

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TARLA FARESİ, RAT VE BEYAZ FARELERDEN ZONOTİK
ENTEROBACTERİACEAE TÜRLERİNİN İZOLASYONU,
İDENTİFİKASYONU VE ANTİBİYOTİKLERE DUYARLILIK DURUMLARI
ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

Oya DOĞU ÇINAR

Şubat-2010

Biyoloji Anabilim Dalı Oya DOĞU ÇINAR tarafından hazırlanan TARLA FARESİ, RAT VE BEYAZ FARELERDEN ZONOTİK *ENTEROBACTERIACEAE* TÜRLERİNİN İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU VE ANTİBİYOTİKLERE DUYARLILIK DURUMLARI ÜZERİNE ÇALIŞMALAR adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Yüksek Lisans Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylarım.

Doç.Dr. Murat YILDIRIM

Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan (Danışman) : Doç. Dr. Murat YILDIRIM

Üye : Yrd. Doç. Dr. Nilgün ÜNAL

Üye : Yrd. Doç.Dr. Serkal GAZYAĞCI

...../...../.....

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Doç. Dr. Burak BİRGÖREN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

TARLA FARESİ, RAT VE BEYAZ FARELERDEN ZONOTİK
ENTEROBACTERIACEAE TÜRLERİNİN İZOLASYONU,
İDENTİFİKASYONU VE ANTİBİYOTİKLERE DUYARLILIK DURUMLARI
ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

DOĞU ÇINAR, Oya

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Murat YILDIRIM

Şubat 2010, 42 sayfa

Bu çalışmada farklı yaşam alanlarında bulunan beyaz fare, tarla faresi ve ratların bağırsak florasındaki aerobik *Enterobacteriaceae* türlerinin izolasyonu ve identifikasyonu, izolatların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi ve doğal yaşam ile laboratuvar koşullarının barsak florası üzerine etkisinin incelenmesi amaçlandı.

Bu amaçla farklı yaşam alanlarında bulunan 15 beyaz ve 29 tarla faresi'nin duodenum ile kolon'undan, 65 Wistar rat'ının rektumundan toplam 153 svap örneği alındı.

Çalışmada bağırsak florasını içeren 153 örnekten 74 *Enterobacteriaceae* izolatı elde edildi. Bu izolatların 58'i (% 78.4) *Escherichia coli*, 5'i (% 6.7) *Serratia liquefaciens*, 5'i (% 6.7) *Citrobacter freundii* , 3'ü (% 4) *Yersinia enterocolitica*, 1'i (%1.4) *Shigella spp.*,1'i (%1.4) *Escherichia fergusonii* ,1'i (%1.4) *Arizona spp.* olarak tanımlandı.

Laboratuvar şartlarında yetiştirilen beyaz fare ve rat ile yaban hayattan elde edilen tarla farelerinden izole edilen *Enterobacteriaceae* türleri arasında farklılıkların olduğu belirlendi.

Yapılan antibiyogram testi sonucunda bazı enterobakter türleri üzerine başta trimetoprim+sulfametaksazol olmak üzere imipenem, netilmisin, piperasillin, siproflaksin, amoksisilin-klavunalik asit, amikasin, seftriakson ve sefuroksim'in etkili olduğu saptandı. Ayrıca *Shigella spp.*'nin seftriakson, sefuroksim ve amikasin'e, *Escherichia fergusonii*'nin siproflaksin ve sefuroksim'e, *Arizona spp.*'nin amikasin'e %100 dirençli olduğu belirlendi.

Bu çalışmada fare ve ratların barsak florasında en yoğun bakteri türünün *E.coli* olduğu, doğal yaşam ve laboratuvar koşullarının hayvan türlerinin barsak flora oluşumunda önemli bir faktör olarak rol aldığı ve barsak florasındaki dirençli bakterilerin antibiyotik direncinin artmasında rol alabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Rat, Beyaz fare, *Enterobacteriaceae*,

Antibiyotik duyarlılığı

ABSTRACT

STUDIES ON ISOLATION, IDENTIFICATION AND ANTIBIOTIC SENSITIVITY OF ZONOTIC *ENTEROBACTERIACEAE* IN HARVEST MOUSE, RAT AND WHITE MICE

DOĞU ÇINAR, Oya

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, M. Sc. Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr Murat YILDIRIM

February 2010, 42 pages

In this study, we aimed to determine that the isolation and identification of aerobic *Enterobacteriaceae* species in white mice, harvest mouse and rats which were located in different life spaces, on the other hand, the detection of antibiotic sensitivity of the isolates, finally, the effect of wild life and laboratory conditions on intestinal flora.

For this purpose, 153 of swap samples were taken from duodeni and colons of 15 of white mice and 29 of harvest mice and recti of 65 of rats.

In this study, the 74 of *Enterobacteriaceae* isolates obtained from 153 samples which contained intestinal flora. The 58 of these isolates (78.4 %) were determined as *Escherichia coli*. The other determinations were done as

follows; 5 of them (6.7 %) *Serratia liquefaciens*, 5 of them (6.7 %) *Citrobacter freundii*, 3 of them (4 %) *Yersinia enterocolitica*, 1 of them (1.4 %) *Shigella* spp., 1 of them (1.4 %) *Escherichia fergusonii*, 1 of them (1.4 %) *Arizona* spp.

The differences were determined in *Enterobacteriaceae* species between white mouse and rat which bred in laboratory conditions and harvest mice which were obtained from wild life.

The antibiogram test revealed that especially trimethoprim + sulfamethoxazole and imipenem, netilmisin, piperacillin, ciprofloxacin, amoxicillin – clavulanic acid, ampicillin, ceftriaxone and cefuroxime were effective on some of *Enterobacter* species. However, *Shigella* spp. were detected as resistant (100 %) to ceftriaxone, cefuroxime and ampicillin. On the other hand, *Escherichia fergusonii* was resistant to ciprofloxacin and cefuroxime and *Arizona* spp. was resistant to ampicillin at 100 %.

Overall research showed that *E.coli* was most frequently seen type of bacteria in intestinal flora of mice and rats, on the other hand, wild life and laboratory condition were strong factors for composing intestinal flora of animal species and the resistant bacteria which were located in intestinal flora may take roles for rising antibiotic resistancy.

Key words: Rat, White mouse, *Enterobacteriaceae*, Antibiotic sensitivity

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanması esnasında hiçbir yardımı esirgemeyen ve biz genç araştırmacılara büyük destek olan, bilimsel deney imkanlarını sonuna kadar bizlerin hizmetine veren, tez yöneticisi hocam, Sayın Doç.Dr. Murat YILDIRIM'a, tez çalışmalarım esnasında, bilimsel konularda daima yardımını gördüğüm Sayın Yrd. Doç. Dr. Nilgün ÜNAL ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Buğrahan Bekir YAĞCI' ya, bana destek olan arkadaşlarım Araş.Gör.Fatma SAKARYA ve Araş.Gör.Dr. Şinasi AŐKAR'a son olarak bana birçok konuda olduğu gibi, tezimi hazırlamam esnasında da yardımlarını esirgemeyen eşime ve oğluma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Doğal Flora	4
1.2. Kalıcı Flora.....	5
1.3. Geçici Flora.....	5
1.4. Floranın Organizmadaki Rolü	6
1.5. Bağırsak Florası.....	7
1.6. Normal Floranın Mikroorganizma Florasının Engelleme Etkisi....	9
1.7. Sindirim Sisteminin Kolonileşme Direnci.....	10
1.8. Beslenmenin Doğal Floraya Etkisi	12
1.9. Antibiyotik Dirençliliği.....	12
2. MATERYAL VE YÖNTEM	16
2.1. Materyal	16
2.1.1. Örnekleme ve elde edilen numuneler.....	16
2.1.2. Besiyerleri	17

2.1.3. Biyokimyasal Testler	18
2.1.4. Antibiyogram Testleri.....	20
2.2. Yöntem.....	20
2.2.1. İzolasyon ve İdentifikasyon	20
2.2.2. Antibiyotik Duyarlılık Testleri	27
3. BULGULAR	28
3.1. Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları.....	30
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	34
KAYNAKLAR	40

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Hayvan türlerine göre toplanan materyal türü ve sayısı.....	17
2.2. I.Tüp besiyerinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar	18
2.3. II.Tüp besiyerinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar.....	19
2.4. III.Tüp besiyerinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar.....	19
2.5. İzole edilen <i>Enterobacteriaceae</i> suşlarının biyokimyasal özellikleri.....	26
3.1. Hayvan türlerine göre incelenen örnekler ve izolasyon sayısı.....	28
3.2. Farklı deney hayvanları ünitesinde bulunan beyaz fare türlerinden izole edilen <i>Enterobacteriaceae</i> dağılımı.....	29
3.3. İzole edilen mikroorganizmaların hayvan türlerine göre dağılımı sayısı.....	30
3.4. <i>Enterobacteriaceae</i> türlerinin antibiyogram duyarlılığını bildiren sonuç tablosu	33

ŞEKİLLER

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1.İnkubasyonda kullanılan etüv.....	22
1.2.Kanlı agarda Enterobactericea koloni görünümü.....	22

KISALTMALAR DİZİNİ

<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
CR	Kolonileşme direnci
EMB	Eosin Methylen Blue
TSB	Trypticase Soy Agar TSB
ONPG	ortho-nitro-fenil-beta-galakto-piranosid
H ₂ S	Hidrojen sülfür
FeCl ₃	Demir üç klorür
TDA	Triptofan deaminaz
LDC	Lizin dekarboksilaz oluşumu
CLSI	Klinik Labratuvar Standartları Enstitüsü
Duo.	Duodenum
AK	Amikasin
AMC	Amoksisilin-Klavunalik asit
CRO	Seftriakson
CXM	Sefuroksim
CIP	Siproflaksin
IPM	İmipenem
NET	Netilmisin
PRL	Piperasillin

SXT	Trimetoprim+Sulfametaksazol
Ark	Arkadaşları
NC	Kendi içinde melezlenmiş
GF	Germ free
CV	Konvansiyonel

1. GİRİŞ

Mikroorganizmaların birbirleri ve çevreleri ile olan ilişkilerini inceleyen bilim dalına mikrobiyal ekoloji adı verilir. Bütün canlılar, içinde yaşadıkları ekosistemin etkisi altındadır. Canlılarda bağırsaklar mikroorganizmalar için ekolojik bir mikroortamdır (1).

