğidir. Bir mikroorganizma için bir antibiyotiğin Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) değerinin, dünya standartlarında (örn: CLSI) belirtilen MİK'lerinden daha yüksek bulunması durumu, antimikrobiyal direnç olarak tanımlanır. Klinik kullanım anlamıyla: patojen mikroorganizma veya suşun, ilacın kullanıldığı doz aralığında serumda (veya diğer vücut sıvılarında) meydana getirdiği yoğunlaşma düzeyinde, ilaç tarafından etkilenmemesi demektir. Doğal direnç, mikroorganizmanın tür özelliği olarak ilacın hedefi olan yapıyı taşımaması veya ilacın yapısal bir özelliğinden dolayı hedefine ulaşamamasıdır. Kazanılmış direnç, bakterinin genetik özelliklerindeki değişimlere bağlı olarak, eskiden duyarlı olduğu bir antibakteriyal maddeden etkilenmez hale gelmesidir. Genetik kaynaklı direnç kromozomal veya kromozom dışı (plazmid, transpozon, integron) elemanlara bağlıdır. Kazanılmış direncin ortaya çıkmasında değişik mekanizmalar rol oynar (56, 57).

Bunlar özetle birkaç grupta toplanabilirler:

1. İlacın hedefine ulaşamaması (porin proteinleri kaybı, aktif transport blokajı, antibiyotiğin aktif pompa sistemleriyle dışarı atılması)

2. İlaç etkinliğini gideren enzimlerin üretimi (beta-laktamazlar, aminoglikozid veya kloramfenikol direncini düzenleyen enzimler)

3. İlacın bakteri hücresindeki hedefinin değiştirilmesi (penisilin bağlayan proteinlerde değişiklikler, DNA giraz enziminin ilaca düşük affiniteli mutantlarının oluşturulması, ribozomal hedef yerinde değişiklik)

4. İlacın hedefinin dışında yeni bir metabolik yolun kullanımı (folat sentezi yerine ortamdan hazır alma)

Direnç mekanizmalarındaki hızlı artış sonucunda son yıllarda çoğul dirençli bakteriler gündeme gelmiştir. Yakın kimyasal yapıda veya farklı yapıda fakat benzer etki mekanizmasına sahip diğer kemoterapötiğe karşı olan çapraz dirençten farklı olarak, yapısı ve antibakteriyel etki mekanizması farklı birçok ilaca karşı rezistans durumu çoğul direnç olarak isimlendirilmektedir. Üç veya daha fazla antimikrobik (gram-negatiflerde seftazidim, siprofloksasin, imipenem, piperasilin ya da gentamisin) grubuna dirençli olan mikroorganizmalar "MDR- multidrug resistant" olarak tanımlanmaktadır. Bunun ortaya çıkmasında kromozomlarında veya plazmidlerinde birden fazla türde direnç geninin bulunması veya tek genin birçok ilaç türünün etkinliğine katkıda bulunan ortak mekanizmayı kontrol etmesi rol oynayabilmektedir (56, 57).

2.5.2. *Staphylococcus'ların* Genom Yapısı ve Antibiyotik Direnci

Stafilokokal genom sirküler kromozom (yaklaşık 2800 bp), profaj, plazmidler ve transpozonlar içermektedir. Virülans ve antibiyotik direnç genleri kromozomlar üzerinde bulunabildiği gibi ekstrakromozomal yapılarda da bulunabilir. Bu genler stafilokokal suşlar, türler veya diğer Gram pozitif bakteriler arasında ekstrakromozomal elementlerle transfer edilebilir (58). *Staphylococcus aureus* hastane ve toplum kaynaklı önemli infeksiyonlardan sorumludur. *Staphylococcus*'ların birçok kökeni beta-laktamaz üretmekte ve beta-laktam içeren antibiyotiklere direnç kazanmaktadır. Beta-laktamazların *Staphylococcus*'lardaki yapımı bakteriyofajlar tarafından transdüksiyon yoluyla genetik olarak aktarılabilen ekstrakromozomal bir element (plazmid) tarafından kontrol edilir. Penisilin beta-laktam halkası, bir serin proteaz olan beta-laktamaz tarafından hidrolize edilerek inaktive edilir. Penisilin duyarlı izolatlar % 5'den azdır (14, 58).

Staphylococcus'larda esas sorun giderek artan metisilin direncidir. Metisilin direnci çoğu kez kromozomal, bazen plazmid kaynaklı olabilmektedir. Metisilin direnci, bütün penisilinaz dirençli penisilinlere ve sefalosporinlerinlere direnci gösterir. *Staphylococcus aureus*, mecA geni aracılığı ile düşük affiniteli penisilin bağlayan protein 2a yaparak betalaktam ajanlara direnç gösterir. Metisilin dirençli suşların çoğu, sınırlı sayıda klondan kaynaklanırken, bazı kökenlerde multiklonal kaynaklı olabilir. Bu bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonlarda yaygın olarak vankomisin kullanılır. Bla (beta-laktamaz) ve fem (metisilin rezistansında gerekli faktör) diğer direnç genleridir. Metisilin rezistansı sıklıkla heterojendir ve çevre koşullarındaki

değişikliklere göre direnç fenotipi ifade edilir. Antimikrobiyal duyarlılık testleri, direnç fenotiplerinin saptanmasını arttırmak için düzenlenmiştir (9, 21, 58).

Glikopeptid ajanlar (vankomisin ve teikoplanin) MRSA dahil Gram pozitif patojenlere karşı etkilidir. Glikopeptidler peptidoglikan prekürsörün pentapeptidinin C terminalinde D-ala-D-ala bölgesine bağlanarak transglikolizasyon ve transpeptidasyonu engellerler. Bugüne kadar Japonya'dan bir ve ABD'den üç vankomisin orta derece dirençli ve dirençli *S. aureus* klinik izolatı bildirilmiştir. Bu izolatlardan, vankomisin dirençli *Enterococcus faecium* suşundan plazmidle aktarılan vanA geni elde edilmiştir. Enterokoklarda glikopeptid direncine D-ala-D-ala yerine modifiye prekürsörler sentezlemesi neden olur ve glikopeptidlere 1000 kez daha düşük affinite gösterirler (58).

2.5.3. Biyofilm ve Antibiyotik Direnci

Doğal ve kazanılmış immun yanıtı sağlam bireylerde bile, biyofilme bağlı enfeksiyonlar nadiren düzelir. Gerçekte, biyofilme bitişik dokular, immun kompleks ve nötrofillerin istilasına bağlı yandaş hasar geçirebilir. İn vitro biyofilm modellerinde çalışılan duyarlılık testlerinde, minimal inhibitör konsantrasyonun yüzlerce hatta bin katı konsantrasyonda antibiyotik tedavisi sonrası bakteriyel biyofilmin sağ kalımı gösterilmiştir (59).

İn vivo olarak antibiyotikler, bağlı populasyondan dökülen serbest bakterileri öldürerek infeksiyon semptomlarını baskılayabilirler, ancak halen biyofilme gömülü olan bakteriyel hücreleri eradike etmekte yetersizdirler. Biyofilm, antibiyotik tedavisi sonlandırıldığında enfeksiyonun tekrarı için bir odak oluşturur. Biyofilm infeksiyonları, kolonize yüzeyin cerrahi olarak çıkarılmasına kadar sıklıkla tekrar eder (60). Biyofilm içindeki bakteriler antibiyotiklere planktonik yandaşlarından yaklaşık 1000 kat daha dirençlidirler (59).

Antibiyotik direncinin effluks pompası, enzim modifikasyonu ve hedef mutasyonu gibi bilinen mekanizmaları biyofilmdeki bakterinin korunmasında rol oynamaz. Hatta genetik olarak dirençli olmadığı bilinen bakteriler bile biyofilm formunda bulunduklarında azalmış duyarlılık gösterirler. Bakteriler biyofilmden ayrıldıkları zaman sıklıkla antibiyotiklere duyarlı hale gelirler bu da biyofilmdeki bakterilerin mutasyon veya taşınabilir genetik parçalar yoluyla direnç kazanmadığını düşündürür. Bakteriyel biyofilmlerin antibiyotik direncinde ilk hipotez, antibiyotiklerin biyofilm içine yavaşlamış ya da yetersiz geçişidir (60).

Biyofilm matriksi antibiyotiklerin biyofilm boyunca difüzyonunu sınırlayan, moleküllerin biyofilmde öldürmek için yetersiz birikimi ile sonuçlanan fiziksel bir bariyer rolü oynayabilir. Ancak antibiyotikler gibi küçük moleküller için, matriks difüzyon sınırlaması göstermez ve gerçekte birçok antibiyotik biyofilm boyunca serbestçe geçebilir. Diğer yandan negatif yüklü olan biyofilm matriksi, pozitif yük taşıyan aminoglikozidler gibi bazı antibiyotiklerin geçişini geciktirir. Örneğin, tobramisinin *P. aeruginosa* biyofilmi boyunca penetrasyonu 36 saatlik

deneyin ilk 12 saati süresince tamamen gecikmiş, buna karşılık siprofloksasin biyofilm boyunca ilk 12 saatte tam olarak geçmiştir. Yine de 36 saatte tobramisinin % 40'ının diffüze olması, önce matriksin bağlanma kapasitesinin aşıldığı ve serbest difüzyonun bunu izlediğinin göstergesidir (61).

β- laktam antibiyotikler, β-laktamaz üreten biyofilm bakterileri tarafından aktif olarak azaltılırlar. Anderl ve ark. (62)'nın yaptığı bir çalışmada, ampisilinin, β-laktamaz mutant *K. pneumoniae* tarafından yapılan biyofilmden diffüze olurken, β-laktamaz üreten suşlara ait biyofilmden diffüze olmamasının, antibiyotiğin enzim ile azaltılmasının biyofilme diffüzyonundan daha hızlı olduğunu düşündürmüştür.

Biyofilmin fiziksel bariyer oluşturma özelliğinin, özellikle vankomisin ve teikoplanin gibi glikopeptidlerin geçişinin engellenmesi ve vankomisinin, gentamisin ile olan sinerjistik etkisinin bozulmasında en önemli mekanizma olduğu gösterilmiştir. İkinci hipotez biyofilm içindeki değişmiş kimyasal mikro çevreye dayanır. Bu hipotez, besin ve oksijen kısıtlılığı sonucunda biyofilmde yavaş büyüme ve düşük metabolik aktivitenin antibiyotik toleransına yol açtığını öne sürer. Mikroelektrod ile yapılan çalışmalar göstermiştir ki, oksijen biyofilmin yüzey tabakalarında tamamen tüketilir ve bu durum biyofilmin derin tabakalarında anaerobik ortam oluşumuna yol açar. Böylece derin katlardaki biyofilm anaerob bir çevrede yaşar (61, 62). Anaerob koşullar hem aminoglikozidlerin hem de florokinolonların etkinliğini azaltır ki bu da oksijen kısıtlılığının antibiyotik toleransını kolaylaştırabileceğine işaret eder. Ek olarak, asidik artık ürünlerin lokal birikimi esas sıvı ile biyofilmin içi arasında 1'den fazla pH farklılığına yol açar ve direkt olarak antibiyotik etkisini antagonize eder. Bundan başka, biyofilm içindeki ozmotik çevre değiştirilebilir ve böylece ozmotik stres yanıtı indüklenir Böyle bir yanıt porinlerin oranını değiştirip hücre zarfının antibiyotiklere geçirgenliğini azaltarak antibiyotik direncine katkıda bulunabilir (60, 63).