Bağırsak ekolojisi, bağırsak ekosisteminde yer alan mikroorganizmaların birbirleri ve konakçı ile olan ilişkilerini inceler. Çevre faktörlerinin mikroorganizmalar üzerinde seçici bir etkisi bulunmaktadır. Bu çevre faktörleri, aynı kimyasal, fiziksel ve biyolojik özellikler taşıyan mikroorganizma türleri üzerine benzer etkiler oluştururken, değişik özelliklere sahip mikroorganizmalar üzerine farklı etkiler oluşturur (2-4).

Çevre faktörleri ve konakçının sağladığı ortamın fiziksel, kimyasal, immunolojik özellikleri, beslenme florayı oluşturan mikroorganizmaların tip ve sayısını belirlemede önemli rol oynar. Bazı beslenme şekilleri bağırsak ekosistemini etkileyerek bir mikroorganizmanın üremesine izin verirken, diğer mikroorganizmaların üremesini durdurur. Ortamda tek bir besin maddesi varsa ve bu besin maddesi floradaki tek bir mikroorganizma tarafından kullanılıyorsa, florada yalnızca o mikroorganizma baskın olarak çoğalır (3-8). Bir canlının florası üzerine beslenme tipi ve şekli (özellikle bağırsak florası üzerine) çok etkinken, cinsiyetin herhangi bir etkisi bulunmadığı bildirilmiştir (5).

Beslenme ile canlıların özellikle bağırsak florasına bakteri girişi sağlanır (8). Bu bakterilerin çoğu, canlının immun sisteminin etkisiyle ve sindirim sisteminde bulunan doğal flora ya bağlı olarak çoğalamaz ve ekolojik yapıyı bozamaz. Canlılar arasındaki farklı beslenme şekillerine bağlı olarak özellikle bağırsak florasında farklı kolonileşmeler gözlenir (2,4,5,8,9).

Doğal flora, canlı türleri arasında farklılık gösterebildiği gibi yaşadıkları bölgelerdeki çevresel faktörlere bağlı olarak aynı türdeki canlıların florasında da farklılıklar bildirilmiştir (2). Canlının psikolojisi, beslenme türü ve tipi immun sistem üzerinde etkilidir. İmmun sistemin infeksiyöz veya non-infeksiyöz etkenlere bağlı olarak baskılanması, canlının doğal flora oluşumu ve flora dengesi üzerine olumsuz etkileri olacaktır (4,8).

Mikroorganizmalar arasındaki ilişkiler, ortak yaşam, mutualizm, kommensalizm, antagonizm, sinerjizm, parazitizm, oportünizm ve kompetisyon olarak adlandırılır (3-5). Mutualizmde, mikroorganizmalar arasında karşılıklı yarar sağlama söz konusudur. Konakçı ve mutualist mikroorganizmalar yaşamlarında ve üremelerinde birbirlerinin metabolitlerine gereksinim duyarlar. Komensalizm de mikroorganizmalardan biri faydalanır, diğeri ise ne yarar ne de zarar görür. Sinergizm de, iki veya daha fazla mikroorganizma birbirinin etkisini destekleyerek birlikte oluşturdukları infeksiyonu ifade eder. Antagonizmde, bazı mikroorganizmaların üredikleri ortamda direkt (toksik maddeler, antibiyotikler, antifungal maddeler, bakteriosinler vs) veya indirekt etkileri (ortamın pH'sının, ozmotik basıncının, yüzey geriliminin değişmesi, vs) ile diğeri mikroorganizmaların üremesini ve

gelişmesini engeller. Parazitizmde, bazı mikroorganizmalar içinde veya üzerinde yaşadığı konakçıya fayda sağlamadan, zarar vererek yaşamlarını sürdürürler (3). Opurtunizmde, bazı mikroorganizmalar, normal şartlar altında konakçının sistemlerinde (sindirim sistemi, solunum sistemi vs), patojenik bir etki göstermemesine rağmen, çevresel faktör, beslenme, stres ve bilinçsiz antibiyotik kullanımı sonucu immun sistemin baskılandığı durumlarda patojen hale dönüşebilirler. Kompetisyonda, iki etkenin karşılıklı rekabete girmesi, birinin yerini diğerinin almasıyla ortaya çıkan bir yaşam tarzı vardır (3,4).

Mikroorganizmalar arasındaki besinsel ilişki, konakçı florasının ekosistemini korur ve düzenler. Bunların dışında mikroorganizmaların çoğalmasında belirli fizikokimyasal faktörlerin de etkisi vardır. Mikroorganizmaların üremeleri için optimal koşulların sağlanması gerekmektedir. Optimal koşulların değiştiği durumlar (pH, osmotik basınç, oksijen, yüzey gerilimi vs) ve besiyerinde toksik metabolitlerin birikmesi mikroorganizmaların üremesi üzerine olumsuz etki oluşturabilir (4).

Konakçıda yer alan bazı yapısal ve fizyolojik bariyerler, bir mikroorganizmanın konakçı vücuduna girmesine ve çoğalmasına engel olur. Bu faktörler doğal savunma bariyerlerini içerir (mukus, mide asidi, tüycükler, lokal bağışıklık sistem öğeleri). Patojen bakterilerin, enfeksiyon oluşturabilmesi için mukus tabakasından kurtulması ve bağırsak içeriği ile karışan çok sayıda doğal flora bakterileri arasında hayatta kalabilmesi gerekir. Doğal florayı oluşturan bakteriler sıklıkla doymamış yağ asitleri ile birlikte sindirim bakterilerine karşı toksik etki yapan bakteriosidal maddeler

üretirler. *Clostridium difficile*, *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. ve *Staphylococcus* spp. doymamış yağ asitlerinden etkilenen bakteriler arasında yer almaktadır (10).

İnsanlarda ve hayvanlarda yavru dünyaya geldikten kısa bir süre sonra çevreyle olan etkileşim ve beslenmeye bağlı olarak bakteriler bağırsağa geçerek yerleşir. Bu bakterilerin gelişim süresi canlıdan canlıya farklılık göstermektedir (3).

1.1. Doğal Flora

Vücudun çeşitli sistemlerinde yerleşim gösteren, organizmaya zarar vermeyen, hatta bazı yararlar sağlayan ve organizma ile birlikte yaşayan mikroorganizma topluluğuna vücudun doğal florası adı verilir. Bu florada değişen koşullara bağlı olarak patojenler ve fırsatçı patojenler yer alabilir (7).

Doğal flora vücudun dış çevre ile iletişim kurduğu deri, burun, ağız, sindirim sistemi, ürogenital sistem ve meme mukozasında bulunur ⁽⁶⁾. Doğal flora geniş bir bakteri ve mantar grubundan oluşur ve bunlar organizmada hastalığa neden olmaksızın yaşarlar (3).

Doğum öncesi canlılar mikroorganizmalardan ari kabul edilir ve doğum sonrası dış çevreyle teması ile doğal flora şekillenir. Genç hayvanların intestinal florası erişkin hayvanlardan farklılık gösterir. İntestinal flora coğrafik yerleşim bölgesi, beslenme ve iklim şartlarına bağlı olarak değişir (3,6,10).

Normalde steril olan fetus doğum anında veya doğumdan sonra katıldığı ekosistemde çeşitli cins ve sayıda mikroorganizmayla karşılaşır. Bu mikroorganizmaların bazıları immun sistem tarafından yok edilir, bazıları ise yerleşmeye olanak bulamaz. Bazı mikroorganizmalar ise vücudun çeşitli sistemlerine yerleşir. Bu yerleşen mikroorganizmalar organizma içerisinde değişmeyen topluluklar halinde ve hayat boyunca süren kalıcı doğal mikroflorayı oluştururlar (8).

1.2. Kalıcı Flora

Vücudun belirli bir sisteminde var olan, çeşitli dış faktörlerin etkisiyle ortadan kaldırılsa bile kısa veya uzun bir süre sonra kendini yenileyen floradır. Kalıcı floradaki mikroorganizmalar, buldukları sistemden başka bir sisteme geçmedikçe, aralarındaki denge bozulmadıkça ve organizmanın savunma gücü çok zayıflamadıkça hastalık yapmazlar. Bağırsak florasında ki fakültatif türler stres, yetersiz beslenme ve immunsupresif hastalıklar gibi faktörlere bağlı olarak immun sistemin baskılanması sonucunda çeşitli enfeksiyonlara sebep olabilirler. Aynı şekilde fazla antibiyotik kullanımı da bağırsak florasının bozulmasına, bunun neticesinde bazı enfeksiyonların oluşmasına neden olabilir (3).

1.3. Geçici Flora

Vücudun belirli bir sisteminde kalıcı floranın yanında çoğu apatojen ve bazen patojen mikroorganizmalar geçici florayı oluşturur. Bu geçici floradaki

mikroorganizma toplulukları birkaç saat, gün veya bir iki haftaya kadar kaldıktan sonra temasta buldukları çevre, besin, antibiyotik vb. etkinin ortadan kalkmasıyla kaybolurlar (10). Geçici floranın ortadan kaldırılması durumunda yeniden bu flora oluşmaz (6).

1.4. Floranın Organizmadaki Rolü

Florada bulunan mikroorganizmaların çoğu kommensaldir. Bunlar vücudun ısısından, neminden ve döküntü maddelerinden yararlanırlar ve zarar vermeksizin yaşamlarını sürdürürler. Bazı mikroorganizmaların kommensallikten daha ileri olarak organizma ile mutuellik halinde buldukları bildirilmiştir. Sindirim sisteminde bulunan bazı mikroorganizmaların vitaminleri (B ve K vitamini) sentez ettikleri, canlının bağırsak enzimlerince sindirilemeyen besin maddelerininin sindirimini sağladıkları bilinmektedir. Ayrıca yine bağırsakta bulunan bakterilerin, besinlerin artık maddeleri üzerine etkili olup, fermantasyon ile başta pH olmak üzere ortam koşullarını dengede tutarak, belirli tipteki mikroorganizmaların baskın hale gelmesini önleme de rolü vardır (3).

Normal flora, ortam koşulları uygun olduğunda canlıya fazla miktarda fayda sağlamaktadır. Kendi ihtiyacı olandan daha fazla vitaminleri sentezler ve fazlasını dışarı atar. Bu dışarı atılan vitaminler de (B ve K vitaminleri) konakçı tarafından absorbe edilerek kullanılır. Normal flora antogonistik etkiyle patojen bakterilerin koloni oluşturmalarına karşı koruyucu rol oynar. İntestinal bakteriler değişik salgılar üretirler (yağ asidi, peroksidaz vb.) ve bu şekilde

diğer bakterilere karşı inhibitör etki gösterirler. Normal flora doku gelişimini de aktif olarak etkileyerek sindirim sistemindeki lenfatik dokuların gelişmesini sağlar ve patojenik bakterilere karşı mücadelede yardımcı olmaktadır (6,8).

Bulaşıcı hastalıklara neden olan mikroorganizmalar altı ana grupta toplanabilirler. Bunlar bakteriler, mantarlar, protozoonlar, helmintler, artropodlar ve virüsler olarak gruplandırılabilir. Her grubun farklı bir özelliği vardır (yapısal ve moleküler değişimler, biyokimyasal ve metabolik stratejiler, yeniden çoğalma işlemleri vs). Bu özellikler mikroorganizmaların konakçıyla ilişkisini ve hastalıklara nasıl neden olduğunu gösterir (6).

1.5. Bağırsak Florası

Bağırsak florasındaki bakteri türü sayısı duodenumdan başlayarak gittikçe sayıca artmakta ve kalın bağırsakta en yüksek seviyeye ulaşmaktadır. Kalın bağırsaktaki flora, hemen hemen dışkı florasının aynısı olarak saptanmıştır (5,6,8). İnce bağırsak çoğalma için uygun bir ortam değildir. Çünkü buradan geçiş çok hızlıdır. İnce bağırsakta çoğalma yalnızca mukusda (bağırsak içeriği) gerçekleşir. Çoğalma en çok kalın bağırsakta olur ve bakteriler sindirim sisteminde kendilerine en uygun yere yerleşirler (4,8). Bağırsakta ilk kolonizasyon mukusta gerçekleşir ve bakteriler epitel hücrelerine tutunurlar (8,10).

Bağırsak florasının % 96-99' unu anaeroblar ve %1-4' ünü aerob ve fakültatif anaeroblar oluşturur (11). Mide içeriği yalnızca geçici olarak mikroorganizmaları besler. Çünkü asitik pH etkin bir bariyer oluşturur.

Bununla birlikte gastrik mukozadan asite dayanıklı laktobasiller ve streptokoklar geçebilir. İnce bağırsaklarda (duodenum) kolonizasyon az olmakla birlikte (10^4 organizma/g) ileum da streptokoklar, laktobasiller, enterobakteriler ve bakteroideslerin tümünün bulunabildiği ve kolonizasyonun arttığı gözlenmektedir. Kalın bağırsakta bakteri sayısı çok fazla olmakla birlikte (10^{10} organizma/g) tür sayısı da çeşitlilik göstermektedir. Bu türler *Bacteroides* spp., *Fusobacterium* spp., *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli* (*E.coli*), *Enterobacteria* spp., *Klebsiella* spp., *Eubacteria*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* spp., *Streptococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp. olarak bilinmektedir. Bunların büyük bir bölümünü anaerob bakteriler oluşturmaktadır (5,6,11).

Doğal floradaki bir bakterinin istilacı bir bakteri ile yer değiştirmesi oldukça zordur. Çünkü ortamda ilk bulunan bakterilerdir ve ortama adapte olmuşlardır. İstilacı bakterilerin adaptasyonu için zaman gereklidir ve bu süre içinde bakterilerinin bir kısmı dışkı ile atılır (12). Bir bakterinin, doğal flora bakterisi ile yer değiştirmesi ancak kademeli bir şekilde gerçekleşebilir (13). Aynı veya farklı türler arasındaki flora farklılığının nedeni olarak beslenme, pH, antibakteriyal sekresyonlar, coğrafya ve mikroorganizmaların birbirleri üzerine olan etkileri gösterilebilir (2). Doğal florayı oluşturan mikroorganizmalar hastalıklara karşı konakçı direncini önemli ölçüde desteklemektedir (14).

1.6. Normal Floranın Mikroorganizma Florasını Engelleme Etkisi

Patojen bakteriler, vücuda giriş yerlerindeki normal flora bakterileriyle dokulara kolonizasyonda yarış halinde bulunurlar. Bu yarışta dokuya penetre olma ve beslenme bakımından üstünlük gösteren kazanır. Bu temele dayalı olarak organizmanın çeşitli bölgelerinde yerleşmiş olan mikroorganizma florası kendi normal dengesi bozulmadıkça o bölgelere yerleşmek isteyen patojenik mikroorganizmalar üzerine olumsuz etki yaparak yerleşmelerini engeller (3). Bu sebeple beslenme, çevre değişikliği ve immun sisteminde oluşacak bir yetersizlik ile normal flora yapısında oluşacak herhangi bir sapma, patojen mikroorganizmaların dokulara penetre olmasına ve bunun sonucunda da hastalıklara yol açabilir (15).

Bağırsak bakterileri, taşıyıcı canlıya bazı metabolik faydası olabilen organik asitler salgılar. Ayrıca bu mikroorganizmalar konakçının yetersiz beslenmesi sonucunda oluşan B ve K vitamini eksikliğini ürettikleri ürünlerle giderirler (6).

Hayvan türlerine bağlı olarak, mikroorganizma florasının sindirim sistemine yerleşmesi birkaç haftadan aylara kadar değişmektedir. Bu mikrofloranın oluşmasında en önemli faktör florayı oluşturacak mikroorganizmalar için doğru besin kaynağıdır. Mikroorganizmalar bağırsak ortamına adapte olmaları durumunda konakçıyla aralarında kuvvetli bir ekosistem oluştururlar (4,10). Doğal florayı oluşturan mikroorganizmalar ortama sonradan katılan mikroorganizmalar üzerine inhibe edici etki gösterebilmektedir (2).

Sindirim sistemindeki bakteri topluluğunun yapısını büyük oranda, şans (doğumdan kısa süre sonra doğal flora bakterileri, sindirim sistemine sonradan giren bakterilerden daha fazla şansa sahiptir), enzimler, mukus tabakası (barsağın doğal florasına katılabilmek için, bakteriler bağırsaktaki mukusu temel besin kaynağı olarak kullanabilmeli), konakçının bağışıklık sistemi (bakterilerin bağırsak mukozasına kolonize olabilmeleri için konakçının bağışıklık sistemi tarafından kabul görmeli), mikroorganizmanın adezyon özelliği (mukus hücrelerine yapışma kapasitesi) belirler (10). Bunlar dışında mukoz tabaka, gastrik asidite, lizozim enzimi, safra tuzları, bağırsakların peristaltik hareketleri, doğal bağırsak florası, hepatik engel sindirim sistemindeki bakteri topluluğunun oluşumunu etkileyen diğer etkenlerdir (16,17).

1.7. Sindirim Sisteminin Kolonileşme Direnci

Kolonileşme direnci (KD), mikroorganizmaların sindirim sistemine kolonizasyonunda karşılaştıkları bir savunma mekanizmasıdır. Kolonileşme direncini etkileyen faktörler; antibiyotik tedavisi, şiddetli hastalık durumu ve beslenmedir (18,20).

Bağırsak enfeksiyonlarına karşı ilk savunma mekanizmasını (KD) oluşturur. KD, anaerobik bakteriler tarafından kontrol edilir (18,19). Bireyin doğal florasının oluşmasında KD'nin yanı sıra bağışıklık sisteminin de önemli rolü vardır. KD aynı türe ait bireyler arasında belirgin bir şekilde farklılık

göstermektedir. KD' nin ağızdan alınan mikroorganizmalara karşı inhibe edici etkisi vardır (10).