Antimikrobiyal ajanlara karşı biyofilm direncini açıklayan üçüncü hipotez, biyofilm ilişkili hücrelerin planktonik hücrelerden anlamlı olarak daha yavaş büyüdüğü ve sonuç olarak antimikrobiyal ajanı daha yavaş tuttuğu şeklindedir. Bir substratın yokluğu ya da inhibitör bir artık ürünün birikmesi bazı bakterilerin gelişiminin durmasına ve öldürülmekten korunmasına yol açar. Örnek olarak; hücre duvarı sentezini hedefleyen penisilin antibiyotikler yalnızca büyümekte olan bakterileri öldürebilirler (60). DuGuid ve ark. (64), *S. epidermidis* biyofilm büyüme hızlarının antibiyotik duyarlılığını kuvvetle etkilediğini; hücre büyüme hızı ne kadar yüksekse, siprofloksasinle inaktivasyon hızının o kadar yüksek olduğunu göstermişlerdir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Numuneler

Erzincan'da tüketime sunulan 100 adet Erzincan tulum peyniri araştırmanın materyalini oluşturdu. Toplanan peynirler satışı yapılan büyük ve küçük marketlerden aseptik koşullarda 200 gram olacak şekilde steril torbalara alınarak soğuk zincirde laboratuvara getirildi.

3.1.2. Besiyerleri

3.1.2.1. İzolasyon Besiyerleri

3.1.2.1.1. Baird-Parker Agar Base (Merck 1.05406)

Peptone from casein	10,0 g/L
Meat extract	5,0 g/L
Yeast extract	1,0 g/L
Sodium pyruvate	10,0 g/L
Glycine	12,0 g/L
Lithium chloride	5,0 g/L
Agar-agar	15,0 g/L

Dehidre besiyeri 58,0 g tartılarak 950 mL damıtık su içinde 1-2 dk kaynatılarak tümüyle çözündürüldü ve otoklavda 121 ^{o}C'de 15 dakika sterilize edildi. Bazal besiyeri 45 ^{o}C'a soğutuldu ve manyetik karıştırıcıda yavaşça karıştırılırken üzerine önceden oda sıcaklığına getirilmiş 50 ml yumurta sarısı-tellurit emülsiyonu (Merck 1.03785) ilave edildi (65).

3.1.2.2. İdentifikasyon Besiyerleri

3.1.2.2.1. Blood Agar Base (Merck 1.10886)

Nutrient substrate	20,0 g/L
NaCl	5,0 g/L
Agar-agar	15,0 g/L

Dehidre besiyeri 40 g olacak şekilde 1 L damıtık su içinde 1-2 dk kaynatılarak tümüyle çözündürüldü ve otoklavda 121 ^{o}C'de 15 dakika sterilize edildi. Bazal besiyeri 45 ^{o}C'a soğutuldu ve manyetik karıştırıcıda yavaşça karıştırılırken üzerine steril defibrine koyun kanı % 5 oranında ilave edildi (65).

3.1.2.2.2. Kongo Red Agar (CRA)

Brain Heart Infusion Broth (Merck 1.10493)	37,0 g/L
Sucrose	50,0 g/L
Agar	10,0 g/L
Kongo Red	0,8 g/L

Karışım damıtık su ile sulandırılarak 1 lt'lik süspansiyon hazırlandı. 1-2 dk kaynatılarak tümüyle çözündürüldü. 121 ^{o}C'de 15 dk otoklavlanıp 55 ^{o}C'ye soğutulduktan sonra petri kutularına dökülerek besiyeri kullanıma hazır hale getirildi (66).

3.1.2.2.3. Tripton Soya Agar (Merck 1.05458)

Peptone from casein	15,0 g/L
Peptone from soymeal	5,0 g/L
NaCl	5,0 g/L
Agar-agar	15,0 g/L

Dehidre besiyeri, 40,0 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritildi. Otoklavda 121 ^{o}C'de 15 dakika sterilize edildi (65).

3.1.2.2.4. Brain Heart Broth (Merck 1.10493)

Nutrient Substrate	27,5 g/L
D(+) Glucose	2,0 g/L
NaCl	5,0 g/L
Na_2HPO_4	2,5 g/L

Dehidre besiyeri, 37,0 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritildi. Deney tüplerine dağıtıldı ve otoklavda 121 ^{o}C'de 15 dakika sterilize edildi (65).

3.1.2.2.5. Mueller Hinton Agar (Merck 1.05437)

Infusion from meat	2,0 g/L
Casein hydrolysate	17,5 g/L
Starch	1,5 g/L
Agar-agar	13,0 g/L

Dehidre besiyeri 34,0 g/L olacak şekilde 1 L damıtık su içinde ısıtılarak eritildi. Otoklavda 121 ^{o}C'de 15 dakika sterilize edildi (67).

3.1.2.3. Solüsyonlar

3.1.2.3.1. Peptonlu Fizyolojik Su (Merck 1.07214)

Pepton	1,0 g/L
NaCl	85,0 g/L
Distile Su	1000 ml

Karışım 121 ^{o}C'da 15 dakika sterilize edildikten sonra kullanıldı (65).

3.1.2.3.2. Bactident Coagulase (Merck 1.13306)

EDTA ilave edilmiş liyofilize tavşan plazmasıdır. Bactident Coagulase Rabbit Plasma 3 ml steril distile su ile rehidratize edildi. Steril koagulasyon tüplerine 0,3 ml plazma konularak hazırlandı (65).

3.1.3. Antibiyotik Diskleri

Oksasilin (Oxoid CT159B)	1 µg
Sefoksitin (Oxoid CT119B)	30 µg
Vankomisin (Oxoid CT058B)	30 µg
Amoksisilin-klavulonik asit (Oxoid CT223B)	20 µg
Penisilin (Oxoid CT043B)	10 units

3.1.4. Primerler

*Staphylococcus aureus'*un izolasyonu amacıyla kullanılan primer:

nuc primer F : 5'- AGCCAAGCCTTGACGAACTAA - 3'

nuc primer R : 5'- GCGATTGATGGTGATACGGTT - 3'

Metisilin dirençliliğinin saptanmasında kullanılan primer:

mec A primer F : 5'- AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC - 3'

mec A primer R : 5'- AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC - 3'

Vankomisin dirençliliğinin saptanmasında kullanılan primerler:

vanA F : 5' CATGAATAGAATAAAAGTTGCAATA 3'

vanA R : 5' CCCCTTTAACGCTAATAC GACGATCAA 3'

vanB F : 5' GTGACAAACCGGAGGCGAGGA 3'

vanB R : 5' CCGCCATCCTCCTGCAAAAAA 3'

3.1.5. Kontrol Suşları

Staphylococcus aureus ATCC 46300 (mecA +)

Staphylococcus aureus ATCC 1065 (mecA -)

Escherichia coli ATCC 11230 (nuc -)

Enterobacter faecium ATCC 51559 (vanA +)

Enterobacter faecalis ATCC 700802 (vanB +)

3.2. YÖNTEM

3.2.1*. Staphylococcus aureus*'un İzolasyonu

Tulum peyniri örneklerinden bütünü temsil edecek şekilde 10'ar g örnek steril stomacher poşetlerine konuldu. Üzerine 90'ar ml % 0,1'lik steril peptonlu su ilave edildikten sonra en az 3 dakika olmak üzere stomacher'da homojenize edildi. Bu homojenattan1'er ml alınarak içerisinde 9'ar ml peptonlu su bulunan tüplere aktarıldı bir örnekte bulunan bakteri yoğunluğu bilinmediği için kolonilerin yapısının net olarak saptanması amacıyla desimal dilüsyonları yapıldı. Dilüsyonlardan yayma plak tekniği kullanılarak 0.1 ml Baird-Parker Agara ekimler yapıldı ve plaklar 37 ^{o}C'de 24-48 saat süre ile aerob ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında üreme saptanan plaklarda üreyen şüpheli tipik (yuvarlak 2–3 mm çapında düzgün kenarlı konveks gri–siyah renkli, etrafında şeffaf zon bulunan tipik) ve/veya atipik koloniler incelemeye alındı (65, 68).

3.2.2*. Staphylococcus aureus*'un İdentifikasyonu

3.2.2.1. Fenotipik Yöntemler

3.2.2.1.1. Gram Boyama Yöntemi

Baird Parker'da üreyen şüpheli koloniler bir lam üzerine damlatılan peptonlu fizyolojik tuzlu su içerisinde iyice homojenize edildi. Preparat havada kurutulduktan sonra üç kez alevden geçirilerek tespit işlemi gerçekleştirildi. Preparat kristal moru çözeltisi (GBL 5026/01) ile 2-3 dakika boyandı. Boya dökülerek distile su ile yıkandı. Daha sonra iyot çözeltisi (GBL 5026/02) 1-2 dakika boyandı. Boya dökülerek distile su ile yıkandı. Preparatın üzerine damla damla aseton alkol çözeltisi (GBL 5026/03) damlatılarak dekolore edildi. Distile su ile yıkandı ve safranin çözeltisi (GBL 5026/03) ile 30 saniye boyandı. Preparat distile su ile yıkandı ve kurutuldu. İmmersiyon objektifte incelendi (14).

3.2.2.1.2. Hemoliz Testi

Baird Parker Agardan izole edilen tipik ve atipik kolonilerden alınarak, hazırlanan kanlı agara tek koloni olacak şekilde ekim yapılarak saf kültürleri elde edildi. 37 ^{o}C'de 24 saat

inkübasyon sonunda oluşan koloniler etrafında zon oluşumunun gözlenmesi hemoliz pozitif olarak değerlendirildi (65).

3.2.2.1.3. Koagulaz testi

Hemoliz pozitif olarak tespit edilen suşlardan steril öze ile alınan tek koloni Tryptone Soya Agar'a alınarak 37 ^{o}C'de 24 saat aerob ortamda inkübe edildi ve koagulaz pozitif stafilokokların saptanması için katı besi yerlerindeki izolatlar Brain Hearth Infusion Broth'lara geçilerek 24 saat 37 ^{o}C'de aerob ortamda inkübasyona bırakıldı. Hazırlanan liyofilize tavşan plazmasına Brain Heart Infusion Broth'da üremiş olan kültür süspansiyonundan ilave edildi. Tüpler 37 ^{o}C'de inkübasyona bırakıldı ve ilk 6 saat boyunca her saat koagulasyonun saptanması amacıyla kontrol edildi. Koagulasyon saptanmayan tüpler 24 saat inkubasyonda tutuldu. Test sonucunda reaksiyon veren izolatlar koagulaz pozitif stafilokok (*Staphylococcus aureus*) olarak değerlendirildi (65, 68).