Düşük KD, doğal mikrofloradaki nicelik ve nitelikli büyük değişikliklerden, mukus salgılanmasının engellenmesi veya azaltılmış mukozal hücre dejenerasyonu sonucunda oluşur. KD düzeyinin düşmesi, stres dönemlerinde, yaşlanma sırasında, şiddetli hastalık ve özellikle kemoterapi süresince ya da bundan bir süre sonra ortaya çıkabilir. Konakçı organizmanın iyileşmesi, çoğunlukla organizmanın doğal bağırsak florasının ve böylece KD' nin iyileşmesine işaret eder. Geniş spektrumlu antibiyotik tedavisindeki hayvanlarda, özellikle de, antibiyotik oral yolla uygulanıyorsa, oldukça düşük KD değerleri beklenir (18-20). Bağırsaklardaki antibiyotik yoğunluğu, birçok KD ile bağlantılı bakterinin büyümesini bastırarak kadar yüksek hale gelebilir. Geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi süresince, hastanın bakterilere ya da bağırsaklardaki antibiyotik yoğunluğuna karşı dirençli mayalara duyarlılığına dikkat edilmelidir. Duyarlı bakteriler, patojenik olmasalar bile, bağırsaktaki yoğun antibiyotik seviyesi nedeniyle doğal florayı oluşturan türlerle birlikte ölür. Bağırsak mukozasında meydana gelen tahribatlar ve yoğun antibiyotik tedavisinin sebep olduğu flora eksikliği ile KD düşmektedir (10,18,19). Yoğun antibiyotik tedavisinden sonra 2 hafta içinde enterobakterilerin normal florayı oluşturdukları bildirilmiştir (3). Floraya ilk yerleşen mikroorganizma *E.coli* ise, % 90 oranında doğal florayı oluşturmuş ve yeni gelen bakterilere karşı koymuştur (11). *E.coli* bağırsak içeriğinin oksijen miktarını düşürerek, anaerobik bakterilerin yerleşmesine olanak sağlamaktadır (15).

1.8. Beslenmenin Doğal Floraya Etkisi

Beslenme, floranın içeriğini etkileyerek bağırsak bakterileri için ek besin kaynağı sağlamaktadır. Gıdanın içeriği doğal floranın oluşmasında önemli rol oynar (2). Bağırsak florasında bulunan doğal bakteri türlerinin gelişimi, alınan gıdaya bağlı olarak farklılık gösterir. Bu nedenle, beslenme bağırsak florası içeriğini etkileyebilir. Beslenme alışkanlığına bağlı olarak oluşan doğal flora bakterileri, rekabetçi ya da bağırsak ortamına yeni giren bakteriler için toksinler üreterek bariyer oluşturabilir. Bu durum KD'yi pozitif olarak etkiler. Beslenme bağırsak bariyerini düşürerek daha az rekabetçi ve toksik doğal flora türlerinin gelişimine de olanak sağlayabilir. Bu durum da KD'yi negatif olarak etkilemektedir. Örneğin yeni doğmuş hayvanlar, haftalarca düşük proteinli gıda ile beslenirse, doğal flora üzerine etkin immünite azalır. Bu şartlar altında hayvanların T- hücre savunma sistemi zayıflar. Gıdalarda protein eksikliğinin uzun süre devam ettiği durumlarda, protein miktarı artırılrsa bile, bu tür gıdalarla beslenen hayvanlarda bağırsak flora içeriğinin dengelenmesinde immüitenin gelişimi engellenecektir (10). Doğum sonrasında bağırsak florası sterildir. Ancak zamanla beslenme ve çevre faktörlerine bağlı olarak gelişir (20).

1.9. Antibiyotik Dirençliliği

Dünyada üretilen antibiyotiklerin %50'si insanlarda, %50'si ise hayvancılıkta kullanılmaktadır. Hayvanlarda kullanılan antibiyotikler, bakterilerdeki antimikrobiyal direncin artmasında risk oluşturmaktadır. Sağlıklı hayvanların

intestinal florasındaki bakteriler direnç genleri için taşıyıcı rol oynamakta, doğrudan temas ya da gıdalarla insan florasına kolonize olabilmektedirler. Hatta direnç horizontal olarak insan patojenlerine de geçebilmekte ve enfeksiyonların tedavileri başarısızlıkla sonuçlanabilmektedir (21). Antibiyotikler insanlarda ve hayvanlarda başlıca enfeksiyöz hastalıkların tedavisinde ve bu hastalıklardan korunmada kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra antibiyotikler, hayvanlarda büyümeyi geliştirmek amacıyla ve daha az miktarlarda da tarımda bitkileri korumak amacıyla kullanılmaktadır. Aşırı miktarda antibiyotik kullanımı sonucu, antibiyotiklerin zıt ve yan etki riskleri artmakta ve toplum kaynaklı patojen etkenlerde antibiyotik direnç sorunları ortaya çıkmaktadır. Ayrıca kullanılan antibiyotikler patojenlerin yanı sıra normal flora bakterilerine de etki etmektedirler. Sonuç olarak, herhangi bir antibiyotiğin lokal konsantrasyonu, duyarlı bakteri popülasyonu için minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) dozundan yüksekse ve dirençli klon için MİK dozunun altındaysa bu antibiyotik dirençli türleri seçmektedir (22).

İnsanlarda, hayvanlarda ve bitkilerde aşırı antibiyotik kullanımı, bütün dünyada mikroorganizmalar üzerinde büyük bir selektif etki oluşturmakta ve mikroorganizmalar herhangi bir antibiyotikle karşılaştıkları zaman er ya da geç direnç kazanmaktadırlar. Antibiyotik çağı başladığından beri yeni bir antibiyotik klinik kullanıma girdiğinde bazı türler duyarlı bazıları doğal olarak dirençlidirler. Ancak zamanla duyarlı türlerde direnç gelişmekte ve bu direncin giderek yaygınlaştığı görülmektedir (23-25).

Antimikrobiyal direnç, mikroorganizmanın hayatta kalabilmesi için önemlidir. Bir mikroorganizma, antibiyotiklere karşı ya doğal olarak (intrinsik direnç, kalıtsal direnç) dirençlidir ya da duyarlı iken sonradan mutasyonla veya yeni genlerin kazanımı ile dirençli hale gelmektedir. Gram negatif bakterilerin çoğunun vankomisine ve metisiline, enterokokların ise sefalosporinlere duvar yapıları nedeniyle dirençli olmaları, intrinsik dirence örnek verilebilir (23,26).

Yeni bir direnç geni kazanılması ile oluşan direnç, konjugasyon, transformasyon ve transdüksiyon mekanizmaları ile verici bir bakteriden alıcı bir bakteriye direnç geninin horizontal olarak transferi ile oluşmaktadır. Dirençli gen kazanımı, konjugasyonda bir protein tünel aracılığıyla, transformasyonda çıplak DNA'nın alınmasıyla ve transdüksiyonda ise viral fajlar aracılığıyla meydana gelmektedir (27).

Konjugasyon en önemli gen transfer mekanizmasıdır. Stafilokoklarda (β -laktamlar), enterobakterilerde (ampisilin, sulfonamid/trimetoprim, gentamisin, kloramfenikol) ve enterokoklarda (vankomisin) direnç konjugasyonla oluşmakta ve tahminen % 85 oranında tedavide başarısızlığa yol açmaktadır (21).

Bakterilerdeki önemli direnç mekanizmaları: 1) Antimikrobiklerin, bakteri içerisine girişinin engellenmesi veya aktif dışarı pompalama sistemleri ile bakteri içerisinde birikimlerinin engellenmesi, 2) Antimikrobiklerin, bakterilerdeki hedef bölgelerinin değiştirilmesi ile bakterinin bu

antimikrobiklere duyarlı hale getirilmesi. 3) Antimikrobiklerin bakterilerde üretilen enzimlerle inaktive edilmesi olarak sıralanabilir (23).

Bu çalışmada, Kırıkkale yöresinden toplanan tarla fareleri ile Gazi Üniversitesi ve Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi'nden temin edilen beyaz fare ve ratlarda bağırsak flora içeriğinin aerobik koliform enterobakter grubu bakteriler yönünden incelenmesi, doğal yaşam ve laboratuvar koşullarının bağırsak florası üzerine etkisi ve çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlandı.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Örnekleme ve elde edilen numuneler

Araştırmada Nisan 2003 – Temmuz 2004 yılları arasında Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi'nden alınan 65 adet rat (Wistar rat) rektal svab örneğinde, 10 adet beyaz farenin (Balb-C) duodenum ve kolon doku örneğinde, Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi'nden temin edilen 5 adet beyaz farenin (Swiss albino) ve Kırıkkale yöresi yaban hayatından kapanla yakalanan 29 adet tarla faresinin (Apodemus spp.) duodenum ve kolonundan alınan doku örnekleri olmak üzere toplam 153 adet numune çalışıldı (Çizelge 2.1.).

Ratlardan steril eküvyonlar kullanılarak rektal svap örnekleri alınırken, beyaz ve tarla fareleri kesim yöntemiyle öldürüldükten sonra yapılan nekropsi ile duodenum ve kolon doku örnekleri alındı. Alınan duodenum ve kolon dokularının mukozalarına steril eküvyonlar sürülerek örnekleme yapıldı. Elde edilen örnekler bakteri izolasyonu için hemen uygun besiyerlerine ekildi.

Çizelge 2.1. Hayvan türlerine göre toplanan materyal türü ve sayısı.

Kaynaklar	Hayvan Türü	Numune türü		
		Duodenum	Kolon	Rektal swab
Kırıkkale Yöresi	Tarla faresi	29	29	-
Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi	Beyaz fare	10	10	-
Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi'	Beyaz fare	5	5	-
Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi	Rat	-	-	65
Genel Toplam		153		

2.1.2. Besiyerleri

Ratlardan steril eküvyonlar ile alınan bağırsak içeriği ile otopsi sonrası duodenum ve kolon mukozalarından eküvyonla alınan örnekler, *Enterobacteriaceae* izolasyonu için Kanlı agar, MacConkey agar ve Eosin Methylene Blue (EMB, Merck) agara direkt olarak ekildi. Ekim yapılan besiyerleri 37 °C'de 24-48 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonrasında şüpheli koloniler makroskopik ve mikroskopik değerlendirilmeye alındı. İzolatlar, koloni morfolojisi ve gram boyama özellikleri dikkate alınarak, identifikasyonları yapılmak üzere % 15 gliserin içeren gliserinli Trypticase Soy Broth (TSB, Mast Diagnostics) içerisinde -20 °C'de saklandı. İzolatların biyokimyasal aktivitelerinin saptanmasında % 7 kan içeren Kanlı agar (Mast Diagnostics), antibiyogram testleri için ise Mueller-Hinton agar (Mast Diagnostics) kullanıldı. Bu besi yerleri üretici firmanın direktifleri

doğrultusunda hazırlandı ve bir gece 37 °C'de bekletilerek sterilite kontrolü yapıldı. Besiyerleri + 4 °C'de saklandı ve 1 hafta içinde kullanıldı.

2.1.3. Biyokimyasal Testler

İzole edilen koliform grubu bakterilerin biyokimyasal özellikleri Lassen “Üçlü Tüp” yöntemiyle saptandı. Bu I., II. ve III. tüplerdeki besiyerlerinin içeriği Çizelge 2.2., Çizelge 2.3., Çizelge 2.4.'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. I.Tüp besiyerinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar

Kimyasal	Miktar
Pepton	20.0 g
Lactose	10.0 g.
Glucose	1.0 g.
Sodiumthiosulfate	0.2 g.
Ferro ammonium sulfat	0.3 g.
NaCl	6.0 g.
Agar	17.0 g.
Phenol red (%0.2 lik)	12.5 ml.
Distile su	1000 ml.

Bir erlen içerisinde hazırlanan I. tüp besiyeri erimesi için benmaride 40 dk bekletildi. Süre sonunda I. tüp besiyerinden 7 ml miktarında alınarak 10 ml'lik vida kapaklı tüplere dağıtıldı. Elde edilen tüpler 120 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Sterilizasyondan sonra tüpler eğik bir düzeyin üzerine yatırılarak besi yerinin katılaşması beklenildi.

Çizelge 2.3. II.Tüp'ün hazırlanmasında kullanılan kimyasallar

Kimyasal	Miktar
Pepton (kazein)	5.0 g
Neopeptone	5.0 g.
Mannitol	2.0 g.
Agar	2.5 g.
Potassium nitrate	1.7 g.
Phenol red (% 0.2 lik)	20 ml.
Distile su	1000 ml

Bir erlen içerisinde hazırlanan II. tüp besiyeri erimesi için benmaride 40 dk bekletildi. Süre sonunda II. tüp besiyerinden 5 ml miktarında alınarak 10 ml'lik vida kapaklı tüplere dağıtıldı. Elde edilen tüpler 120 °C' de 15 dakika otoklavda sterilize edildi.

Çizelge 2.4. III.Tüp'ün hazırlanmasında kullanılan kimyasallar

Kimyasal	Miktar
L- tryptophane	0.3 g.
Potassium dihydrogen	0.1 g
Phosphate	0.1 g.
Dipotassium hydrogene	0.1 g
Phosphate	0.1 g.
NaCl	0.5 g.
Üre	2.0 g.
Ethanol (%96)	1 ml.
Phenol red (%0.2 lik)	1.25 ml.
Distile su	1000 ml

Bir erlen içerisinde hazırlanan III. tüp besiyeri eritildikten sonra filtre edilerek (Millipore 0.22 μ) 0.8-0.9 ml miktarında steril tüplere (10x100 mm) dağıtıldı.

Hazırlanan besiyerleri kullanılıncaya kadar +4 °C' de buzdolabında bekletildi.

2.1.4. Antibiyogram Testleri

İzole ve identifiye edilen Enterobakteri suşlarının antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının saptanmasında Amikasin (30mcg), Amoksisilin-Klavunalik asit (20mcg/10), Seftriakson (30mcg), Sefuroksim (30mcg), Siproflaksin (5 mcg), İmipenem (10 mcg), Netilmisin (30mcg), Piperasillin (100 mcg), Trimethoprim+ Sülfamethoksazol (1,25mcg/23,75) antibiyotik diskleri (Oxoid) disk difüzyon metodu kullanılarak Klinik Labratuvar. Standartlar Enstitüsü (Clinical Laboratory Standart Institute (CLSI)) kriterlerine göre değerlendirildi.

2.2. Yöntem

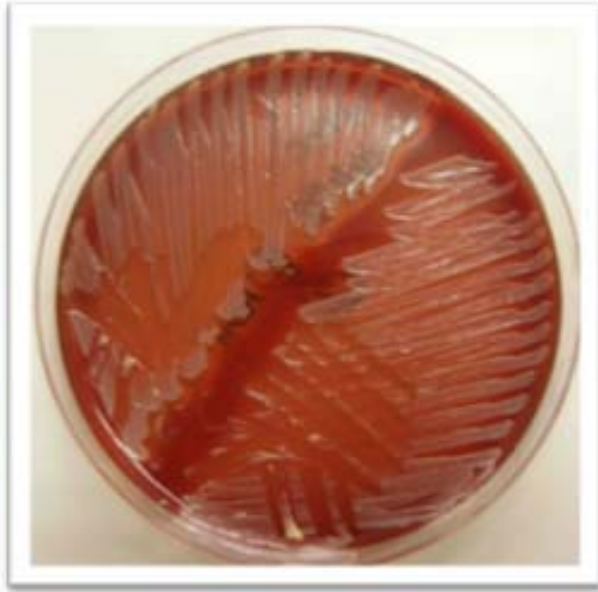
2.2.1. İzolasyon ve İdentifikasyon

Enterobakteri izolasyon ve idantifikasyonu için canlı hayvanların steril eküvyonla rektumlarından alınan bağırsak içeriği ile nekropside çıkarılan bağırsağın duedonum ve kolonundan eküvyonla alınan bağırsak içeriği bekletilmeden kanlı agar, EMB agar ve MacConkey agara direkt olarak ekildi ve 37 °C de 18-24 saat inkübe edildi. Üreyen kolonilerden *Enterobacteriaceae* koloni morfolojisine uyan ve gram negatif özelliği gösteren koloniler seçilerek

saflaştırmak amacıyla sıvı besi yerine (TSB) geçildi. Bu besi ortamında 18-24 saat üretilen mikroorganizmalar tekrar katı ortama (Kanlı Agar) ekilerek, seçilen kolonilerin saflık kontrolleri yapıldı. Katı besi yeri üzerinde üreyen saf kolonilerin oksidaz ve katalaz testleri yapılarak, oksidaz negatif ve katalaz pozitif olan suşların biyokimyasal aktiviteleri saptandı. (şekil 1.1.,şekil1.2.)



Şekil 1.1.İnkubasyonda kullanılan etüv



Şekil 1.2.Kanlı agarda *Enterobacter* spp. koloni görünümü

İzole edilen suşların biyokimyasal özelliklerinin incelenmesinde Lassen Üçlü Tüp Yöntemi kullanıldı. Yarı katı bir besi yeri olan “BİRİNCİ TÜPE” ekim, izole edilen Enterobakter suşlarının 18 saatlik TSB kültürlerinden iğne uçlu öze yardımıyla yapıldı. Ekim yapılan besi yerleri 37 °C de 18 saat inkübe edildi. Bu tüpte aşağıda açıklanan reaksiyonlar okundu.

I. Tüp'ün değerlendirilmesi;

Glukoz fermantasyonu: Pozitif hallerde besi yerinin normal kırmızı rengi tüpün dip kısmından başlayarak sarıya dönüşmüştür. Mikroorganizmanın asit ve gaz oluşumu ile glukozu fermente ettiği hallerde, oluşan gaz besi yerini tüpün dibinden yukarı doğru itebilir. Gaz teşekkülü az olduğu zaman içinde hava kabarcıkları oluşturur.

Laktoz fermantasyonu: Besi yerinin yüzeyinin kırmızıdan sarıya dönüşmesi ile belirlenir.

H₂S oluşumu: Besi yerinde yüzeyden başlayıp derine doğru ilerleyen siyahlaşma ile tanımlanır.

ONPG testi: I nolu tüpteki Laktoz fermantasyonu yapılmamış ise besiyerinin yüzeyinde üreyen kültür Beta-galoktosidaz araştırılması için kullanılır. Laktozlu besiyerinden alınan bir öze dolusu kültür (0,25 ml) fizyolojik tuzlu su ile süspanse edilir. Bunun üzerine 0,25 ml ONPG (ortho-nitro-fenil-beta-galako-piranosid) solusyonu ilave edilir ve 37 °C' lik etüve konur. Beta-

galaktosidaz'ın varlığı halinde sabit sarı renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilir.

ONPG ayracı: 15 ml saf suda 37 °C' de 80 mg ONPG eritilir. Üzerine 5 ml tampon fosfat solusyonu konur ve + 4 °C'de saklanır.

Lizin dekarboksilaz oluşumu: 37 °C'de 18 saat inkübe edilmiş olan 1.tüp kültürün üzerinde teşekkül eden berrak kloroform tabakasından bir pastör pipeti yardımıyla 1 ml sıvı alınarak başka bir tüpe aktarıldı. Bu sıvının üzerine, eşit miktarda ninhidrin (kloroform da %0.1 oranında eritilmiş) ilave edilerek 10 dakika oda ısısında bekletildi. Bu sürenin sonunda menekşe renk oluşumu pozitif olarak değerlendirildi.

Yarı katı bir besi yeri olan "İKİNCİ TÜPE" ekim, izole edilen Enterobakter suşlarının 18 saatlik TSB kültürlerinden iğne uçlu öze yardımıyla yapıldı. Ekim yapılan besi yerleri 37 °C de 18 saat inkübe edildi. Bu tüpte aşağıda açıklanan reaksiyonların varlığı araştırıldı.

II. Tüp'ün değerlendirmesi;

Mannitol Fermantasyonu: Besi yerinin normal kırmızı renginin sarıya dönüşmesiyle belirlenir.

Hareket: Hareketsiz suşlar besi yerinin tam ortasında inokülasyon hattı boyunca sınırlı bir üreme gösterdikleri halde, hareketli olanlar etrafa yayılarak besi yerinde homojen bir bulanıklığın oluşmasına neden olurlar.

Nitrat Redüksiyonu: Ekim yapılan besi yerleri 18 saat 37 °C' de inkübe edildikten sonra üzerlerine ayrı ayrı 4 damla dimetil-alfa naftilamin (0.6 ml/100 ml 5 N asetik asit) ilave edilir. Nitrit oluşumu besi yerinin renginin kırmızıdan kahverengine dönüşmesiyle saptanır.

Taze buyyon kültürlerinden bir öze dolusu alınarak "ÜÇÜNCÜ TÜPE" ekildi. Ekilen besi yerleri 37 °C 'de 18 saat inkübasyona bırakılarak aşağıdaki reaksiyonlar yönünden incelendi.

III. Tüp'ün değerlendirmesi;

Üreaz oluşumu: İnkübasyon süresi sonunda besi yeri renginin sarıdan kırmızıya dönüşmesiyle belirlenir.

İndol oluşumu: Besi yerinin üzerine 0.5 ml miktarında Kovacs ayracı ilave edildi. Sıvı besiyeri üzerinde kırmızı bir indol halkasının oluşumu pozitif olarak değerlendirilir.

Triptofan deaminaz oluşumu: 37 °C de bir gece inkübe edilen besi yeri üzerine Kovacs ayracı ilave edilmeden 0.3 ml miktarında alınarak ayrı bir tüpe aktarılır. Bu tüpün üzerine 1- 2 damla % 10'luk FeCl₃ solüsyonu ilave

edilir. Enzim varlığı, besi yeri renginin normal sarı renginin 3- 5 dakika içinde kiremit kırmızısı rengine dönüşmesiyle saptanır. İzole edilen koliform grubu bakterilerin ayırımında kullanılan biyokimyasal testler Çizelge 2.5' de gösterilmiştir.

Çizelge 2.5. İzole edilen *Enterobacteriaceae* suşlarının biyokimyasal özellikleri

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Shigella spp.</i>	<i>Escherichia gusoni</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Arizona spp.</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
Gram boyama	-	-	-	-	-	-	-
Oksidaz	-	-	-	-	-	-	-
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+
Laktoz	+	-	-	-	-	-	-
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+
Glukoz	+	-	+	+	+	+	+
H₂S	-	-	-	-	+	+	-
Gaz	+	+	-	+	+	+	-
Hareket	+	+	-	+	+	+	-
Üreaz	+	-	-	-	+	-	+
Nitrat	-	+	+	+	+	+	+
İndol	+	-	+	+	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-
LDC	+	+	-	+	-	+	-
ONPG	+	+	+	+	+	+	+

(+):Pozitif (-):Negatif

2.2.2. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

İzole edilen Enterobakter suşlarının 18 saatlik TSB kültürlerinden 0.1 ml miktarında bir pipet yardımıyla alınarak, 15 cm çapında petrilere 4mm kalınlığında olacak şekilde hazırlanan Mueller Hinton Agar yüzeyine damlatıldı ve steril bir baget ile muntazam olarak yayıldı.

Amikasin, Amoksisilin-Klavunalik asit, Seftriakson, Sefuroksim, Siproflaksin, İmipenem, Netilmisin, Piperasillin, Trimethoprim+ Sülfamethoksazol antibiyotik diskleri agar yüzeyine uygun aralıklarla yerleştirildi ve petriler 37 °C` de bir gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda, besiyerinde oluşan zon çapları Klinik Laboratuar Standartlar Enstitü'sünün (Clinical Laboratory Standart Institue (CLSI)) standart sınır değerleri dikkate alınarak kaydedildi. Sonuçların değerlendirilmesinde duyarlılık kriter olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

Çeşitli kaynaklardan elde edilen 65 adet rat rektumu, 15 adet beyaz fare, 29 adet yaban tarla faresinin duodenum ve kolonundan alınan toplam 153 svap örneğinde yapılan bakteriyolojik çalışmalar sonucunda 74 enterobakter izole edildi.

Bu bakterilerin mikrobiyolojik incelemeleri sonrasında izole edilen mikroorganizmaların hayvan türlerine göre dağılımı, incelenen örnek tipi ve izolasyon oranları Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Hayvan türlerine göre incelenen örnekler ve izolasyon sayısı

Hayvan Türü	Örnek sayısı			İzolat sayısı (%)			Toplam izolat sayısı (%)
	<i>Duodenum</i>	<i>Kolon</i>	<i>Rektal</i>	<i>Duodenum</i>	<i>Kolon</i>	<i>Rektal</i>	
Beyaz fare	15	15	-	0(0.0)	10 (66.6)	-	10 (33.3)
Tarla faresi	29	29	-	0(0.0)	12(41.3)	-	12 (20.6)
Rat	-	-	65	-	-	52 (80)	52 (80)
Toplam		153			74 (48.3)		

- : Örnekleme yapılmadı

Çalışılan 15 adet beyaz fare ile 29 adet tarla faresinin duodenumundan alınan svap örneklerinde hiçbir üreme olmazken, kolonlarından sırasıyla % 66.6 (10/15) ve % 41.3 (12/29) oranında izolasyon sağlandı. Ratlardan alınan 65 adet rektal svap örneğinden ise % 80 (52/65) oranında Enterobakter suşu izole edildi.

Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi ve Gazi Üniversitesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarından temin edilen beyaz farelerde, izole ve tanımlanmış mikrobiyotikler arasında tür düzeyinde farklılıklar gözlemlendi (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Farklı deney hayvanları ünitesinde bulunan beyaz fare türlerinin bağırsak içeriğinden izole edilen *Enterobacteriaceae* dağılımı

<i>Enterobacteriaceae</i> türü	Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi	Gazi Üniversitesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı
<i>Escherichia coli</i>	4	5
<i>Shigella</i> spp.	0	1
<i>Escherichia fergusonii</i>	0	1
<i>Citrobacter freundii</i>	0	1
Toplam suş sayısı	4	8

Çizelge 3.3. İzole edilen mikroorganizmaların hayvan türlerine göre dağılımı ve sayısı

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Shigella spp.</i>	<i>Escherichia fergusonii</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Arizona spp.</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Tarla faresi	4 (40)	5 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (10)
Beyaz fare	9 (75)	0 (0)	1 (8,3)	1 (8,3)	1 (8,3)	0 (0)	0 (0)
Rat	45 (86,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (7,7)	1(1,9)	2 (3,8)
Toplam izolat sayısı	58	5	1	1	5	1	3

Toplanan 153 materyalden 74 (% 48.3) adet *Enterobacteriaceae* suşu izole edildi. İzole ve identifiye edilen enterobakter suşlarının 58'i (%78.4) *Escherichia coli*, 5'i (%6.7) *Serratia liquefaciens*, 1'i (%1.4) *Shigella spp.*, 1'i (%1.4) *Escherichia fergusonii*, 5'i (%6.7) *Citrobacter freundii*, 1'i (%1.4) *Arizona spp.*, 3'ü (%4) *Yersinia enterocolitica* olarak saptandı.

3.1. Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları

İzole ve identifiye edilen 58 adet *Escherichia coli* suşunun antibiyogram testi sonucunda izolatların 29'unun (%50) AK (Amikasin), 36'sının (%62.1) AMC (Amoksisilin-Klavunalik asit), 25'inin (%43.1) CRO (Seftriakson), 14'ünün (%24.1) CXM (Sefuroksim), 42'sinin (%72.4) CIP (Siproflaksin), 57'sinin (%98.3) IPM (İmipenem), 57'sinin (%98.3) NET (Netilmisin), 48'inin (%82.8)

PRL (Piperasillin), 58'inin (%100) SXT' ye (Trimetoprim+Sulfametaksazol)' a karşı duyarlı olduğu belirlendi.

İzole ve identifiye edilen 5 adet *Serratia liquefaciens* suşunun antibiyogram testi sonucunda izolatların 1'inin (% 20) AK, 4'ünün (%80) AMC, 2'sinin (%40) CRO, 1'inin (%20) CXM, 4'ünün (%80) CIP, 5'inin (%100) SXT, 5'inin (%100) IPM, 4'ünün (%80) NET, 3'ünün (%60) PRL' ye karşı duyarlı olduğu saptandı.

İzole ve identifiye edilen 3 adet *Yersinia enterocolitica* suşunun antibiyogram testi sonucunda izolatların 2'sinin (%66,6) AK, 1'inin (%33.3) AMC, 3'ünün (%100) CRO, 3'ünün (%100) CXM, 3'ünün (%100) CIP, 3'ünün (%100) SXT, 3'ünün (%100) IPM, 3'ünün (%100) NET, 3'ünün (%100) PRL' ye karşı duyarlı olduğu belirlendi.

İzole ve identifiye edilen 1 adet *Shigella* spp. suşunun antibiyogram testi sonucunda % 0.0 AK, %100 AMC, %0.0 CRO, %0.0 CXM, %100 CIP, %100 SXT, %100 IPM, %100 NET, %100 PRL' ye karşı duyarlı olduğu saptandı.

İzole ve identifiye edilen 1 adet *Escherichia fergusonii* suşunun antibiyogram testi sonucunda %100 AK, %100 AMC, %100 CRO, %0.0 CXM, %0.0 CIP, %100 SXT, %100 IPM, %100 NET, %100 PRL' ye karşı duyarlı olduğu belirlendi.

İzole ve identifiye edilen 5 adet *Citrobacter freundii* suşunun antibiyogram testi sonucunda izolatların 4'i (%80) AK, 4'i (%80) AMC, 5'i (%100) CRO, 3'ü (%60) CXM, 4'ü (%80) CIP, 5'i (%100) SXT, 4'ü (%80) IPM, 5'i (%100) NET, 5'i (%100) PRL' ye karşı duyarlı olduğu saptandı.

İzole ve identifiye edilen 1 adet *Arizona* spp. suşunun antibiyogram testi sonucunda izolatın %0.0 AK, %100 AMC, %100 CRO, %100 CXM, %100 CIP, %100 SXT, %100 IPM, %100 NET, %100 PRL' ye karşı duyarlı olduğu belirlendi. Yapılan antibiyogram testi sonuçları Çizelge 3.3.'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Enterobacteriaceae türlerinin antibiyogram duyarlılık sonuçları

	<i>Escherichia coli</i> n (%)	<i>Serratia liquefaciens</i> n (%)	<i>Yersinia enterocolitica</i> n (%)	<i>Shigella spp.</i> n (%)	<i>Escherichia fergusonii</i> n (%)	<i>Citrobacter freundii</i> n (%)	<i>Arizona spp.</i> n (%)
AK	29 (50.0)	1 (20.0)	2 (66.6)	0 (00.0)	1 (100)	4 (80.0)	0 (00.0)
AMC	36 (62.1)	4 (80.0)	1 (33.3)	1 (100)	1 (100)	4 (80.0)	1 (100)
CRO	25 (43.1)	2 (40.0)	3 (%100)	0 (00.0)	1 (100)	5 (100)	1 (100)
CXM	14 (24.1)	1 (20.0)	3 (%100)	0 (00.0)	0 (00.0)	3 (60.0)	1 (100)
CIP	42 (72.4)	4 (80.0)	3 (%100)	1 (100)	0 (00.0)	4 (80.0)	1 (100)
IPM	57 (98.3)	5 (100)	3 (%100)	1 (100)	1 (100)	4 (80.0)	1 (100)
NET	57 (98.3)	4 (80.0)	3 (%100)	1 (100)	1 (100)	5 (100)	1 (100)
PRL	48 (82.8)	3 (60.0)	3 (%100)	1 (100)	1 (100)	5 (100)	1 (100)
SXT	58 (100)	5 (100)	3 (%100)	1 (100)	1 (100)	5 (100)	1 (100)

AK: Amikasin **AMC:** Amoksisilin-Klavunalik asit **CRO:** Seftriakson **CXM:** Sefuroksim

CIP: Siproflaksin **IPM:** İmipenem **NET:** Netilmisin **PRL:** Piperasilin **SXT:** Trimethoprim+Sülfamethoksazol

4.TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tezde tarla faresi, rat ve beyaz fareden izole ve identifiye edilen aerobik koliform grubu enterobakter suşlarının kültürel, biyokimyasal ve antibiyotik duyarlılıkları araştırıldı.

Çalışmada izole edilen 74 adet enterobakter suşunun 58'i (%78.4) *Escherichia coli*, 5'i (%6.7) *Serratia liquefaciens*, 5'i (%6.7) *Citrobacter freundii* , 3'ü (%4) *Yersinia enterocolitica*, 1'i (%1.4) *Shigella spp.*,1'i (%1.4) *Escherichia fergusonii* ,1'i (%1.4) *Arizona spp.* olarak saptandı. Bu sonuçlara göre, bağırsak florasını oluşturan Enterobakterlerin büyük çoğunluğunu *Escherichia coli*'nin oluşturduğu saptanmıştır. Syed ve ark (14), yapmış oldukları çalışmada germ-free farelere sekal içerik vererek, *E.coli*'nin normal bağırsak florasındaki bulunma sıklığını ve kolonizasyonunu saptamışlar. Sonuç olarak, diğer fakültatif anaerobik bakterilere oranla yüksek oranda izole edildiğini bildirmişlerdir. Araştırmada farelerin doğal bağırsak florasında dominant Enterobakter türünün *E.coli* olması bu deneysel çalışmanın doğruluğunu desteklemektedir.

Mimms vd. (6) duodenumda laktobasiller gibi laktik asit üreten bakterilerin bulunmasının bu bakterilerin diğer bakterilerin üremesine engel teşkil ettiğini göstermişlerdir. Bu araştırmada beyaz fare ve tarla farelerinden elde edilen örneklerin birkaçının duodeunumundan Enterobakter izole edilememiştir. Bu durum laktobasil gibi bakterilerin florada baskın hale gelerek, araştırdığımız

bakteri grubunun üremesini engellemesiyle ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.

Dubos vd. (5) laboratuvar farelerinin bağırsak florasındaki bakteri türü ve sayısının duodenumdan başlayarak gittikçe sayıca arttığını ve kalın bağırsakta en yüksek seviyeye ulaştığını bildirmiştir. 29 adet tarla faresi ve 15 adet beyaz farenin duodenum ve kolonundan alınan örneklerden yapılan mikrobiyolojik incelemede, duodenumun örneklerinden Enterobakter izole edilemezken, kolondan bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bunun nedenin, duodenumdan kolona inildikçe mikroorganizma çeşitliliğinin ve sayısının artmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Bu durum Dubos vd.(5) sindirim sistemi florası konusunda yaptıkları çalışmanın sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Waaij (11) yaptığı çalışmada farklı bakım ve beslenme altında aynı türe ait olan ve olmayan canlılar arasında bağırsak flora bakterilerinin farklılık oluşturabileceğini rapor etmiştir. Bu araştırmada Gazi Üniversitesi ve Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi'nden temin edilen beyaz farelerden izole ve identifiye edilen mikroorganizmalar arasında tür düzeyinde farklılıklar gözlemlendi. Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi'den temin edilen farelerin kolonundan 4 tane *E.coli* izole edilirken Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan 5 tane *E.coli*, 1 tane *Shigella* spp., 1 tane *Escherichia fergusonii* ve 1 tane de *Citrobacter freundii* izole edildi. Elde edilen bu sonuç Waaij'ın(11) elde ettiği sonuçla paralellik göstermektedir. Türler arasındaki bu farklılığın konakçıya bağlı

faktörlerden (immün sistem, bağırsak hareketliği ve genetik özellikler) barınma ve beslenme farklılıklarından kaynaklanabileceği düşünölmektedir.

Ito vd. (28) NC (kendi içinde melezlenmiş) fareleri, GF (Germ free) fareleri ve CV (konvansiyonel) farelerin bağırsak flora ekolojisi üzerinde yaptıkları çalışmalarında, bazı bakteri türlerinin (*Lactobacillus* ve *Bifidobacteri*) bu farelerde farklı sayılarda bulduklarını bildirmişler ve bu durumun da genetik faktörlere bağlı olabileceğini belirtmişlerdir. Bu araştırmada laboratuvar şartlarında yetiştirilen beyaz fare, rat ve yaban hayattan elde edilen tarla farelerinden izole edilen *Enterobacteriaceae* türleri arasında farklılık belirlenmiştir. Bu farklılık hem çevre faktörleri hem de genetik faktörlerden kaynaklanabilir.

Hırayama (29) insan bağırsak florası, domuz bağırsak florası ve farelerin bağırsak florası üzerine yaptığı çalışmalarında, farelerin bağırsak florası çalışmalarında model olarak kullanılabileceğini bildirmiştir. Bu çalışmada farelerin insan bağırsak flora çalışmalarında örnek model olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca insan veya domuz florasının farelere aktarıldığında dominant flora türleri sabit kalırken diğer türlerin değişiklik gösterdiğini bildirmiştir. Bu çalışmada da beyaz fare ve rat türlerinin hepsinde dominant olan *Escherichia coli* en çok izole edilen bakteri olmuş diğer bakteri türlerinin dağılımı değişiklik göstermiştir.

Yapılan antibiyogram çalışmaları sonucuna göre;

Escherichia coli türlerine karşı, en etkili antibiyotiklerin sırayla:
Trimethoprim+Sülfamethoksazol, Netilmisin, İmipenem, Piperasillin,
Siproflaksin, Amoksisilin-Klavunalik asit, Amikasin, Seftriakson, Sefuroksim,
olduğu tesbit edildi.

Serratia liquefaciens türlerine karşı, en etkili antibiyotiklerin sırasıyla;
Trimethoprim+Sülfamethoksazol, İmipenem, Netilmisin, Siproflaksin,
Amoksisilin-Klavunalik asit, Piperasillin, Seftriakson, Sefuroksim, Amikasin
olduğu belirlendi.

Yersinia enterocolitica türlerine karşı, en etkili antibiyotiklerin sırasıyla:
Trimethoprim+Sülfamethoksazol Piperasillin, Netilmisin, İmipenem,
Siproflaksin, Sefuroksim, Seftriakson, Amikasin, Amoksisilin-klavunalik asit
olduğu saptandı.

Shigela spp. türlerine karşı, en etkili antibiyotiklerin sırasıyla;
Trimethoprim+sülfamethoksazol, Piperasillin, Netilmisin, İmipenem,
Siproflaksin, Amoksisilin-Klavunalik asit, olduğu belirlendi.

Escherichia fergusonii türlerine karşı, en etkili antibiyotiklerin sırasıyla;
Trimethoprim+sülfamethoksazol, Piperasillin, Netilmisin, İmipenem,
Seftriakson, Amoksisilin-klavunalik asit, Amikasin, olduğu saptandı.

Citrobacter freundii türlerine karşı, en etkili antibiyotiklerin sırasıyla; Trimethoprim+sülfamethoksazol, Piperasillin, Netilmisin, Seftriakson, İmipenem, Siproflaksin, Amoksisilin-Klavunalik asit, Amikasin, Sefuroksim, olduğu rapor edildi.

Arizona spp. türlerine karşı, en etkili antibiyotiklerin sırasıyla; Trimethoprim+sülfamethoksazol, Piperasillin, Netilmisin, İmipenem, Siproflaksin, Sefuroksim, Seftriakson, Amoksisilin-Klavunalik asit olduğu sonucuna varıldı.

Shigela spp. için Seftriakson, Sefuroksim ve Amikasin'in, *Escherichia fergusonii* Siproflaksin ve Sefuroksim'in, *Arizona* spp. için Amikasin'in dirençli olduğu saptandı.

Bu çalışma sonucunda fare ve ratların bağırsak florasında en yoğun bakteri türünün *E.coli* olduğu, doğal yaşam ve laboratuvar koşullarının bağırsak flora oluşumunda önemli bir rol aldığı ve florada *E.coli*'den sonra ikinci sırada izole edilen Enterobakter gurubu bakterilerden *Serratia liquefaciens* ve *Citrobacter freundii* olduğu bunu sırası ile *Yersinia enterocolitica*, *Shigella* spp, *Escherichia fergusonii*, *Arizona* spp'nin takip ettiği ve böylece beyaz fare, tarla faresi ve ratlarda *Enterobacteriaceae* yönünden bağırsak flora haritasının belirlendiği görülmektedir. Ayrıca *E.coli* başta olmak üzere tesbit edilen diğer Enterobakter türleri üzerine duyarlılık açısından başta Trimetoprim+Sulfametaksazol, olmak üzere İmipenem, Netilmisin, Piperasillin, Siproflaksin, Amoksisilin-Klavunalik asit, Amikasin, Seftriakson ve Sefuroksim gibi antibiyotiklerin etkili olduğu saptandı. Bu doğrultuda Enterobakter orjinli bakteriyel enfeksiyonların tedavi stratejilerinin

belirlenmesinde yukarıda verilen antibiyotiklerin kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- (1) Öner, M., Mikrobiyal Ekoloji. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 1987.
- (2) Gibbons, R.J., Socransky, S.S. and Kapsimalis, B. Establishment of Human Indigenous Bacteria in Germ-Free Mice. J. Bacteriol., 88 (5):1316-1323, 1964.
- (3) Anđ Ö., Anđ K.M., Bozkaya E., Mikroorganizmalar Arası Mikrop-Çevre ve Mikrop-Organizma İlişkileri. Tıbbi Mikrobiyoloji 253-282, 1. Nobel Yayın Evi, İstanbul, 2002.
- (4) Ducluzeau, R. and Raibaund, P. Bacterial Interactions within the Digestive Tract. Rev. Sci. tech. Off. İnt. Epiz., 8 (2), 313-332, 1989.
- (5) Dubos, R., Schaedler, R. W., Costello, R. and Hoet, P. Indigenous, Normal, and Autuchthonous Flora of the Gastrointestinal Tract. J. Exp. Med., 122, 67-75, 1965.
- (6) Mimms, C., Playfair J., Roitt, I., Wakelin, D., Williams, R., The Normal Flora., in: Medical Microbiology., 41-44, Mosby International, 2nd Ed. London., 1998.
- (7) Carter, G. R., The Normal Flora . Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology. 5-6, Ed: Thomas, C.C., Springfield, USA 1973.
- (8) Todar, K., The Normal Bacterial Flora of Animals, University of Wisconsin Department of Bacteriology, <http://textbookofbacteriology.net/normalflora.html> (Erişim tarihi: 05.10.2009)
- (9) Gibson, R.J. and Kapsimalis, B. Estimates of the Overall Rate of Growth of the intestinal Microflora Hamsters, Guine Pigs and Mice. J. Bacteriol. 93 (1): 510-512, 1967.
- (10) Waaij, D. Bioregulation of the Digestive Tract Microflora. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 8 (2): 333-345, 1989.
- (11) Waaij, D. The Persistent Absence of *Enterobacteriaceae* From the Intestinal Flora of Mice Following Antibiotic Treatment. J. Infect. Dis. 118 (1): 32-8, 1968.

- (12) Ozawa, A. and Freter R. Ecological Mechanism Controlling Growth of *Escherichia coli* in Continuous Flow Cultures and in the Mouse Intestine. J. Infect. Dis. 114 , 235-242, 1964.
- (13) Ducluzeau, R. and Raibaud, P. Interaction Between *Escherichia coli* and *Shigella flexneri* in the Digestive Tract of “Gnotobiotic” mice. Infect. Immunity. 9 (4): 730-733, 1974.
- (14) Syed, S.A., Abrams, G.A. and Freter R. Efficiency of Various Intestinal Bacteria in Assuming Normal Functions of Enteric Flora After Association with Germ-Free Mice. Infect. Immunity. 2 (4): 376-386, 1970.
- (15) Apan. T.Z. Mikrobiyolojide probiyotikler ve prebiyotikler. Turkish J. Infect. 14 (4): 579-583, 2000.
- (16) Erganiş, O., Ateş, M., Kaya, O., İstanbulluoğlu, E. *Escherichia coli* Enfeksiyonlarında Patojenite ve İmmunite. Etlik Vet. Mikrob. Derg. 6 (3): 229-240, 1988.
- (17) Befus, A.D. and Bienenstock, J. Immunity to infectious agents in the gastrointestinal tract. J. Vet. Med. 181 (10): 1066-1068, 1982.
- (18) Waaij, D. and Berghuis, J.M. Determination of the Colonization Resistance of the Digestive Tract of Individual Mice. J. Hyg. 72, 376-387, 1974.
- (19) Waaij, D., Berghuis, J.M. and Lekkerkerk J.E.C. Colonization Resistance of the Digestive Tract and the Spread of Bacteria to the Lymphatic Organs in Mice. J. Hyg. 70, 335-342, 1972.
- (20) Tek, Ö. Probiyotik yoğurt. Bil.Tek. Derg. 373,15, 1998.
- (21) Catry, B., Laevens, H., Davriese, A., Opsomer, G. and Kruif, A. Antimicrobial Resistance in Livestock. J. Vet. Pharmacol. Therapy, 26, 81-93. 2003.
- (22) Cizman, M. The Use and Resistance to Antibiotics in The Community Int. J. of Antimicrob.Agents, 21, 297-307, 2003.
- (23) Ryan, K.J. Antimicrobial resistance. Sherris Medical Microbiology. 215-227, McGraw-Hill Companies U.S.A. 2004.

- (24) Cmpnaud, P. J. Resistance aux Antibiotiques: L'etat D'urgence. Science & Vie. November 51-55. 2006.
- (25) Hausler, T. Viruse vs. Superbugs a Solution to the Antibiotics Crisis?. 1st ed. Macmillan, New York, U.S.p:16-30,2006
- (26) Gür, D., Bakterilerde Antibiyotiklere Karşı Direnç. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji Sistemlere Göre Hastalıklar. 167-190. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Sti., İstanbul, 2002.
- (27) Ito, T., Okumak, K., Ma, X.X., Yuzawa H. and Hirasu, K. Insights on Antibiotic Resistance of *S. aureus* from its Whole Genome. Genomic Island SCC. Drug Resistance Updates, 6, 41-52. 2003.
- (28) Ito, T., Oowada, T., Mitsuoka, T. Characteristic faecal flora of NC mice. Lab. Anim., 19, 7-15, 1985.
- (29) Hirayama, K., Ex-Germfree Mice Harboring Intestinal Microbiota Derived from Other Animal Species as an Experimental Model for Ecology and Metabolism of Intestinal Bacteria. Exp. Anim.48(4):219-227, 1999.