3.2.2.2. Genotipik Yöntemler

3.2.2.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile nuc geni saptanması

PZR koşullarının optimizasyonunu takiben, Maes ve ark. (69), tarafından önerilen protokol gereği, nuc gen sekansını oluşturan primer çiftleri kullanılarak PZR işlemi yapıldı (69).

3.2.2.2.2. DNA Ekstraksiyon Yöntemi

DNA ekstraksiyonu fenol / kloroform ekstraksiyon yöntemiyle yapıldı (70).

3.2.2.2.3. Fenol / Kloroform Ekstraksiyon Yöntemi

Kanlı agarda saf kültür olarak elde edilen *Staphylococcus aureus* izolatları 500 µl distile suda süspanse edildi ve 11,000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atıldıktan sonra üzerine 100 µl solüsyon (20 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA [pH 8,0]) ve 250 µg lizostafin ilave edildi. Örnekler 37 ºC'de 4 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 200 µl distile su ilave edilerek ve 95 ºC'de 5 dakika su banyosunda bekletildi. Üzerine 300 µl fenol: kloroform: izoamil alkol (25: 24: 1) karışımı ilave edilerek 10 dakika vortekslendi. Örnekler 10 dk buz içerisinde bekletildi. 11,000 rpm ve 4 ºC' de 10 dakika süreyle santrifüjlendi. Süpernatant pipet yardımı ile alınarak yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine 500 µl kloroform eklendi. Tüpler tekrar 10 dakika vortekslendi ve aynı şekilde santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Süpernatant pipet yardımı ile yeni bir tüpe aktarıldı. Üzerine 1000 µl % 99'luk etil alkol ve 50 µl sodyum asetat ilave edilerek bir gece -20 ºC'de bekletildi. Süre sonunda tüp 11,000 rpm'de, 4 ºC'de 5 dk santrifüjlendi. Üzerine 1000 µl % 70'lik etil alkol ilave edilerek bir kez daha yıkandı. Sonra tekrar 11,000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi ve süpernatant döküldü. Tüp kurutulduktan sonra üzerine 100 µl distile su veya TE tampon (10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0]) konularak 37 ºC'de 10 dakika inkübe edildi (71).

3.2.2.2.4. Reaksiyon Karışımının Hazırlanması

Analizde nuc primer dizisi kullanıldı ve 279 bp DNA fragmanı izlenmesi amaçlandı. Bir test için gerekli olan reaksiyon karışımı bileşenleri ve miktarları aşağıda belirtildiği gibi hazırlandı. Her bileşen örnek sayısı ile çarpılarak hazırlanacak miktar belirlendi.

3.2.2.2.5. PZR ile nuc Geni Tespiti için Reaksiyon Karışımı

Reaksiyon karışımı	Volüm
$MgCl_2$ (Sigma)	2 mM
dNTP (Sigma)	250 µM
Primerler 20 pmol/µl (Sigma) her bir primerden	0,4 µM
Taq polimeraz (Sigma)	2 U
DNA	5ul

3.2.2.2.6. Bakteri DNA'sının Çoğaltılması

Amplifikasyon işlemi thermalcycler (Techne, UK)'da 30 siklus'da gerçekleştirildi.

3.2.2.2.7. Amplifikasyon Döngüsü

1	Başlangıç denatürasyonu	94 °C	5 dakika
2	Denatürasyon	94 °C	1 dakika
3	Bağlanma	51 °C	1 dakika
4	Uzama	72 °C	2 dakika
5	Son uzama	72 °C	2 dakika

3.2.2.2.8. Bakteri DNA'sının Gösterilmesi

Ürünler 6 µM ethidium bromid ile boyanarak 120 V'da 40 dakika elektroforez (Thermo, USA) uygulandı ve UV-transilluminatör (Vilber Lourmat, France) altında incelendi. 279 bp gen ürünü varlığı açısından değerlendirildi. nuc (-) kontrol suşu olarak *E. coli* ATCC 11230 kullanıldı (69).

3.2.3. Disk Difüzyon Yöntemi Antibiyotiklere Karşı Direnç Araştırılması

Bakteri süspansiyonu, Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda 24 saatlik bakteri kültüründen % 0,9'luk NaCl içinde 0.5 McFarland (1×10^8 CFU/ml) bulanıklığına eşit olacak şekilde direkt koloni süspansiyonu yöntemi ile hazırlandı. Hücre konsantrasyonunu ölçmede densitometre cihazından (Den-1, Latvia) yararlanıldı. Süspansiyondan Mueller-Hinton Agar (Oxoid CM337) yüzeyine eküvyon yardımıyla yayıldı.

Besiyeri yüzeyi kuruduktan sonra oksasilin, sefoksitin, vankomisin, amoksisilin-klavulonik asit ve penisilin diskleri yerleştirildi. Mueller Hinton agarlar 35 ^{o}C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra oluşan disklerin zon çapları ölçüldü. Sonuçlar CLSI'nün belirlediği standartlar esas alınarak değerlendirildi (67).

Clinical Laboratory Standards Institute (67)'nün önerileri doğrultusunda oksasilin (1µg) dirençliliği aynı zamanda metisilin dirençliliğini de belirlediğinden metisilin direnci araştırmasında oksasilin (1µg) antibiyotik diski kullanıldı.

3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Metisilin Direnci Saptanması

Bu yöntem nuc geninin saptanmasında uygulanan prosedürler aynen gerçekleştirildi. 533 bp DNA fragmanı izlenmesi amaçlandı. Testte mecA (+) kontrol olarak *S. aureus* ATCC 46300, mecA (-) kontrol olarak *S. aureus* ATCC 1065 suşları kullanıldı (69).

3.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Vankomisin Direnci Saptanması

PZR koşullarının optimizasyonunu takiben Clark ve ark. (72) tarafından önerilen protokol gereği, vanA ve vanB gen sekansını oluşturan primer çiftleri (Sigma) kullanılarak PZR işlemi yapıldı (72).

3.2.5.1. Reaksiyon Karışımının Hazırlanması

Reaksiyonda vanA ve vanB primer dizileri kullanıldı ve vanA için 1030 bp, vanB için 433 bp'lik DNA fragmanı izlenmesi amaçlandı. Bir test için gerekli olan reaksiyon karışımı bileşenleri ve miktarları aşağıda belirtildiği gibi hazırlandı. Her bileşen örnek sayısı ile çarpılarak hazırlanacak miktar belirlendi.

3.2.5.2. PZR ile vanA ve vanB Genleri Tespiti için Reaksiyon Karışımı

Reaksiyon karışımı	Volüm
Taq polimeraz (Sigma)	2,5 U
KCl	50 mM
Tris-HCl (pH 8.3)	10 mM
dNTP mix (Sigma)	0,2 mM
Primerler(Sigma) her bir primerden	0,5 µM
$MgCl_2$	1,5 mM
DNA	5 µl

3.2.5.3. Bakteri DNA'sının Çoğaltılması

Amplifikasyon işlemi thermalcycler (Techne, UK)'da 30 siklus da gerçekleştirildi.

3.2.5.4. Amplifikasyon Döngüsü

1	Başlangıç denaturasyonu	94 °C	10 dakika
2	Denaturasyon	94 °C	30 saniye
3	Bağlanma	58 °C	30 saniye
4	Uzama	72 °C	30 saniye
5	Son uzama	72 °C	10 dakika

3.2.5.5. Bakteri DNA'sının Gösterilmesi

PZR ürünlerine % 1,8'lik agaroz jelde 10 µl ethidium bromid ile boyanarak 110 V'da 1 saat elektroforez (Thermo, USA) uygulandı. UV-transilluminatör (Vilber Lourmat, France) altında incelendi. 1030 bp'de vanA, 433 bp'de vanB pozitif olarak değerlendirildi (72). Pozitif kontrol olarak *E. faecium* ATCC 51559 (vanA), *E. faecalis* ATCC 700802 (vanB) suşları kullanıldı (73).

3.2.6. Biyofilm Oluşturma Özelliğinin Saptanması

Freeman ve ark. (66), tarafından geliştirilen Kongo Red Agar (CRA) metodu kullanılarak Slime pozitiflik arandı. *Staphylococcus aureus* olarak izole edilen kolonilerden CRA'a tek koloni düşecek şekilde ekim yapıldı. 37 ^{o}C'de 24 saat inkübasyon sonunda oluşan siyah renkli koloniler biyofilm pozitif olarak değerlendirildi (66).

3.2.7. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken istatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences for Windows 16.0) programı kullanıldı. Tamamlayıcı istatiksel yöntemlerden olan frekans dağılımlarının yanı sıra niteliksel verilerin karşılaştırılmasında Ki-Kare istatistiki yöntemine göre yapıldı. Sonuçlar %95'lik güven aralığında $P<0,05$ düzeyinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. *STAPHYLOCOCCUS* SPP. İZOLASYONU

Erzincan'da tüketime sunulan 100 adet tulum peynirinden Baird Parker Agar'a yapılan ekimler sonucu 72 numunede *Staphylococcus* spp. Pozitif bulundu (Tablo 4.1.).

Tablo 4.1. Baird Parker'e yapılan ekimler sonucu pozitiflik oranı

Numune Cinsi	Numune Sayısı	Pozitif Numune Sayısı (%)
Erzincan Tulum Peyniri	100	72 (% 72)

4.2. *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* İDENTİFİKASYONU

4.2.1. Fenotipik Test Sonuçları

4.2.1.1. Gram Boyama Sonuçları

Yapılan Gram boyama sonucu 72 adet numunenin tümü Gram pozitif ve kok olarak gözlemlendi (Tablo 4.2.).

4.2.1.2. Hemoliz Test Sonucu

Tulum peynirinden konvansiyonel yöntem ile izole edilen 72 adet *Staphylococcus* spp. izolatına yapılan hemoliz testi sonucu 63 (% 87,50)'ünün hemoliz pozitif olduğu tespit edildi (Tablo 4.3.).

Tablo 4.2. Hemoliz test sonuçları

Bakteri	İzolat Sayısı	Pozitiflik Oranı (%)
Staphylococcus spp.	72	63 (% 87,50)

4.2.1.3. Koagülaz Pozitif *Staphylococcus aureus* İzolasyonu

Hemoliz testi sonucu pozitif olan 72 *Staphylococcus* spp. izolatından 61 (% 96,82)'i koagülaz pozitif *Staphylococcus aureus* olarak identifiye edildi (Tablo 4.4.).

Tablo 4.3. Koagülaz pozitif *Staphylococcus aureus* identifikasyon test sonuçları

Bakteri	İzolat Sayısı	Pozitiflik Oranı (%)
Staphylococcus aureus	72	61 (% 96,82)

4.2.2.Genotipik Test Sonuçları

4.2.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile nuc Geni Saptanması

Tablo 4.4. PZR ile nuc geni sonuçları

Bakteri	İzolat Sayısı	Pozitiflik Oranı (%)
Staphylococcus aureus	61	nuc
		61 (% 100)

4.2. Antibiyotik Dirençlilik Test Sonuçları

4.2.1. Fenotipik Antibiyotik Dirençliliği Sonuçları

Test edilen 61 (% 96,82) *Staphylococcus aureus* izolatının 9 (% 14,75)'unda oksasilin, 8 (% 13,11)'inde sefoksitin, 4 (% 6,55)'ünde amoksisilin-klavulonik asit ve 28 (% 45,90)'inde penisilin dirençliliği saptandı (Tablo 4.5.).

Tablo 4.5. *Staphylococcus aureus*'larda antibiyotiklere karşı direnç oranları.

Bakteri	İzolat Sayısı	Pozitiflik Oranı (%)				
		Oksasilin (metisilin)	Sefoksitin	Vankomisin	Amoksisilin-Klavulonik Asit	Penisilin
Staphylococcus aureus	61	9 (% 14,75)	8 (% 13,11)	0 (% 0)	4 (% 6,55)	28 (% 45,90)

4.2.1.1. Biyofilm Pozitif *Staphylococcus aureus*'larda Antibiyotiklere Karşı Dirençliliklerinin Araştırılması

Araştırmamızda biyofilm pozitif olarak identifiye edilen 37 (% 60,65) izolattan 9 (% 24,32)'unda oksasilin, 8 (% 21,62)'inde sefoksitin, 4 (% 10,81)'ünde amoksisilin-klavulonik asit ve 25 (% 67,56)'inde penisilin dirençliliği fenotipik olarak saptanırken vankomisin direnci tespit edilememiştir (Tablo 4.6.).

Tablo 4.6. Biyofilm pozitif *Staphylococcus aureus*'larda antibiyotik direnç analiz sonuçları

Antibiyotik	Biyofilm Pozitif 37 (% 60,65)		Biyofilm negatif 24 (% 39,25)		Toplam 61 (% 100)		P*<0,05 anlamlı
	Dirençli	Duyarlı	Dirençli	Duyarlı	Dirençli	Duyarlı	
Oksasilin	9 (% 24,32)	28 (% 75,68)	0 (% 0)	24 (% 100)	9 (% 14,75)	52 (% 82.25)	P*=0,05
Sefoksitin	8 (% 21,62)	29 (% 78,38)	0 (% 0)	24 (% 100)	8 (% 13,11)	53 (% 86,89)	P=0,06
Vankomisin	0 (% 0)	37 (% 100)	0 (% 0)	24 (% 100)	0 (% 0)	61 (% 100)	P=0,19
Amoksisilin-Klavulonik Asit	4 (% 10,81)	33 (% 89,19)	0 (% 0)	24 (% 100)	4 (% 6,55)	57 (% 93,45)	P=0,11
Penisilin	25 (% 67,56)	12 (% 32,44)	3 (% 12,50)	21 (% 87,50)	28 (% 45,90)	33 (% 54,10)	P*=0,01

4.2.2. Genotipik Antibiyotik Dirençliliği Sonuçları

4.2.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle mecA geni Saptanması

Yapılan moleküler analizler sonucu *Staphylococcus aureus* izolatlarının 10 (% 16,39)'unda mecA geni varlığı belirlendi (Tablo 4.6.).

Tablo 4.7. *Staphylococcus aureus*'larda Genotipik Olarak Metisilin Direnci Analiz Sonuçları

Bakteri	İzolat Sayısı	Pozitiflik Oranı (%)
Staphylococcus aureus	61	mecA
		10 (% 16,39)

4.2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle vanA ve vanB geni Saptanması

Yapılan moleküler analizler sonucu *Staphylococcus aureus* izolatlarının hiç birinde vanA ve vanB geni bulunmadı (Tablo 4.8.).

Tablo 4.8. *Staphylococcus aureus*'larda Genotipik Olarak Vankomisin Direnci Analiz Sonuçları

Bakteri	**İzolat Sayısı**	**Pozitiflik Oranı (%)**	
Staphylococcus aureus	61	vanA	vanB
		0	0

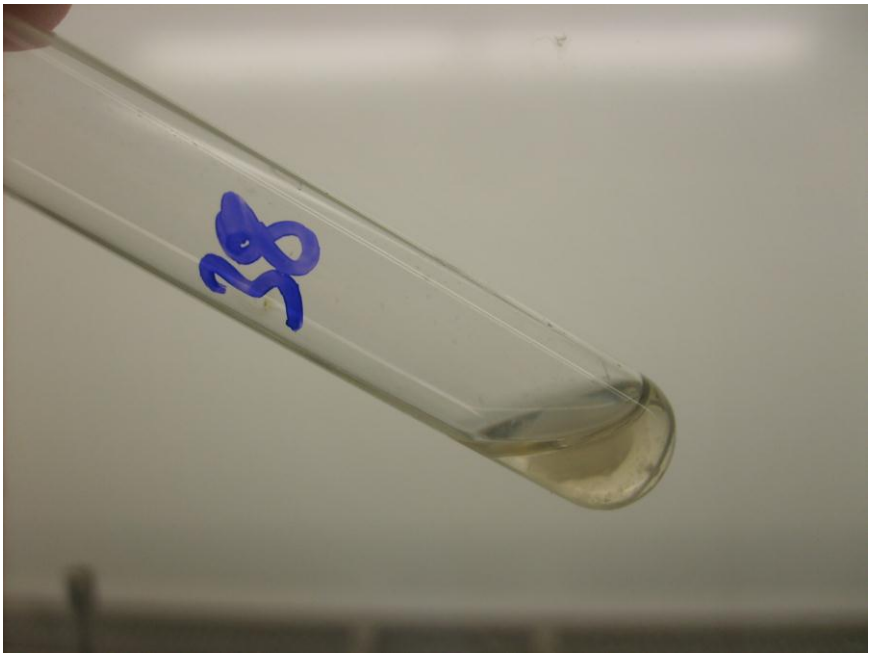
4.3. BIYOFILM TEST SONUCU

İdentifiye edilen 61 adet *Staphylococcus aureus* izolatından 37 (% 60,65)'si biyofilm oluşturma özelliği yönünden pozitif bulundu (Tablo 4.9.).

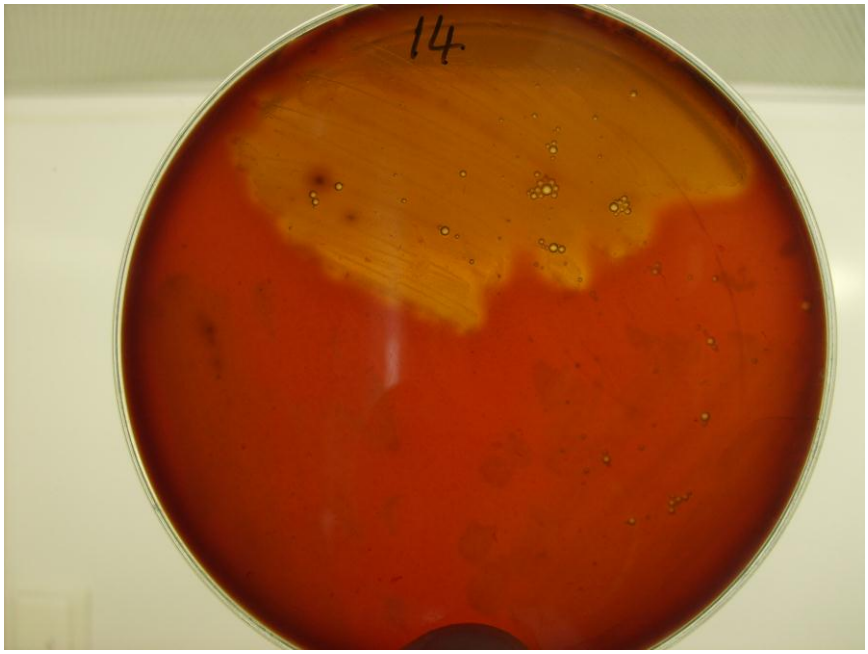
Tablo 4.9. Biyofilm pozitif *Staphylococcus aureus* identifikasyon test sonuçları

Bakteri	**İzolat Sayısı**	**Pozitiflik Oranı (%)**
Staphylococcus aureus	61	37 (% 60,65)

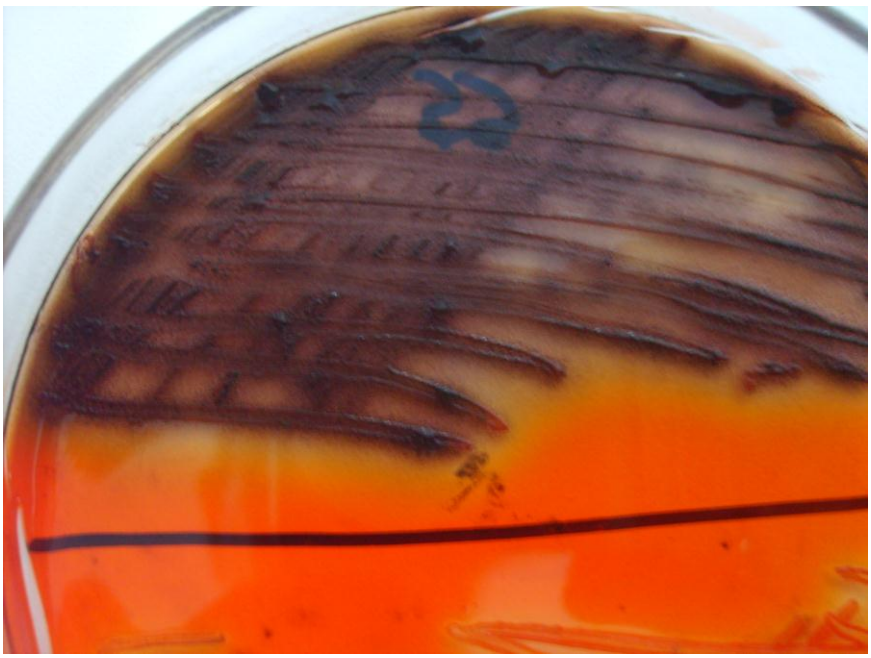
Şekil 4.1. Braid Parker Agar'da *Staphylococcus* spp. Kolonilerinin Görünümü



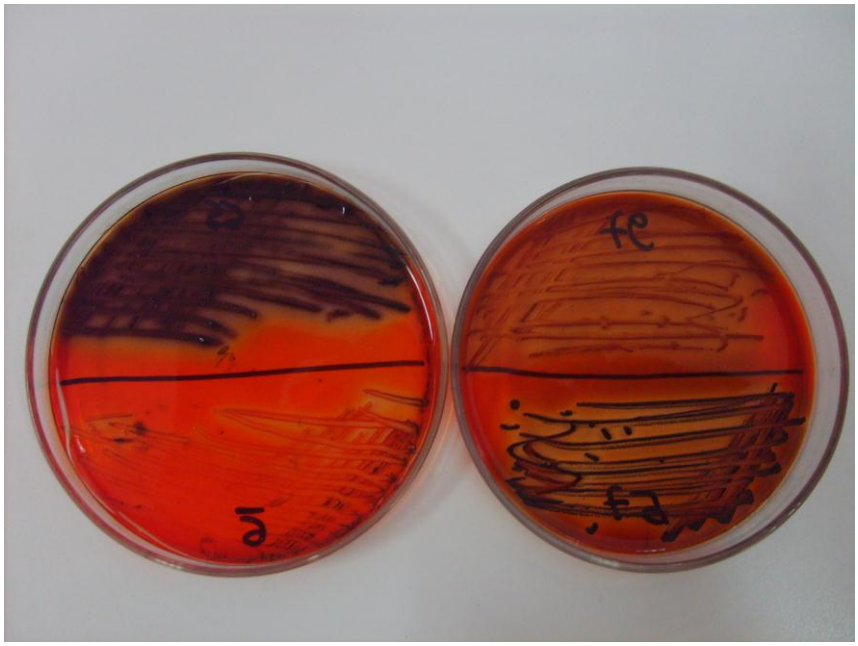
Şekil 4.2. Koagülaz Pozitif *Staphylococcus*'ların Tüp Aglütinasyon Testi Görünümü



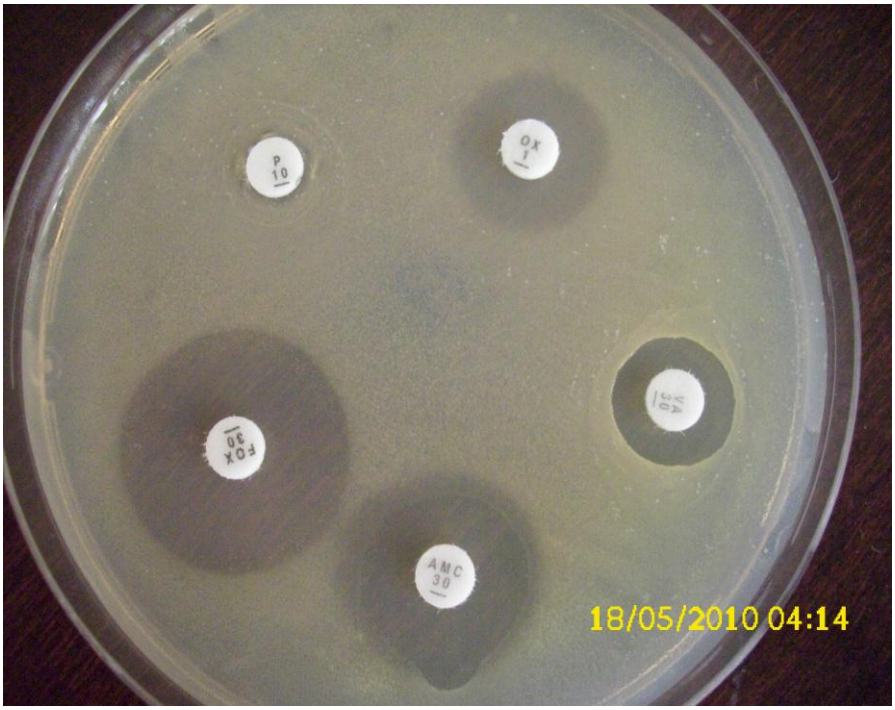
Şekil 4.3. Hemoliz Pozitif *Staphylococcus*'ların Koyun Kanlı Agar'da Görünümü



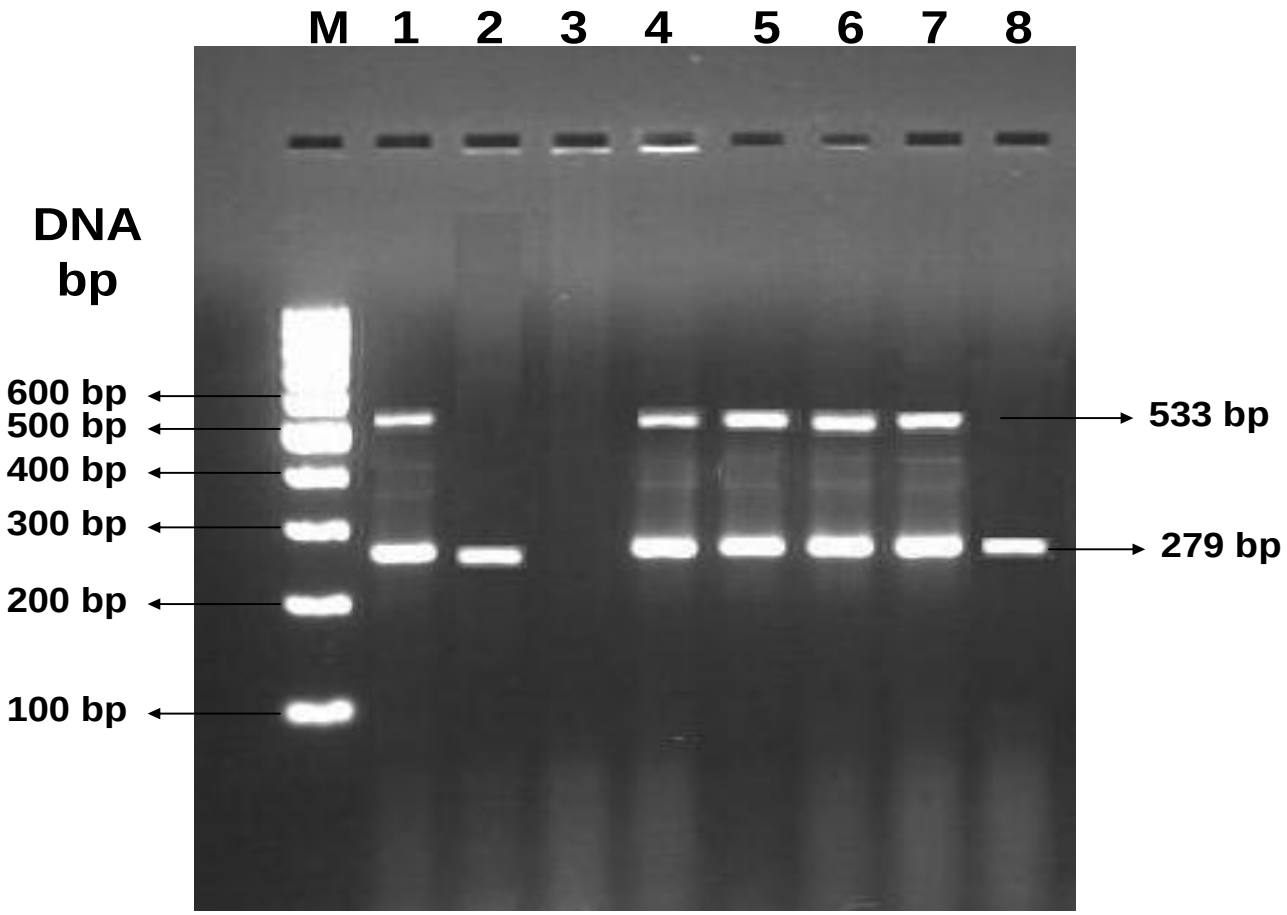
Şekil 4.4. Biyofilm Pozitif *Staphylococcus aureus*'ların Kongo Red Agar'da Görünümü



Şekil 4.5. Biyofilm Pozitif *Staphylococcus aureus*'ların Kongo Red Agar'da Görünümü



Şekil 4.6. Disk Diffüzyon Yöntemi ile *Staphylococcus aureus*'ların Antibiyotik Duyarlılık Test Görünümü (AMC: Amoksisilin-Klavulonik asit, FOX: Sefoksitin, OX: Oksasilin, P: Penisilin, VA: Vankomisin**)**



Şekil 4.7. nuc ve mecA Geninin Elektroforez Görünümü

M: Marker (Gene Ruler Seti-Promega, Madison, ABD DNA Ladder Plus (G210A) 100bp-3000bp Blue/Orange Loading Dye (G190A), 1: *Staphylococcus aureus* ATCC 46300 (533 bp'da mecA pozitif ve 279 bp da nuc pozitif kontrol suşu), 2: *Staphylococcus aureus* ATCC 1065 (mecA negatif ve 279 bp da nuc pozitif kontrol suşu), 3: *E. coli* ATCC 11230 (negatif kontrol suşu) 4: 533 bp da mecA pozitif, 279 bp'da nuc pozitif çalışma izolatı, 5: 533 bp'da mecA pozitif, 279 bp'da nuc pozitif çalışma izolatı, 6: 533 bp'da mecA pozitif, 279 bp'da nuc pozitif çalışma izolatı, 7: 533 bp'da mecA pozitif, 279 bp'da nuc pozitif çalışma izolatı, 8: mecA negatif, 279 bp'da nuc pozitif çalışma izolatı

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Staphylococcus aureus toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonların en önemli etkenlerinden olup lokal ve sistemik birçok hastalıklara sebep olabilir. Tedavi edilmediği takdirde bu mikroorganizma çeşitli organlara kan yoluyla yayılarak endokardit, osteomyelit, septik artritis gibi ciddi klinik tablolara yol açar (74).

Gıdaların *Staphylococcus aureus*'la kontaminasyonu gıda üretiminde kullanılan hayvanların deri ve mukozalarından olabildiği gibi taşıyıcı insanlarla da olabilmektedir (6).

Antibiyotik dirençli *Staphylococcus aureus*'lar süt ve süt ürünleri ayrıca et ve et ürünleri ile taşınabilirler. Son yıllarda sıkça karşımıza çıkan MRSA'ların taşınımında da gıda kaynaklı bulaşmalar önemli bir rol oynayabilir (6).

Antimikrobiyal direnç son yıllarda ülkemizde ve dünyada önemli bir sorun haline gelmiştir. İlk antibiyotiğin kullanımından bu yana 60 yıllık bir süre geçmiş olup pek çok bakteriyel enfeksiyonun tedavisinde birçok başarı elde edilmiştir. Ancak bakterilerde penisiline karşı başlayan direnç problemi zamanla kullanıma giren streptomisin (1947), tetrasiklin (1952), eritromisin (1955), vankomisin (1967), gentamisin (1972) gibi yeni antibiyotiklerde de görülmeye başlandı (75).

Staphylococcus aureus uzun bir zamandır ciddi hastane infeksiyonları ile karşımıza çıkan ve böylelikle de halk sağlığı açısından önemli problemlere neden olan bir patojendir. *Staphylococcus aureus*'tan kaynaklanan hastane enfeksiyonlarının çoğu metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*'lar tarafından oluşturulmuş ve tüm dünya çapında önemli kayıplara neden olmuştur. Metisilin dirençli suşlar multirezistans özelliğine sahiptirler. Bu durum onların tedavisinde ciddi zorluklara neden olur. Bu dirençli suşlar ile kontamine gıdaların insanlar tarafından tüketilmesi ile antibiyotik dirençli suşların insanlara bulaşması mümkündür. Bu yüzden kontamine gıdalar insan sağlığı açısından büyük bir risk potansiyeline sahiptir (7).

Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının multirezistan özelliklerinden dolayı tedavilerinde vankomisin başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Ancak son yıllarda bu antibiyotiğe karşı orta düzey dirençlilik belirlenmiştir. Vankomisine karşı oluşan direnç metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*'ların tedavisini kısıtlamaktadır. Bu yüzden vankomisin dirençli suşların belirlenmesi önem kazanmıştır (8).

Bu çalışmada ülkemizde çok fazla tüketim potansiyeline sahip Erzincan tulum peynirinden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotik direnci ve biyofilm oluşturma yeteneği fenotipik ve genotipik olarak araştırılmıştır.

Birçok araştırmada da çeşitli peynir örneklerinden *Staphylococcus* spp. ve *S. aureus*'un varlığı araştırılmıştır. Yaşar (76), 99 peynir örneğinin 47'sinde, 72 taze peynir örneğinin 45'inde *Staphylococcus* spp. izole etmiş ve 45 suşun 12'sini *Staphylococcus aureus* olarak tanımlamıştır. Önganer ve ark. (77), yaptıkları çalışmada Diyarbakır'da taze olarak tüketilen 30 adet çökelek peynirinin tamamında (% 100) *S. aureus* tespit etmişlerdir. Öksüztepe ve ark. (78), Elazığ'da tüketime sunulan 40 adet çökelek peynirin 37 (% 92,5)'sinde *Staphylococcus aureus*'u identifiye etmişlerdir. Başka bir çalışmada, çeşitli süt işletmelerinden sağlanan çiğ süt, pastörize süt ve beyaz peynir örneklerinin 73'ünden *Staphylococcus* izole edilmiş, bu bakterilerin 59'u (% 80,82) *S. aureus* olarak belirlenmiştir (79). Ankara ilinin çeşitli semtlerinden toplanan 75 adet beyaz peynir örneğinden 37 adet farklı patojen mikroorganizma izole edilmiştir. Bu patojen mikroorganizmaların % 34'ü *S. aureus* olarak tanımlanmıştır (80). Kırdar (81) yapmış olduğu çalışmada, Antalya ve Burdur illerinde satışa sunulan 14 çökelek peynirinin 11 (% 86,2)'inde *S. aureus* saptamıştır. Çeşitli peynirler üzerinde yapılan bir araştırmada incelenen 181 numunenin 14'ünden *S. aureus* tespit edilmiştir (82). Koyun peyniri ile ilgili olarak 2009 yılı Ağustos ve Aralık aylarında toplanan 100 adet koyun peyniri örneğinin 60 (% 60)'ından *S. aureus* izole edilmiştir (83). Hayaoğlu (84), farklı bir peynir türü olan küflü peynir üzerinde yaptığı çalışmada 30 örneğinin 11 (% 36,6)'inden *S. aureus*'un varlığını bildirmiştir.

Van'da kahvaltı salonlarında tüketime sunulan süt ürünlerinin mikrobiyolojik kaliteleri üzerine yapılan bir araştırmada, kahvaltı salonlarından alınan 10'ar adet beyaz peynir ve otlu peynirinin mikrobiyolojik yönden incelemesi yapılmıştır. Beyaz peynir örneklerinden 2'sinin *S. aureus* bakımından Türk Standartları'na uymadığı belirlenmiştir. Van'da yapılan diğer bir çalışmada çalışılan 50 otlu peynir numunesinin tamamında (% 100) *S. aureus* tespit edilmiştir (85).

Bu çalışmada incelenen 100 adet Erzincan tulum peynirinin 72 (% 72)'sinden *Staphylococcus* spp. izole edilmiştir. Bu izolatlardan 61 (% 84,7)'i konvansiyonel ve moleküler yöntemler kullanılarak *Staphylococcus aureus* olarak identifiye edilmiştir. Elde edilen bu bulgular Ertaş ve ark. (83) tarafından elde edilen sonuçlara paralellik gösterirken diğer araştırıcıların (76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 84, 85, 86) yapmış oldukları araştırmalardan elde edilen verilerle karşılaştırıldığında sonuçların farklılık gösterdiği saptanmıştır.

Araştırmalarda peynirlerde yüksek *S. aureus* kontaminasyon oranı; çiğ süt kullanımına, uygun olmayan starter kültür kullanımına, imalat ve depolama sırasında hijyen koşullarının yetersizliğine ve olgunlaşma süresine riayet edilmediğine bağlanmıştır.

Çeşitli peynir örneklerinden izole edilen *S. aureus* oranları farklılıklar göstermekle birlikte genel olarak yüksek düzeydedir. Bu oran üretimden satış noktasına kadar geçen sürede gerekli hijyenik koşullara riayet edilmediğinden kaynaklanmaktadır. Elde edilen sonuçların

farklılık göstermesinde araştırıcıların bildirdiği mevcut problemlerin etkili olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca etkenin izolasyon ve identifikasyon aşamalarında uygulanan teşhis metotlarının ve kullanılan besiyerlerinin farklı olmasından da sonuçların değişkenlik gösterebileceği kanaatine varılmıştır.

Peynir imalatında kullanılan sütlerin yetersiz pastörizasyonu, olgunlaşma sürecindeki bakteriyel kontaminasyon ve peynirlerin saklanma koşulları peynir mikroflorasının gelişimini ve kaliteyi etkiler. Bu nedenle *Staphylococcus aureus* gibi insan sağlığı açısından önemli mikroorganizmalar beyaz peynirlerde bulunabilir. Bu düşünceden hareketle 12 seri (132 adet) beyaz peynir örneği 10 haftalık (70 gün) olgunlaşma periyodunda çalışılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre taze peynir örneklerinden yüksek sayıda *Staphylococcus aureus* izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Olgunlaşmanın ilk haftalarındaki *S. aureus* izolasyonu taze peynir örneklerindeki gibi yüksek gözlenirken son haftalardaki *S. aureus* sayısında düşme meydana gelmiştir. *S. aureus*' ların taze peynir örneklerinden izolasyonu pastörizasyon ile baskılanan bu bakterinin yeniden aktivite kazanabildiğini ve olgunlaşmanın en az 6. haftasına kadar canlılıklarını sürdürebildiklerini göstermektedir (87).

Başka bir çalışmada *Staphylococcus aureus* sayısı, Erzincan tulum peyniri örneklerinden yalnızca, çiğ koyun sütünden üretilen örneklerde aranmıştır. Bu örnekte, *Staphylococcus aureus* sayısı olgunlaşmanın 2. gününde 4,511 log kob/g, 30. günde, 7,470 log kob/g, 60. Günde 5,119 log kob/g ve olgunlaşmanın sonunda 90. günde 3,329 log lob/g olarak belirlenmiştir. Peynir örneğinin *Staphylococcus aureus* sayısı depolamanın 30. gününden itibaren hızlı bir düşüş göstermiştir. Bu durumun, peynir örneğinde nem kaybına bağlı su aktivitesindeki düşüşten, kurumaddede tuz oranındaki nispi artıştan kaynaklı olduğu düşünülmektedir (88).

Keçi peynirinden oluşan 49 adet numune ile 73 adet sığır peyniri üzerinde yapılan bir araştırmada, keçi peyniri yapım aşamasında başlangıçta % 91,8 olan *S. aureus* oranı 24 saat sonunda % 95,9'a yükselmiş 30 gün sonra % 48,9'a düşmüştür. Yine aynı şekilde sığır peynirinde de başlangıçta % 47,2 olan *S. aureus* miktarı 5-6 saat içinde % 80,8'e yükselmiş 30 gün sonra % 24,7'ye düşmüştür (89).

Bu çalışmalar peynirin olgunlaşma sürecinin önemini açıkça belirtmektedir. Çalışmamızdaki yüksek oranda tespit edilen *S. aureus* popülasyonunun peynirin olgunlaşma sürecinin kısaltılarak satışa sunulması görüşünü destekler niteliktedir.

Staphylococcus aureus antibiyotikler keşfedilmeden önce çok ağır seyreden ölümcül infeksiyonlara sebep olmaktaydı. Ayrıca, penisilinle başlayarak, birçok antibiyotiğe direnç kazanan, stafilokok suşları, tüm dünyada giderek artan oranda hastane enfeksiyonu etkeni haline gelmiştir. Bu suşların öneminin artması, yalnızca hastane enfeksiyonlarına yol açması nedeniyle değil, epidemilere yol açabilmeleri ve tedavi seçeneklerinin çoklu antibiyotik direnci

nedeni ile kısıtlı olmasından kaynaklanmaktadır. Antibiyotiklerin yaygın kullanımı sonucu gelişen antibiyotik direnci kısa zamanda önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir.

Rosengren ve ark. (90)'nın yaptıkları çalışmada, pastörize sütle yapılan 96, pastörize edilmeden yapılan 55 peynir numunesi üzerinde çalışılmış 96 numuneden 6 (% 6)'sında ve 55 numuneden 38 (% 69)'inde *S. aureus* izole edilmiş, bu izolatlarda % 39 oranında penisilin direnci tespit edilmiştir. Bir başka çalışmada 24 adet süt ve 24 adet peynir numunesi aynı anda çalışılmış ve 24 süt numunesinden 16 (% 66,7)'sında, 24 peynir numunesinden 17 (% 70,8)'sinde *S. aureus* tespit edilmiştir. Bu suşlardan yapılan çalışmalarda süt izolatlarında % 70,8 penisilin direnci tespit edilirken oxacillin ve vancomycin direncine rastlanmamıştır. Peynir izolatlarında ise % 60 penisilin direnci ve % 5 oxacillin direnci bulunurken vancomycin direnci ise tespit edilememiştir (91).

Spanu ve ark. (92), çiğ koyun sütünden yapılan peynirlerden 36 adet *S. aureus* izole etmişlerdir. Bu suşlardan % 33,3 oranında penisilin direncine rastlanırken oksasillin ve vankomisin direnci tespit edememişlerdir. Başka bir çalışmada çiğ süt, peynir ve peynir altı suyundan oluşan toplam 81 numuneden 40 adet *S. aureus* suşu izole edilmiş bu suşlardan % 50'sinin penisilin direncine, % 15'inin oksasillin direncine sahip olduğu belirlenirken vankomisin direnci tespit edilememiştir (93).

Nohutçu ve ark (94)'nın 2005 yılında Ankara'da yaptığı çalışmada çiğ süt örneklerinden izole edilen 157 *Staphylococcus aureus* izolatında en yüksek penisilin % 47 dirençliliği bulunurken suşların metisilin dirençliliğini % 21 olarak bulmuşlardır. Aynı çalışmada peynir örneklerinden 79 *Staphylococcus aureus* izolatının antibiyotik dirençliliklerini incelemişler, en yüksek penisiline % 13,9 ve metisiline % 6,3 dirençli olarak bulunmuştur.

Bizim çalışmamızda da yüksek oranda penisilin direnci tespit edilmiştir. Penisilin direncinin yüksekliği penisilin preperatlarının mastitis ve diğer enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla kullanılmasının bir sonucu olabilir. Ayrıca, antibiyotik uygulanmış hayvanların sütlerinin belli bir süre dökülmeyip tüketilmesi ya da buzağılara içirilmesi de direnç gelişiminde etkili olabileceği düşünülmektedir.

Kantarcıoğlu ve Yücel (95)'de metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'ların penisilinlere, sefalosporinlere, beta laktam antibiyotiklerin tümüne bunların dışında makrolidler, klindamisin, kloramfenikol, aminoglikozidler ve antiseptik maddelere de dirençli oldukları belirlemişlerdir.

Bizim çalışmamızda da metisiline dirençli bulunan (mecA+) 10 suşun aynı zamanda penisilin direncinin de olduğu saptanmıştır. Yine aynı şekilde amoksisilin-klavulonik asite direnç tespit edilen dört suşunda aynı zamanda metisilin direncinin var olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda *Staphylococcus aureus* izolatlarında vankomisin direnci tespit edilememiş diğer antibiyotik direnç oranları arasında farklılıklar gözlenmiştir. Antibiyotik direnç oranları arasındaki bu fark antibiyotik tüketim oranlarıyla bağlantılıdır. Antibiyotik tüketim oranı yüksek bölgelerde dirençte yüksektir.

Vintov ve ark. (96), dokuz Avrupa ülkesi ve ABD'de mastitisli inek sütlerinden izole ve identifiye edilen 815 *Staphylococcus aureus* izolatının çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıklarını incelemişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre, İskandinav ülkelerinde (Danimarka, Norveç, İsveç) penisilin direnci düşük, Amerika, İngiltere ve İrlanda gibi ülkelerde çok yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu farklılık, bu ülkelerde uygulanan antimikrobiyal politika farklılıklarından kaynaklanabilmektedir. İskandinav ülkelerinde diğer ülkelere nazaran daha sıkı antimikrobiyal politikalar vardır. Diğer Avrupa ülkelerinde ise penisilin direncinin orta seviyede olduğu vurgulanmıştır. Sabour ve ark. (97), Kanada'da yaptıkları çalışmada penisilin direncini % 9,9 olarak belirlemişlerdir. Antibiyotik direnç dağılımının lokal farklılık göstermesi, direnç gelişiminde etkili rol oynayan spesifik antibiyotiklerin kullanımının yansıması olabileceğine değinmişlerdir. Direnç gelişimindeki ana faktörün antibiyotik kullanım sıklığı olduğunu belirtmişlerdir.

Bakteriler, birçok canlı ve cansız yüzeye yapışır ve biyofilm oluşturarak, endüstriyel ve tıbbi birçok soruna neden olurlar. Biyofilmler; hidrate bir matriks içine gömülü hücrelerin oluşturduğu çok katmanlı, yüzeye bağlı mikrobiyal topluluklardır. Bakteriler; konak savunması ve antibiyotiklere direnç, yaşam için gerekli ortam oluşturabilme, kolonizasyon sağlama gibi amaçlarla biyofilm oluştururlar (98).

Biyofilm bakterileri antibiyotiklerin etkilerine çeşitli yollarla direnç gösterirler. Bu yolların başlıcaları antibiyotiğin biyofilm içine difüzyonunun kısıtlı olması, biyofilm içindeki bakterilerin farklı büyüme hızları ve mikroçevre değişikliklerinin antibiyotiklere olumsuz etkisidir. Souli ve ark. (99), klinik izolatlardan izole ettikleri slime-pozitif 22 KNS suşunun, rifampisin dışında tüm diğer etken maddelere istatistiksel olarak dirençli olduğunu saptamışlardır.

Yapılan literatür taramalarında peynir çeşitlerinden izole edilen *S. aureus* suşlarının biyofilm oluşturabilme yetenekleri hakkında bir çalışmaya rastlanmamıştır. Araştırmamızda identifiye edilen *Staphylococcus aureus* suşlarından 37 (% 60,65)'si biyofilm oluşturma yönünden pozitif olarak tespit edilmiştir. Biyofilm pozitif olarak identifiye edilen 37 (% 60,65) suştan; 9 (% 24,32)'unda oksasilin, 8 (% 21,62)'inde sefoksitin, 4 (% 10,81)'ünde amoksisilin-klavulonik asit ve 25 (% 67,56)'inde penisilin dirençliliği fenotipik olarak saptanmıştır. Bu suşlarda vankomisin direnci tespit edilememiştir. Bu elde edilen değerler tulum peynirinden izole edilen biyofilm pozitif *S. aureus* suşları ile ilgili ilk çalışma olması yönünden orijinallik göstermektedir. Bu sonuçlara ve istatistiksel verilere göre oksasilin ve penisilin dirençliliğinde

biyofilm üretiminin bakteriye dirençlilik olgusunun kazandırılmasında etkin bir faktör olabileceği görülmüştür.

Sonuç olarak Erzincan tulum peynirinde *Staphylococcus aureus*'un yüksek bir oranda bulunduğu görülmüştür. Bu durum özellikle peynirin imalat safhasında yeterli hijyen kurallarına riayet edilmemesi ve olgunlaşma süresinin kısaltılarak satışa sunulmasından kaynaklanmaktadır. İzole edilen *S. aureus*'larda tespit edilen yüksek oranda antibiyotik dirençliliği ve biyofilm oluşturabilme yeteneğinin mevcudiyeti bu suşların tedavisi zor hastalıklara sebep olabileceğinin göstergesidir. Bu sonuçların ışığı altında bölge ile özdeşleşmiş olan Erzincan tulum peynirinin toplum sağlığı açısından risk oluşturabileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Tamime AY, Dalgleish D, Banks W. Historical origins of cheese in feta and related cheeses. Ellis Hanvood, Ltd. England 1991.
2. Devlet Planlama Teşkilatı. Süt Mamulleri Sanayii TC Başbakanlık DPT Yay. No: 2239, Ankara 1990.
3. Kurt A, Çakmakçı S, Çağlar A. Erzincan tulum (savak) peynirinin mikrobiyolojik özellikleri. Doga Vet Hay Derg 1991; 16: 41-50.
4. Dağdemir V. Erzincan ilinde tulum peynirinin imalat maliyeti ve pazarlama marjının belirlenmesi üzerine bir araştırma Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Ekonomisi Bölümü, 1998; 57.
5. Normanno G, La Salandra G, Dambrosio A, et al. Occurrence characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. Int J Food Microbiol 2007; 115: 290-296.
6. Gündoğan N, Çitak S, Yücel N, Devren A. A note on the incidence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and chicken samples. Meat Sci 2005; 69: 807-810.
7. Pereira V, Lopes C, Castro A, et al. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. Food Microbiol 2009; 26: 278-282.
8. Schaaff F, Reipert A, Bierbaum G. An elevated mutation frequency factors development of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 3540-3548
9. Cengiz AT. Tıp ve Diş Hekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji. Ankara Güneş Kitapevi 2004; 343-350.
10. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 11. Baskı. Ankara: Hacettepe Taş Yayınevi 2005; 145-200.
11. Dündar V. Metisiline dirençli stafilokok infeksiyonları. Klinik Derg 2000; 13:26-27.
12. Derbentli Ş. Stafilokoklarda antibiyotik direnci. ANKEM Derg 2005; 19(Ek-2): 54-60.
13. Wenzel RP. Methicillin-resistant *Staphylococcus* outbreak a consensus panel's definition and management quidelines. Am J Infect Control 1998; 26: 102-110.

14. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları, Barış Yayınları, Bornova 1994: 188-211.

15. Baird D, Collee JG, Marmion SP, Simmons A. *Staphylococcus* cluster forming Gram positive cocci. Pract Med Microbiol 1996; 245-262.

16. Arda M. Temel Mikrobiyoloji. Medisan yayınları, Ankara 2006; 27-34.

17. Kayser H, Bienz A, Eckert J, Lindenmann J. Hücre duvarı, Tıbbi mikrobiyoloji, İmmunoloji, Bakteriyoloji, Mikoloji, Viroloji, Parazitoloji, (Çev: Küçüker Anğ M, Tümbay E, Anğ Ö), Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 1997; 84-87.

18. Esen N, Köksalan H, Mert A. *Staphylococcus aureus* suşlarının çeşitli antibiyotiklere in-vitro duyarlılıkları. ANKEM Dergisi 1992; 6: 149.

19. Waldvogel FA *Staphylococcus aureus* in: Mandell GL, Bennet, JE, Dolin R. Principles and Practice of Infectious Diseases. Philadelphia Churchill Livingstone, 2000; 2069-2092.

20. Cengiz T. *Staphylococcus,* Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ustaçelebi Ş 1. Baskı Güneş Kitabevi Ltd. Şti. Ankara 1999; 339-348.

21. Kloos WE, Bannerman LT, Murray PR. et al. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. Manual and Clinical Microbiology, eds ASM Pres, Washington DC 1995; 282-298.

22. Arciola C.R, Lucilla B, Montanaro L, Presence of icaA and icaD genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. J Clin Microbiol 2001; 39: 2151-2156.

23. Post JC, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Ehrlich GD. The role of biofilms in otolaryngologic infections. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg 2004; 12: 185-190.

24. Donlan R. Biofilms: Microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis 2002; 8: 881-890.

25. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev 2002; 15: 167-193.

26. Carpentier B, Cerf O. Biofilms and their consequences with particular reference to hygiene in the food industry. J Appl Bacteriol 1993; 75: 499-511.

27. Post JC, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Ehrlich GD. The role of biofilms in otolaryngologic infections. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg 2004; 12: 185-190.

28. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. Annu Rev Microbiol 1995; 49: 711-745.

29. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms a common cause of persistent infections. Science 1999; 284: 5427-5433.

30. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 999-1007.

31. Singh P, Schaeffer A, Parsek M, et al. Quorum sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. Nature 2000; 407: 762-764.

32. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, et al. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. Science 1998; 280: 295-298.

33. Labbate M, Qeck SY, Koh KS, et al. Quorum sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MGI. J Bacteriol 2004; 186: 692-698.

34. Saraçlı MA. "Quorum sensing": Mikroorganizmalar iletişim mi kuruyor? Gülhane Tıp Derg 2006; 48: 244-250.

35. Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Hook M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissue. Ann Rev Microbiol 1994; 48: 585-617.

36. Davey ME, O'toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol Mol Biol Rev 2000; 64: 847-867.

37. Jefferson KK, Pier DB, Goldmann DA, Pier GB. The teicoplanin-associated locus regulator (TcaR) and the intercellular adhesin locus regulator (IcaR) are transcriptional inhibitors of the ica locus in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 2004; 186: 2449-2456.

38. Holland SP, Mathias RG, Morck DW, Chiu J, Slade SG. Diffuse lamellar keratitis related to endotoxins released from steriliser reservoir biofilms. Ophthalmology 2000; 107: 1227-1233.

39. Meluleni GJ, Grout M, Evans DJ, Pier GB. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm in vitro are killed by opsonic antibodies to the mucoid exopolysaccharide capsule but not by antibodies produced during chronic lung infection in cystic fibrosis patients. J Immunol 1995; 155: 2029-2038.

40. Hausner M, Wuertz S. High Rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. Appl Environ Microbiol 1999; 65: 3710-3713.

41. Vancraeynest D, Hermans K, Haesebrouck F. Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits for biyofilm formation and MSCRAMM. Vet Microbiol 2004; 103: 241-247.

42. Götz F. *S. aureus* and biofilms. Mol Microbiol 2002; 43: 1367-1378.

43. Tristan A, Ying L, Bes M. Use of multiplex PCR to identify *Staphylococcus aureus* adhesins involved in human hematogenous infection. J Clin Microbiol 2003; 41: 4465-4467.

44. Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. Diseases caused by *Staphylococcus* spp. Veterinary Medicine 9rd ed, WB Saunders Company Ltd. London 1999; p: 716.

45. Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR Clinical Veterinary Microbiology. 6 rd ed. Arte Sobre Papel. Spain 2000; 118-126.

46. Nascimento JS, Fagundes PC, Paiva Br MAV. Production of bacteriocins by coagulase-negative *Staphylococci* involved in bovine mastitis. Vet Microbiol 2005; 106: 61-71.

47. Boerlin P, Kuhnert P, Hussy D, Schaellibaum M. Methods for identification of *Staphylococcus aureus* isolated in cases of bovine mastitis. J Clin Microbiol 2003; 41: 767-771.

48. Igimi S, Atobe H, Tohya Y, et al. Characterization of the most frequently encountered *Staphylococcus* spp. in cats. Vet Microbiol 1994; 39: 255-260.

49. Hirsh DC, Maclachlan NJ, Walker RL. Veterinary Microbiology, 2rd ed, Blackwell Publishing Iowa, 2004; p: 273-284.

50. Kahn CM. Mastitis in Large Animals. The Merck Veterinary Manual Merck, Co. Inc. Whitehouse Station. N.J. USA, 2005; 1120-1130.

51. Huebner J, Goldman DA. Coagulase-negative *Staphylococci* role as pathogens. Ann Rev Med 1999; 50: 223-236.

52. Dündar V, Dündar D. Bakterilerde Antibiyotiklere Karşı Direnç. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji Sistemlere Göre Hastalıklar. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Sti. İstanbul, 2002; 1507-1516.

53. Rolinson GN. Forty years of ß-lactam research, J Antimicrob Chemother 1998; 41: 589-603.

54. Gür D. Antibiyotiklere direncin dünü bugünü yarını. 7. Antimikrobik Kemoterapi Günleri, İstanbul, 13-15 Nisan 2006, Program ve Özet kitabı, s. 23–26.

55. Forbes A, Sahm F, Weissfeld S. Principles of antimicrobial action and resistance, Bailey Scott's diagnostic microbiology 11th edition, St. Louis, CV Mosby Co, Chapter 15, 2003; 214–220.

56. Gülay Z, Mutlu G, İmir T, ve ark. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi, Ankara, 1999; 91-108.

57. Yüce A. Antimikrobik ilaçlara direnç kazanma mekanizmaları. Klinik Derg 2001; 14: 41-46.

58. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med 1998; 339: 520-532.

59. Ceri H, Olson ME, Stremick C, et al. The Calgary biofilm device new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. J Clin Microbiol 1999; 37: 1771-1776.

60. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet 2001; 358: 135-138.

61. Walters MC, Roe F, Bugnicourt A. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 317-323.

62. Anderl JN, Zahller J, Roe F, Stewart PS. Role of nutrient limitation and stationary phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 1251-1256.

63. Tack KJ, Sabath LD. Increased minimum inhibitory concentrations with anaerobiasis fortobramycin, gentamicin, and amikacin, compared to latamoxef, piperacillin, chloramphenicol, and clindamycin. Chemotherapy 1985; 31: 204-210.

64. Duguid IG, Evans E, Brown MR, Gilbert P. Growth-rate-independent killing by ciprofloxacin of biofilm-derived *Staphylococcus epidermidis*; evidence for cell-cycle dependency. J Antimicrob Chemother 1992; 30: 791-802.

65. Halkman K. Ed: Başak A. Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Anonymus Matbaacılık Ltd. Şti. 2005; Ankara.

66. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime producing by coagulase negative staphylococci. J Clin Pathol 1989; 42: 872-874.

67. Anonim. Clinical laboratory standards institute performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria ısolated from animals;

approved standard- second edition. M31-A2 and M37-A2. Clinical Laboratory Standards Institute Pennsylvania, USA, 2002.

68. Gürgün V, Halkman A. Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri. Gıda Teknolojisi Derneği Yayın No: 7, Ankara, 1990.

69. Maes N, Magdalena J, Rottiers S, et al. Evaluation of a Triplex PCR Assay To discriminate *Staphylococcus aureus* from coagulase negative *Staphylococci* and determine methicillin resistance from blood cultures. J Clin Microbiol 2002; 40: 1514-1517.

70. Tiwari HK, Ranjan M. Emergence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. BMC Infect Dis2006; 6: 156-161.

71. Ida T, Okamoto R, Shimauchi C, et al. Identification of aminoglycoside-modifying enzymes by susceptibility testing: epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Japan. J Clin Microbiol 2001; 39: 3115-3121.

72. Clark NC, Cooksey RC, Hill BC, Swenson JM, Tenover FC: Characterization of glikopeptid-resistant enterococci from U. S. hospitals. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37: 2311-2317.

73. Bell J, Paton, J, Turnidge J. Emergence of vancomycin resistant enterococci in Australia phenotypic and genotypic characteristics of isolates J Clin Microbiol 1998; 36, 2187-2190.

74. Atlı O. Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotik duyarlılığının incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü 2007; 35-64.

75. Avorn J, Barrett J, Davey P, et al. Antibiotic resistance: synthesis of recommendations by expert policy groups. World Health Organization 2001; 81-82.

76. Yaşar F. Şanlıurfa'da satışa sunulan taze, tuzlu ve beyaz peynirlerin mikrobiyolojik özellikleri. Yüksek Lisans Tezi, Harran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2007.

77. Önganer A, Kırbağ S. Diyarbakır'da taze olarak tüketilen çökelek peynirlerinin mikrobiyolojik kalitesi. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi 2009; 25: 24-33.

78. Öksüztepe G, Patır B, Dikici A, ve ark. Elazığ'da tüketime sunulan çökeleğin mikrobiyolojik ve kimyasal kalitesi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 2007: 21: 27-31.

79. Uraz G, Arslan, S. Çiğ süt, pastörize süt ve beyaz peynir örneklerinde bulunan beta-laktamaz pozitif *Staphylococcus*'lar üzerine bir araştırma. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 1997; 22: 201-207.

80. Bolat S. Ankara yöresinde tüketime sunulan beyaz peynirlerde salmonella-bazı patojen bakterilerin bulunma sıklığı ve proteolitik lipolitik aktiviteleri. Yüksek Lisans Tezi Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2006.

81. Kırdar S. çökelek peyniri üzerine bir araştırma. Süleyman Demirel Üniversitesi Burdur Meslek Yüksekokulu Süt ve Süt Ürünleri Programı, Geleneksel Gıdalar Sempozyumu 23-24 Eylül 2004 Van.

82. Akıneden Ö, Hassan A, Schneider E, et al. Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese. Int J Food Microbiol. 2008; 124 211-216

83. Ertaş N, Gönülalan Z, Yıldırım Y, et al. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in sheep cheese and dairy desserts by multiplex PCR technique. Int J Food Microbiol 2010; 142 74-77.

84. Hayaoğlu A, Güven M, Fox P. Microbiological, biochemical and technological properties of Turkish White cheese 'Beyaz Peynir'. Int Dairy J 2002; 12: 635-648.

85. Sağun E, Sancak H, Durmaz H. Van'da kahvaltı salonlarında tüketime sunulan süt ürünlerinin mikrobiyolojik ve kimyasal kaliteleri üzerine bir araştırma. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2001; 12: 108-112.

86. Tekinşen K, Özdemir Z. Prevalence of foodborne pathogens in Turkish Van otlu (Herb) cheese. Food Control 2006; 17: 707-711.

87. Uraz G, Gündoğan N. *Staphylococcus aureus*'ların 70 günlük olgunlaşma periyodunda beyaz peynirlerden izolasyonları ve canlı kalma sürelerinin değerlendirilmesi. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi 1998; 11: 167-172.

88. Aslaner A. Geleneksel yöntem ve farklı sütlerden ısıl işlem uygulanarak üretilen ve farklı ambalaj materyallerinde olgunlaştırılan Erzincan tulum peynirinde bazı kalite niteliklerinin tespiti. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü 2008.

89. Jakobsen R, Heggebo R, Sunde E, et al. *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in Norwegian raw milk cheese production. Food Microbiol 2010; 1-5.

90. Rosengren A, Fabricius A, Guss B, et al. Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies. Int J Food Microbiol 2010; 144: 263-269.

91. Andre MC, Campos MR, Borges LJ, et al. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following SmaI digestion. Food Control 2008; 19: 200-207.

92. Spanu V, Virdis S, Scarano C, et al. Antibiotic resistance assessment in *S. aureus* strains isolated from raw sheep's milk cheese. Vet Res Commun 2010; 34: 87-90.

93. Bendahou A, Lebbadi M, Ennanei L, et al. Characterization of *Staphylococcus* species isolated from raw milk and milk products (lben and jben) in North Morocco. J Infect 2008; 2: 218-225.

94. Nohutçu Y. Çiğ süt ve peynir örneklerinden *Staphylococcus*'ların izolasyonu ve antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2005; 18-42.

95. Kantarcıoğlu AS, Yücel A. Hasta refakatçilerinin ve ziyaretçilerinin el ve burunlarında metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* taşıyıcılığının araştırılması. Cerrahpaşa Tıp Dergisi 2002; 33: 97-103.

96. Vintov J, Aarestrup F, Zinn C, Olsen J. Association between phage types and antimicrobial resistance among bovine *Staphylococcus aureus* from 10 countries. Vet Microbiol 2003; 95: 133-147.

97. Sabour P, Gill J, Lepp D, et al. Molecular typing and distribution of *Staphylococcus aureus* isolated in eastern Canadian dairy herds. J Clin Microbiol 2004; 42: 3449-3455.

98. Öztürk B. Bakteri yüzey slime yapısındaki moleküllerin, bakteri adheransı ve antibiyotik direncine etkisi. Uzmanlık Tezi Aydın, 2006.

99. Souli M, Giamarellou H. Effects of slime produced by clinical isolates of coagulase negative staphylococci on activities of various antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 939-41.

Doç. Dr. K. Semih GÜMÜŞSOY danışmanlığında **Necati ÖZPINAR** tarafından hazırlanan **"Erzincan Tulum Peynirinden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* İzolatlarında Antibiyotik Direncinin ve Biyofilm Oluşturma Özelliğinin Fenotipik ve Genotipik Olarak Belirlenmesi"** konulu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Veteriner Mikrobiyoloji** Anabilim Dalı'nda **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

28/01/2011

JÜRİ **İmza**

Başkan : Prof. Dr. Fuat AYDIN

Üye : Doç. Dr. Semih GÜMÜŞSOY

Üye : Yrd. Doç. Dr. Nurhan ERTAŞ

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 24/2/2011.....tarih ve...497.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

28/2/2011

Prof.Dr.Salih ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü