

T.C.  
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ (VETERİNER)  
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI  
VFT-2018-0002

**ÇİĞ İNEK SÜTLERİNDE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*  
ETKENİNİN İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU VE  
ANTİBİYOTİK DUYARLILIĞININ BELİRLENMESİ**

**Melih DUYUK**  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DANIŞMAN**  
Doç. Dr. Murat BOYACIOĞLU

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VFT-15033 proje numarası ile desteklenmiştir.

**AYDIN-2018**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji ve Toksikoloji (Veteriner) Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Melih DUYUK tarafından hazırlanan “**Çiğ inek sütlerinde *Staphylococcus aureus* etkeninin izolasyonu, identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi**” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 03/08/2018

Üye (T.D.)	: Doç.Dr. Murat BOYACIOĞLU	ADÜ	.....
Üye	: Prof. Dr. Cengiz GÖKBULUT	BAÜN	.....
Üye	: Doç. Dr. Selim SEKKİN	ADÜ	.....

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün .....tarih ve .....sayılı oturumunda alınan .....nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN

Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmamda ilgi, yardım ve hoşgörüsünü esirgemeyen danışmanım Doç. Dr. Murat BOYACIOĞLU'na çok teşekkür ederim. Ayrıca bana her konuda destek olan Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Cavit KUM'a, Prof. Dr. Ferda AKAR'a, Doç. Dr. Selim SEKKİN'e, tez çalışmanın laboratuvar analizlerinde yanımda olan ve desteğini esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Hande Sultan ŞAHİNER ve Özge BARDAKÇI'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Beni bu günlere getiren aileme, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili eşim Gülçin DUYUK ile oğlum Cahit Demir DUYUK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



# İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜR .....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vii
RESİMLER DİZİNİ .....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ÖZET .....	x
ABSTRACT .....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. <i>Staphylococcus aureus</i> ( <i>S. aureus</i> ).....	4
2.1.1. Tarihçe .....	4
2.1.2. Etiyoloji .....	4
2.1.3. Epidemiyoloji .....	5
2.1.4. Virulens Faktörleri.....	5
2.1.4.1. Bakteri hücre duvarı .....	6
2.1.4.2. Enzimler .....	8
2.1.4.3. Toksinler.....	9
2.2. Mastitis .....	10
2.2.1. Stafilokok Mastitislerin Patogenezi ve Klinik Görünümü .....	11
2.2.2. Stafilokok Mastitislerden Korunma ve Sağaltım.....	13
2.3. Antibiyotik Direnci.....	15
2.3.1. <i>S. aureus</i> ve Antibiyotik Direnci .....	17
2.3.1.1. $\beta$ -Laktam direnci .....	18

2.3.1.2. Penisilin direnci .....	19
2.3.1.3. Metisilin direnci.....	20
2.3.1.4. Glikopeptid direnci .....	22
2.3.1.5. Kinolon direnci .....	23
2.3.1.6. Aminoglikozid direnci .....	24
2.3.1.7. Trimethoprim-sülfametoksazol direnci .....	25
2.3.1.8. Oksazolidinon direnci.....	25
2.3.1.9. Makrolid-linkozamid-streptogramin direnci .....	25
2.3.1.10. Tetrasiklin direnci.....	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
3.1. Gereç.....	27
3.1.1. Araç ve Gereçler .....	27
3.1.2. Süt Örneklerinin Toplanması.....	27
3.1.3. Antibiyogramda Kullanılan Antibiyotikler .....	27
3.1.4. Besiyerleri.....	28
3.1.4.1. Mueller-hinton agar (MHA) .....	28
3.1.4.2. Nutrient broth (NB) .....	28
3.1.5. Çözücüler.....	28
3.2. Yöntem .....	29
3.2.1. <i>S. aureus</i> izolasyonu.....	29
3.2.2. <i>S. aureus</i> identifikasyonu .....	29
3.2.2.1. Gram boyama .....	29
3.2.2.2. <i>DNaz</i> testi .....	29
3.2.2.3. <i>Katalaz</i> testi .....	30
3.2.2.4. Mannitol fermentasyonu.....	30
3.2.2.5. Tüp <i>koagulaz</i> testi.....	30

3.2.2.6. Dry spot staphylect plus testi.....	30
3.2.3. Antibiyogram Testi.....	31
4. BULGULAR .....	33
4.1. Bakteri Suşlarının İzolasyonu ve İdentifikasyonu.....	33
5. TARTIŞMA.....	36
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....	39
KAYNAKLAR.....	40
EKLER .....	51
ÖZGEÇMİŞ.....	52

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>BPA</b>	: Baird parker agar
<b>CLSI</b>	: Clinical Laboratory Standart Enstitute
<b>EKEY</b>	: En küçük etkin yoğunluk
<b>FEM</b>	: Metisiline direnç için gerekli olan
<b>KNS</b>	: <i>Koagülaz</i> negatif stafilokok
<b>KPS</b>	: <i>Koagülaz</i> pozitif stafilokok
<b>MHB</b>	: Mueller-hinton agar
<b>MİK</b>	: Minimum inhibitör konsantrasyon
<b>MRSA</b>	: Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>NAGA</b>	: N-asetilglukozamin
<b>NAMA</b>	: N-asetilmuramik asit
<b>NB</b>	: Nutrient broth
<b>PBP</b>	: Penisilin bağlayan protein
<b>SEA</b>	: Stafilokoksik enterotoksin A
<b>SHS</b>	: Somatik hücre sayısı
<b>TSST</b>	: Toksik şok sendromu toksini
<b>VISA</b>	: Vankomycin intermediate resistant <i>S. aureus</i>
<b>VRE</b>	: Vancomycin resistant <i>enterococcus</i>
<b>VRSA</b>	: Vancomycin resistnt <i>S. aureus</i>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: İnek sütünün bileşimi (Üçüncü, 2005).....	2
Şekil 2: <i>S. aureus</i> mastitislerinin klinik seyri (Pyröla, 1995). ....	12





## RESİMLER DİZİNİ

<b>Resim 1:</b> <i>S. aureus</i> 'un virulens faktörleri .....	6
<b>Resim 2:</b> Bakteri hücre duvarı .....	7
<b>Resim 3:</b> Mikrodilüsyon yöntemine göre hazırlanmış mikroplaka.....	34



## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 1:</b> <i>S. aureus</i> 'un antibiyotik direncinde rol oynayan genler ve etki mekanizmaları ....	18
<b>Tablo 2:</b> Antibiyogram testinde kullanılan antibiyotikler. ....	28
<b>Tablo 3:</b> <i>S. aureus</i> suşuna ait EKEY ( $\mu\text{g/ml}$ ) aralığı.....	33
<b>Tablo 4:</b> İzole edilen <i>S. aureus</i> suşlarının (n=47) mikrodilüsyon metoduna göre EKEY, EKEY <sub>50</sub> , EKEY <sub>90</sub> değerleri ve direnç oranı. EKEY: En küçük etkili yoğunluk. ....	35



## ÖZET

### ÇİĞ İNEK SÜTLERİNDE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIĞININ BELİRLENMESİ

**Duyuk M. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji ve Toksikoloji (Veteriner) Programı Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2018.**

Hayvansal protein ihtiyacının karşılanmasında temel gıda maddelerinden biri olan süt, insanların sağlıklı beslenmesinde vazgeçilmez bir öneme sahiptir. Süt zengin bir besin kaynağı olmasının yanında çeşitli mikroorganizmaların kolayca bulaşabileceği ve hızla üreyip çoğalabileceği çok uygun bir ortamdır. Sütü kontamine eden en önemli mikroorganizmalardan birisi de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)'tur. Yapılan çalışmalarda stafilocokların antibiyotiklere duyarlı olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada bazı antibiyotiklerin *S. aureus*'a mikrodilüsyon yöntemi ile duyarlılığı araştırıldı. Çalışma kapsamında Muğla'nın Milas ilçesinden alınan 100 adet çiğ süt örneklerinden etken izolasyonu ve identifikasyonu yapıldı. Sefoksitin, metisilin, tetrasiklin, tilosin, florfenikol, neomisin, siprofloksasin, linkomisin ve polimiksin B olmak üzere 9 antibiyotik duyarlılık testi için kullanıldı. Antibiyotiklerin En Küçük Etkin Yoğunlukları (EKEY) mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak belirlendi. İzole edilen suşların sefoksitin, metisilin, linkomisin ve tilosine %100, florfenikole % 95.7, neomisine % 89.3, polimiksin B ye % 87.2, siprofloksasine % 55.3, tetrasikline % 46.8 dirençli olduğu belirlendi. Bu sonuçlar mastitis sağaltımı ve korunmasında antibiyotik seçiminin duyarlılık testlerine göre yapılmasını göstermesi açısından önem taşımaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Antibiyotik Duyarlılığı, Çiğ Süt, *Staphylococcus Aureus*.

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLATION, IDENTIFICATION AND ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY IN RAW CROP MILK

Duyuk M. Aydın Adnan Menderes University Health Sciences Institute of Pharmacology and Toxicology (Veterinary) M.Sc. Program, Aydın, 2018.

Milk, one of the basic foodstuffs for meeting animal protein needs, has an indispensable prescription for healthy eating of people. As milk is a rich source of nutrients, it is a very convenient environment in which various microorganisms can easily infect and reproduce rapidly. One of the most important microorganisms contaminating the milk is *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Studies have reported that staphylococci are susceptible to antibiotics. In this study, susceptibility of some antibiotics to *S. aureus* by microdilution method was investigated. In the scope of the study, 100 isolates of raw milk from Milas district of Muğla were isolated and identified. Nine antibiotics, ceftiofur, methicillin, tetracycline, tylosin, florfenicol, neomycin, ciprofloxacin, linkomycin and polymyxin B were used. Minimal inhibitoric concentrations of antibiotics (MIC) were determined using the microdilution method. The isolated strains were found to be resistant to ceftiofur, methicillin, lincomycin and tilosin 100 %, florfenicol 95.7 %, neomycin 89.3 %, polymyxin B 87.2 %, ciprofloxacin 55.3 %, tetracyclin 46.8 %. These results are important for showing the selection of antibiotics according to the sensitivity tests for mastitis treatment and protection.

**Key Words:** Antibiotic Susceptibility, Raw Milk, *Staphylococcus Aureus*.

# 1. GİRİŞ

Süt pH'sı içerdiği laktoz, sitrik asit, süt yağı, azot, mineral maddeler ve yüksek su içeriği nedeniyle mikroorganizmaların gelişmesi için uygun besi ortamı oluşturur. Çiğ süte, çoğu zaman hava, toz, toprak, su ve gübre kaynaklı mikroorganizmalar çevreden bulaşabilmektedir (Ünlütürk ve Turantaş, 1999; Gran ve ark, 2003). Bulaşan mikroorganizmalar mikrobiyal gelişmeyi önleyici, koruyucu yöntemleri uygulanmadığı durumlarda hızla gelişerek sütte bozulmaya neden olmaktadır (Ünlütürk ve Turantaş, 1999). Sütü kontamine eden en önemli mikroorganizmalardan biri *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)'tur. Etken çevreden bulaşabileceği gibi mastitisli hayvanlardan sağılmış sütlerden de bulaşabilmektedir (Arda ve ark 1982; Valsangiacomo ve ark, 2000).

Süt teknolojisinde ise çiğ süt denildiği zaman, hayvanının memesinden muntazam aralıklarla ve tam olarak sağılan, sonra soğutulan, içerisinden herhangi bir bileşeni alınmayan veya içerisine herhangi bir madde ilave edilmeyen, işlenmek üzere süt fabrikalarına kabul edilen ve önceden herhangi bir işlem uygulanmamış süt anlaşılmaktadır (Kalkan ve Halkman, 2006).

Meme dokusunda sentezlenen laktoz, sütün temel karbonhidratıdır. Doğada yüksek oranda, yalnız sütte bulunur. Bu yüzden laktoz süt şekeri olarak da adlandırılmaktadır. Katkısız inek sütü ortalama % 4,7 laktoz içermektedir. Sütü meydana getiren su dışındaki bileşenlerin arasında miktar olarak en fazlası, yani % 37,3'ü süt şekeri (Şekil 1). Diğer bir ifade ile yağ dışında kalan kurumaddenin % 54'ünü laktoz oluşturmaktadır. Laktozun miktarı sütün donma ve kaynama noktalarını, özgül ağırlığını ve ozmotik basıncını etkilemektedir. Normal koşullarda, doğal olarak laktozun miktarı çok az değiştiğinden, sütün donma ve kaynama noktaları sabittir. Laktoz gerek sütün ve gerekse süt ürünlerinin aromasında, yapısında ve niteliğinde geniş ölçüde etkisi olan bir maddedir. Laktoz taze süte tatlımsı bir aroma verir. Bunlara ilaveten beslenme fizyolojisi açısından da önemli bir süt bileşenidir. Kalsiyum emilimini düzenler, yağ metabolizmasında etkilidir ve geliştirdiği asitlikle bağırsak mikroflorasını olumlu yönde dengeleyerek patojenlerin inhibisyonuna, yararlı mikroorganizmaların sayısının artmasına neden olur. Laktozun bileşiminde yer alan galaktoz beyin dokusundaki glikolipitlerin kaynağını teşkil ettiğinden beyin gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Walters ve Jenness, 1984; Metin, 2001).



*S. aureus* ineklerin meme dokularında görülen ve süt üretimi yapan hayvanların en önemli mastitis etkenidir. Öldürücü olabilen bu meme salgı bezi enfeksiyonu tüm dünyada süt üretimi yapılan ineklerde yaygın olarak görülür ve süt endüstrisinde önemli ekonomik kayba yol açmaktadır (Kanber, 2014).

*S.aureus* kaynaklı mastitisin tedavisinde antibiyotiklerin bilinçsiz ve yaygın olarak kullanılması direnç gelişimine sebep olabilmektedir. Mastitise neden olan patojenlerin identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi sadece sağaltım amaçlı değil, populasyon içinde veya populasyonlar arasında dirençli izolatların yayılımının takip edilmesi için de son derece önemli görülmektedir (Güler ve ark, 2005).

Çiğ sütler besin zehirlenmelerinde etkili olan *S. aureus* açısından yüksek oranda risk oluşturabilmektedir. Etken, subklinik mastitislerin %30-40'ından ve akut mastitislerin % 20-30'undan sorumludur. Antibiyotiklerin bilinçsiz, yaygın ve etiket dışı kullanımı ülkemiz ekonomisine ve üreticiye zarar vermektedir. Tüketicilerin de antibiyotik ilaç kalıntılarına maruz kalması sağlık sorunlarının artmasına, dirençli bakteri suşlarının gelişmesine ve sağaltımların başarısızlığına, artan dozlarda antibiyotik kullanımlarına neden olmaktadır. Antibiyotikler ve kalıntıları ilaç allerjisine, bakterilerde antibiyotiklere karşı direncin ortaya çıkmasına, süperenfeksiyon, canlıda bağışıklık sisteminin baskılanması veya bozulmasına neden olmaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

#### 2.1.1. Tarihçe

Stafilokoklar ilk kez 1878'de Robert Koch tarafından tanımlanmış ve 1880'de Luis Pasteur tarafından sıvı besiyerinde üretilmiştir. 1881'de Alexander Ogston insan apse materyalinden elde ettiği bakteriyi üzüm benzeri küme yapması nedeniyle *Staphylococcus* olarak adlandırmıştır. Daha sonrasında ise fare ve kobaylar için stafilokokların patojen olduklarını bildirmiştir. Rosenbach 1884'de besiyerindeki beyaz renkli kolonileri *S albus*, sarı-portakal renkli kolonileri ise *S. aureus* olarak isimlendirmiştir (Bilgehan 2000). Alexander Fleming'in 1928 yılında penisilini bulması ile stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde önemli bir aşama kaydedilmiştir. Ancak penisilin klinikte yaygın olarak kullanılmaya başlanması ile birlikte penisilini parçalayan stafilokok suşları da ortaya çıkmıştır. Stafilokokların *penisilinaz* salgıladığı ilk kez 1944'te Kirby tarafından gösterilmiştir (Ulusoy ve ark, 2004). 1961 yılında ise metisilin kullanılmaya başlanmasından kısa süre sonra bu antibiyotiğe de direnç gelişmiştir. Metisilin dirençli *S. aureus* (Methicillin resistance staphylococcus aureus, MRSA) suşları 1970'li yıllardan beri yaygın olarak tespit edilmeye başlanmıştır (Deurenberg, 2007).

#### 2.1.2. Etiyoloji

Stafilokoklar, Gram pozitif, sporsuz, hareketsiz, katalaz pozitif, oksidaz negatif ve üzüm salkımı şeklinde kümeler tarzında 0.5-1.5 µm çapında koklardan oluşmaktadır. Stafilokoklar karotenoidlerden dolayı pigment meydana getirirler. Laboratuvar ortamında rutin olarak kullanılan besiyerlerinde kolayca ürer ve 37 °C'de 24-48 saat içinde 2-4 mm çapında düzgün koloniler oluştururlar. *S. aureus* altın sarısı, *S. epidermidis* ise beyaz renkte koloni oluşturur. Anaerobik koşullarında pigment oluşturma yeteneği ortadan kalkar. Laboratuvarda 10-42 °C'de üreyebilmelerine rağmen optimum üreme sıcaklığı 37 °C'dir. Kültürlerde +4 °C'de 2-3 ay, -20 °C'de 3-6 ay canlılıklarını koruyabilirler. Sporsuz olmasına rağmen dış etkilere ve dezenfektanlara karşı oldukça dayanıklıdır. Stafilokoklar 60 °C'de 30 dakika sıcaklığa dayanabilirler. % 2'lik fenolde 15 dakika sürede inaktive olurken, % 0,9'luk NaCl ve sakkarozaya tolerans göstermektedir (Akan, 2006).



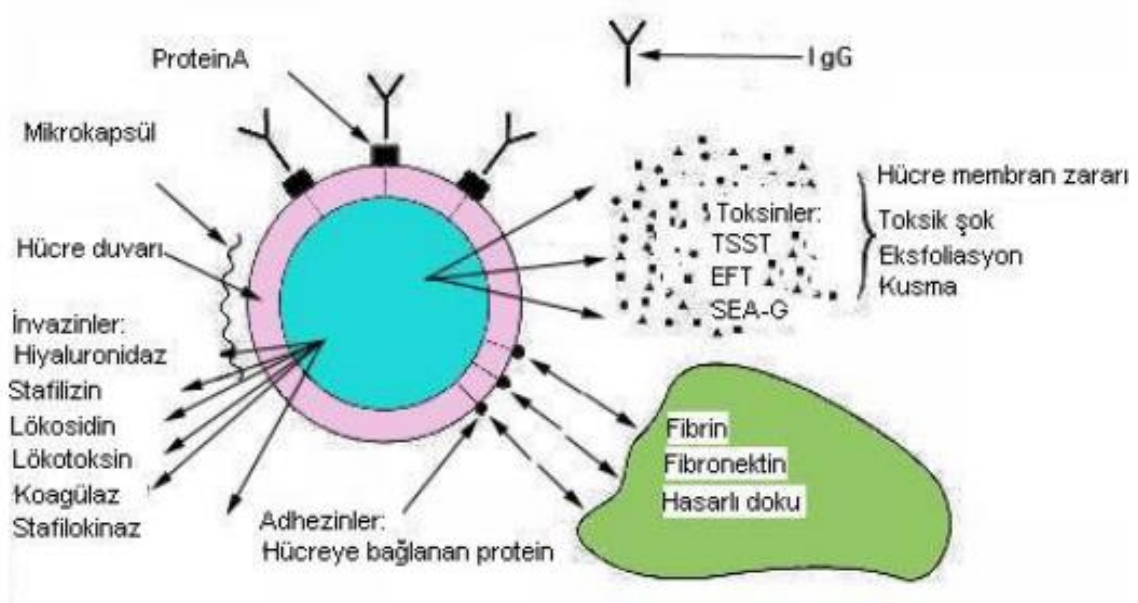
### 2.1.3. Epidemiyoloji

Gerek veteriner hekimlik gerekse beşeri hekimlik alanlarında, epidemiyolojik araştırmaların temel amacı bir patojenin doğadaki yayılma yollarını ve kaynaklarını tam olarak belirleyerek etkili kontrol ve eradikasyon stratejileri geliştirmektir. Hem insan hem de hayvanlarda önemli enfeksiyonlara neden olan *S. aureus*'un çok sayıda suşu vardır. Epidemiyolojik araştırmalarda etkenlerin alt tiplendirmelerinin (klonal yakınlıklarının) yapılması gerekmektedir. Klon, farklı coğrafik bölgelerdeki farklı kaynaklardan birbirinden bağımsız olarak ve olasılıkla farklı zamanlarda izole edilen, fakat birbirinin aynı birçok fenotipik ve genetik özelliğe sahip olduğu için belirli bir orijinleri olduğunu düşündüren suşlar topluluğudur (Derbentli, 2002).

Veteriner hekimlikte sığır mastitislerinin en önemli etkenlerinden biri olan *S. aureus*'un bulaşıcı bir patojen olduğu yıllardır bilinmektedir. *S. aureus*'un ana rezervuarları arasında, enfekte meme lobları, meme ve meme başı derileri ile sağımda kullanılan her türlü araç gereçler sayılabilir. Ancak *S. aureus*'lar barınak malzemeleri, yemler, ahırda kullanılan araç gereçler, ahırda bulunan diğer hayvan türleri ve bakıcılardan da izole edilebilmektedir (Larsen ve ark, 2000; Zadoks ve ark, 2002).

### 2.1.4. Virulens Faktörleri

Stafilokok türleri konak organizmaya girdiklerinde mevcut bölgede ekstraselüler olarak çeşitli maddeler oluşturarak değişik klinik tablolara sebep olabilirler. Konak dokuları arasında ve/veya kanda yayılmak suretiyle enfeksiyona neden olabilirler (Koneman ve ark, 1997). Stafilokoklar hücresel komponent, enzim ile ekstraselüler toksin ve hemolizin üretimi yaparak konak hücrede tahribata sebep olmaktadır. *S. aureus*'da bulunan kalın peptidoglikan tabaka virulense katkıda bulunmaktadır. Peptidoglikan tabaka aynı zamanda beyaz kan hücrelerinin agregasyonu ve komplement sisteminin aktivasyonu ile sonuçlanan makrofaj hücrelerinin sebep olduğu çeşitli sitokinlerin salgılanmasını uyarır (Resim 1) (Lowy, 1998).



**Resim 1:** *S. aureus*'un virulens faktörleri (Todar, 2012).

#### 2.1.4.1. Bakteri hücre duvarı

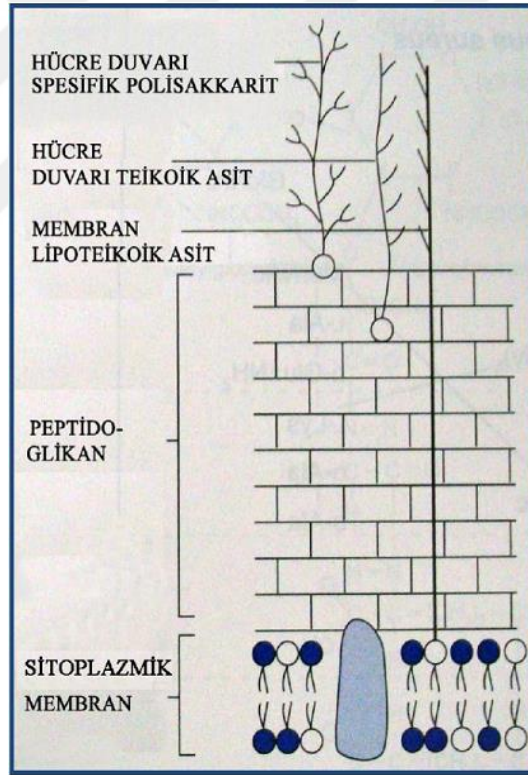
Bakteri hücre duvarı bakteriyi fagositozdan koruyan yapıdadır. Genetik faktörler ve üreme ortamlarına bağlı olarak birçok stafilokok tarafından protein ve küçük peptidlerin oluşturduğu, suda çözünebilen, gevşek bağlı ince monosakkarid yapıda olan slaym tabaka üretilir. Ekstraselüler yapı, bakteriyi dokulara ve katater, greft, protez materyallere ve şant gibi yabancı cisimlere bağlar. Bu durum özellikle avirulan koagülaz negatif stafilokok (KNS)'ların yaşamı için önemlidir. Stafilocokların hücre duvarının en dış tabakası polisakkarid kapsül ile örtülüdür. *S. aureus*'da tanımlı 11 kapsül serotip bulunmaktadır. Enfeksiyonların birçoğu serotip 5 ve 7 ile bağlantılıdır. Serotip 1 ve 2 çok kalın bir kapsüle sahiptir, mukoid görünümlü koloniler oluşturur (Muray ve ark, 2005).

Peptidoglikan tabaka, hem gram pozitif hem gram negatif bakterilerde bulunan ve hücre duvarının temel yapısını oluşturan karmaşık bir makromoleküldür. Stafilocokların hücre duvarı ağırlığının yarısı bu tabakadan oluşmaktadır. İnsan hücrelerinde bulunmayıp bakteri hücrelerinde bulunduğu için antibakteriyel ilaçlar için hedef oluşturmaktadır. Glikan zincirlerin tabakalarından oluşan bu peptidoglikan iskelet, N-asetilmuramik asit (NAMA) ve N-asetilglukozaminin (NAGA) 10-12 farklı alt ünitelerden oluşmaktadır. NAMA alt ünitelerine bağlanan oligopeptid yan zincirler pentaglisin köprüleriyle çapraz bağlanır. Çapraz bağlar hücre duvarının sağlamlığını artırır ve bu bağların yapısı türler arasında farklılık göstermektedir. *S. aureus*'da çapraz bağlantı oranı fazladır ve bu özellik bakterinin lizozim

enzimine karşı dirençli olmasını sağlamaktadır (Ünal, 2004; Lodise ve ark, 2005; Muray ve ark, 2005).

(Resim 2) Teikoik asit suda eriyebilme yapısında olan, fosfodiester bağları ile peptidoglikan tabakasına kovalent olarak bağlanan uzun zincirler oluşturan şeker-alkol-fosfat polimerleridir. Hücre duvarı kuru ağırlığının % 30-50'sini oluşturmaktadır. Kalınlığının ortalama 10-12 nm arasında olduğu belirtilmiştir. Ribitol teikoik asit ve gliserol teikoik asit olmak üzere iki tip vardır (Ünal, 2004). *S. aureus*'da ribitol teikoik asit ile NAGA rezidüleri bulunmaktadır (Murray ve ark, 2002).

Protein A, elastin, kollajen, fibronektin bağlayan protein ve kümeleşme faktörü kimyasal yapısı ve hücre duvarındaki yerleri birbirine benzemekte olup stafilokoklara özgü yüzey proteinleridir. Proteinler, stafilokokların konak dokularına kolonize olmalarını sağlar (Alen ve ark, 2006).



**Resim 2:** Bakteri hücre duvarı (Koneman ve ark, 2006).

*S. aureus* 30'dan fazla antijene sahiptir. En önemli antijenik yapıları hücre duvarlarıdır ve yapının kalınlığı 120 nm'nin üzerine çıkabilir. Hücre duvarının yapısında peptidoglikan, teikoik asit ve protein bulunmaktadır. Peptidoglikan zincir monositlerden

salınarak apse oluşumuna yol açacak interlökin-1 salınımını sağlarlar. Teikoik asit tek başına zayıf antijenik özellik göstermesine rağmen peptidoglikan ile birlikte antikor sentezinin uyarımı gibi önemli biyolojik aktivitelere sahiptir. Diğer komponent olan proteinler ökaryotik hücrelere bağlanırlar. Bu proteinler adezyon için önemli olan fibronektin, fibrinojen, laminin ve kolagen içerirler. Adezyon proteinlerinin bağlanması ile dokulara bakteriyel tutunma gerçekleşmiş olur. Antijenik özelliğe sahip sekiz proteinden en iyi çalışılmış olan protein A, *S. aureus* suşlarının yaklaşık % 90-98'inde mevcuttur (Dilsiz, 2010).

#### 2.1.4.2. Enzimler

*Katalaz*, stafilokoklar için toksik etkisi olan hidrojen peroksidi ( $H_2O_2$ ) oksijen ve suya parçalar. Toksik  $H_2O_2$  ve serbest radikallerini inaktive etmesi sayesinde mikroorganizmayı konağın savunma mekanizmalarından korur. *Koagülaz*, ekstraselüler olarak salgılanan bir enzimdir ve fibrinojeni fibrine çevirerek pıhtılaşma işlevini görür. Enfeksiyon esnasında *in vivo* fibrin bariyeri oluşturarak bakteriyi fagositozdan korur. *Koagülaz* üretimi *S. aureus* için belirleyici bir faktördür. *S. aureus* suşları serbest ve bağlı *koagülaz* (clumping factor) olmak üzere immünolojik ve etki mekanizmaları farklı olan iki ayrı tipte *koagülaz* enzimi üretirler. Protein yapıda olan serbest *koagülaz*, fibrinojenin fibrine dönüşmesi ile trombin benzeri bir faktör olan stafilotrombin oluşturarak stafilokokların kümeleşmesini sağlar. Bağlı *koagülaz* ise hücre duvarına bağlı halde olup direkt olarak fibrinojene doğrudan bağlanarak onu çözülemez fibrine dönüştürür. Bu sayede hücre yüzeyinde fibrin iplikçikleri meydana gelir ve stafilokokların gözle görünür kümeler oluşturmasına neden olur. *Hyaluronidaz*, *S. aureus* suşlarının % 90'ının ürettiği, antijen özelliği olan bir enzimdir. Bağ dokusunun yapısında bulunan hyaluronik asitin parçalanmasını ve böylece stafilokokların doku içerisinde kolayca yayılmalarını sağlar. Fibrinolizin, dokularda bulunan fibrin kümelerini parçalayarak enfeksiyonun dokularda daha kolay yayılmasına yol açar. *Lipaz*, deri ve deri altı dokulardaki lipidleri hidrolize ederek stafilokokların lipid bakımından zengin olan bölgelerde yaşamalarını sağlar. *Deoksiribonükleaz* (DNaz), DNA omurgasındaki fosfodiester bağlarını hidrolize eder. *Beta laktamaz*, antibiyotiklerin beta-laktam halkasını hidrolize eder ve özellikle penisilin ve sefalosporinler gibi beta laktam halkasına sahip antibiyotiklere direnç gelişmesine neden olan enzimdir (Gülbandılar, 2006; Barkar, 2009; Dilsiz, 2010).

### 2.1.4.3. Toksinler

*S. aureus* beş adet sitolitik toksin (alfa, beta, gama, delta toksin ve lökosidin), epidermolitik toksin, toksik şok sendromu toksini ve beş farklı enterotoksine sahiptir. Sitolitik toksinler hemolizinler olarak da bilinirler. İlk dört toksinin aktivitesi eritrositlerle sınırlı olmayıp, lökosidin eritrositler üzerine etki etmemektedir (Barkar, 2009).

Alfa toksin *S. aureus* suşlarının membrana zarar veren en etkili nörotoksinidir. Hemolitik, dermonekrotik ve sitolitik özelliklere sahiptir. Eritrosit, lökosit, trombosit gibi çeşitli ökaryotik hücreler üzerinde bulunan reseptörlere bağlanarak hücre membranı üzerinde porlar oluştururlar (Ünal, 2007; Barkar, 2009; Dilsiz, 2010).

Beta toksin *Sfingomiyelinaz C* olarak da bilinen bir toksindir ve daha çok koyun daha az olarak da insan ve tavşan alyuvarlarını lize ederken lökosit, makrofaj ve fibroblastlar dahil birçok hücre için de toksik özellik gösterir. Sığır mastitislerinden izole edilen suşların çoğunda üretilmektedir ve bu nedenle de mastitisin patogenezisinde önemlidir (Ünal, 2007).

Gama toksin insan, koyun ve tavşan eritrositleri duyarlı iken kanatlı ve at eritrositleri dirençlidir. Belirgin hemolitik aktivitesinin dışında etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir (Ünal, 2007; Barkar, 2009).

Delta toksin eritrosit, lökosit, makrofaj, lenfosit ve trombositler üzerinde lize edici etkisinin yanısıra dermonekrotik etkisi de saptanmıştır. Alfa ve beta toksinlerden farklı olarak immunolojik aktiviteye sahip değildir (Dinges ve ark, 2000).

Lökosidin mastitis vakasından izole edilen *S. aureus* suşlarının bir kısmında lökotoksik etki saptanmıştır. Bu toksinlerin sığır mastitislerinde virülens faktörlerden biri olabileceği ve hastalığın gelişiminde önemli bir role sahip olabileceği düşünülmüştür (Fournier ve ark, 2008). Lökosidin tek başına litik etkiye sahip olmayan, birbiriyle sinerjik etki yapan S (slow) ve F (fast) olarak isimlendirilmiş iki komponenten meydana gelir. Granülosit ve makrofajlara üzerinde litik etkiye sahiptir ve stafilokokları fagositoza karşı korumaktadır (Rainard ve ark, 2003; Barkar, 2009).

Epidermotolitik toksinler cildin epidermis tabakasında bulunan mukopolisakkaritlerini hidrolize ederler. *S. aureus* suşunda epidermolitik toksin genlerine rastlanmamış iken, Toksik şok sendromu toksini (TSST) insanlarda toksik şok sendromu hastalığına yol açan protein tabiatlı bir toksindir. Yetişkinlerde yüksek ateş, döküntü,

kusma, ishal ve çocuklarda ani ölümlere sebep olabilmektedir. (Karahan, 2009; Pehlivanoglu, 2011).

## 2.2. Mastitis

Mastitis, dünyada özellikle süt sığırcılığında görülen ve süt endüstrisinde ekonomik kayıplara neden olan bir meme enfeksiyonudur (Jain, 1979). Yunancada meme anlamına gelen “mastos” ve yangı anlamına gelen “itis” sözcüklerinin birleştirilmesinden meydana gelen “mastitis” hastalığının ortaya çıkış tarihi tam olarak bilinmemekte beraber insanlar tarafından evcilleştirilen ineğin tarih olarak bilinen M.Ö 9000 yılına dayandığı bildirilmektedir. (Kesenkaş, 1999).

Mastitis, sütçülük işletmelerinde giderlerin artması ve süt veriminin azalması gibi sonuçlara yol açarak önemli ekonomik kayıplara sebep olan yangısal bir bozukluktur. (Albayrak, 2007).

Mastitis enfeksiyonlarının 3 formda olduğu bilinmektedir. Latent enfeksiyon olarak bilinen enfeksiyon türünde hiçbir yangı belirtisi olmayıp, sütteki somatik hücre sayısı (SHS) normal düzeyde bulunmaktadır. Patojen mikroorganizma olmasına rağmen memede patolojik olarak değişiklik görülmemektedir. Sütün değerlerinde belirgin bir değişiklik yoktur (Kesenkaş, 1999).

İkinci enfeksiyon şekli subklinik mastitistir. Mastitis olgularının çoğunluğunda % 90-95’lik bir kısmını oluşturur. Yüksek SHS’na ilave olarak patojen mikroorganizmalar da bulunur. Bu tür mastitis enfeksiyonları olgularında klinik belirti göstermeksizin gelişim gösterir. Uzun süren subklinik mastitis olguları, klinik formdakine oranla 40 kat daha fazla görülür ve çoğunlukla klinik mastitise liderlik eder (Kesenkaş, 1999). Meydana gelen değişikliklerin kolay fark edilememesi, özel yöntemler kullanılarak tanımlanabilmesi, süt veriminin ve kalitesinin azalması, klinik mastitislere kıyasla daha fazla oranda görülmesi nedeni ile süt sığırcılığı çiftliklerinde daha fazla öneme sahiptir (Dilsiz, 2010). Semptom göstermeyen hayvanlar sağlıklı kabul edilir ve bu nedenle subklinik enfekte hayvanlar diğer sağlıklı hayvanlar için bir rezervuar görevi görür ve sağlıklı hayvanlar arasında enfeksiyonun yayılımına neden olurlar (Özpuolat, 2011).

Üçüncü olarak yer alan klinik mastitis ise sütte ve meme bölgesinde meydana gelen anormal değişiklikler ile teşhis edilebilir. Meme bölgesi sert, kızamık ve ateşlidir. Süt

içeriğinde pıhtılaşma, ipliksi ve sulu oluşumlar “strip cup” testi ile gözlenebilir. Hayvanların enfeksiyona verdiği yanıt, lökositlerin kandan enfeksiyon bölgesine kadar ulaşmasıdır (Kesenkaş, 1999). Klinik mastitiste süt, sulu veya kendine özgü renginden uzak, çoğunlukla kahverengi veya kehribar rengi görünümünde ve pıhtı ile flakonlar içerir. İleri derece klinik olgularda enfekte olan loblar şişerek ateşli, sert ve dokunmaya karşı hassas bir hal alırlar. Reaksiyon gösteren inekler depresyon, sinirli davranış ve yem tüketiminde azalma gibi belirtiler gösterir (OviedoBoyso ve ark, 2007).

### 2.2.1. Stafilokok Mastitislerin Patogenezi ve Klinik Görünümü

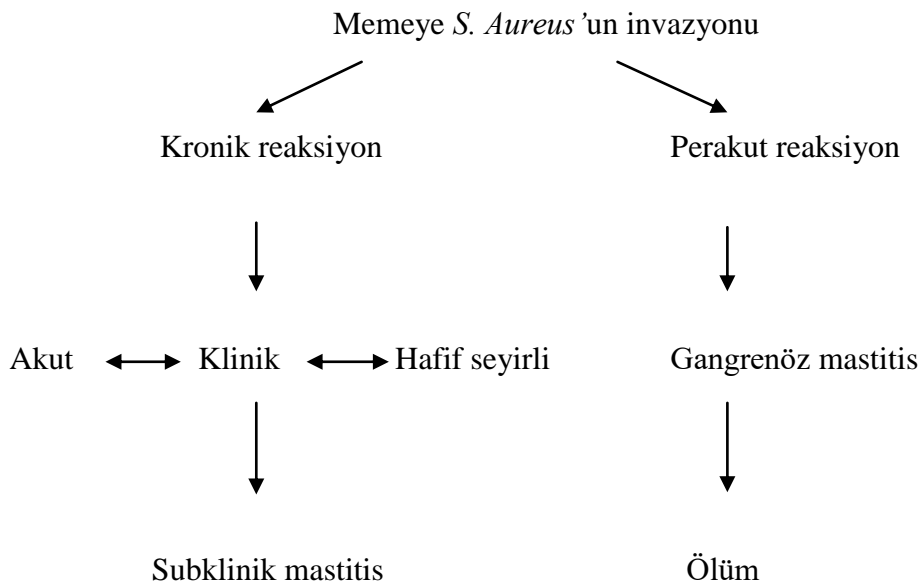
Mikroorganizmalar memeye girdikten sonra meme lobunun alt kısmındaki sekrotorik dokuda çoğalmaya başlarlar. Enfeksiyon daha sonra tüm memeye yayılır. Kronik enfeksiyonlarda bu yayılma yavaştır ve ilk dönemde hücrelerin yıkımına neden olurlar. Parçalanmış bu hücrelerden ortama bazı kimyasal maddeler açığa çıkar. Bu durum polimorf nükleer lökositlerin bu bölgeye infiltrasyonunu artırır. Lökositlerin içerdiği enzimler, bakterilerin parçalanıp sindirilmesine yardımcı olurlar. Daha sonra lökositler degranüle olurlar ve kapillar duvarın permeabilitesini arttıran kimyasal bileşikler salgırlar. Bu da sıvı ve proteinlerin kandan dokulara geçmesine neden olur. Lökositler ayrıca bakteri üremesini durdurup irritasyonu önler ve böylece memenin fonksiyon kaybını gidermeye çalışırlar. Bu işlemler sırasında çok sayıda lökosit sütle atılır (Sandholm ve ark, 1995).

Stafilokok mastitisler en fazla *S. agalactiae*'nin görülmediği sürülerde belirgin olarak ortaya çıkar. *S. aureus* subklinik ve kronik mastitisler oluşturur, ancak perakut mastitis ve gangren ile sonuçlanan olgulara da rastlanılmıştır. Bakteriyel toksinlerin ve toksik ürünlerin gangren oluşmasında rol oynadıkları kabul edilmektedir. Meme dokusunda en fazla yıkıma neden olan toksin, alfa toksindir. Damarları daraltarak yıkımlanmış dokularda işemik nekroza ve gangrene yol açar. *S. aureus*'un başlıca rezervuarı meme ve meme başı derisi ve enfekte bezlerin sütüdür. Enfeksiyon sağım sırasında yayılabilir. Bunun sonucunda ilerleyen dönemlerde ineklerde düşük süt verimi ve memenin körelmesiyle karşılaşmaktadır. Stafilokokların ve özellikle patojen tür olan *S. aureus*'un oluşturduğu ekzotoksinleri, yüzey proteinleri ve slaym faktörü gibi virulens faktörleri, mastitisin gelişiminde önemli rol almaktadır. *S. aureus*, kontagiyöz mastitis etkeni olup, sürü içinde sağım hijyenine dikkat edilmemesi durumunda enfekte meme lobundan bir diğerine sağım

başlıkları ve bakıcıların elleriyle yayılmaktadır (Arda ve ark, 1992; Pyröla, 1995; Sandholm ve ark, 1995; Baştan, 2001).

Stafilokoklardan ileri gelen mastitisler, ineklerde akut formdan kronik şekle kadar değişen bir klinik tablo gösterir. Akut mastitiste, hayvanlarda ateş, anoreksi, depresyon, rumen hareketlerinin durması ve zayıflama gibi genel bulgular görülür. Hastalıklı meme bölgesi şişmiş, ödemli, sıcak ve ağrılıdır. Ağrıdan dolayı tek taraflı bir topallık da belirir. Şayet gangrenleşme olmazsa süt salgısı azalır, seröz, pıhtılı, prulent ve kanlı bir görünüm alır. Gangren oluşursa hastalıklı meme bölgesi, mor-mavi bir renk alır. Kronik mastitiste ise, başlangıçta hayvanın genel durumu ve memede bir bozukluk görülmez, sütün yapısında zamanla değişiklikler meydana gelir. Sütün salgısı azalır, su gibi görünüm alır. Sonunda meme sertleşir, körleşir ve süt salgısı tamamen durur. *S. aureus* mastitislerinin klinik seyri Şekil 2’de gösterilmiştir (Arda ve ark, 1992; Pyröla, 1995; Sandholm ve ark, 1995).

Olgunun kronik olması ve memede fibröz doku şekillenmesi nedeniyle palpasyonda fibrötik bölgeler tespit edilmektedir. Çoğunlukla enfeksiyon subklinik seyrettiğinden zamanla akut olaylarada rastlanmaktadır. Akut olgularda meme şiş ve vücut sıcaklığı oldukça yüksek olup, enfeksiyon bazen gangrenöz karakterde görülmektedir. Klinik olarak memelerde hafif şişlik, sütte belirgin pıhtı ve flakonlar görülmektedir (Alaçam, 1997; Leloğlu, 1997).



Şekil 2: *S. aureus* mastitislerinin klinik seyri (Pyröla, 1995).



### 2.2.2. Stafilokok Mastitislerden Korunma ve Sağaltım

Mastitisi oluşturan birçok sebep vardır. Memenin anatomik yapısı, yaş, ırk, hormonal durum, soğuk, ani iklim ve sıcaklık değişimleri, iklim, travmalar, bakıcının hayvana yaklaşımı, sağım metodları, sağım makinaları, dzensiz sağım, hijyenik olmayan ahırlar, hastalığa karşı duyarlılık, rasyon ve beslenme durumu, doğal koruma mekanizmasının baskılanması ayrı ayrı mastitisi meydana getiren veya hazırlayan sebeplerdir. Bu sebeplerin hepsini ortadan kaldırılması ve dolayısıyla mastitisin yok edilmesinin imkanının olmadığını gstermektedir. Mastitis, patojen mikroorganizmaların varlığı, mastitise duyarlı bir inek ve elverişli evre şartları ile şekillenmektedir. Mastitis, süt üretiminde azalmaya, süt kompozisyonunda ve kalitesinde bozulmaya, ekonomik kayba, halk sağlığında tehlikeye neden olmaktadır. Bu nedenle, etkili bir kontrol programı bu sorunların çözümünde oldukça önemlidir. İşletmelerde yüksek kaliteli süt üretimi için sadece sürüdeki hasta hayvanların elimine edilmesi yeterli olmamaktadır. Sağım ekipmanlarının dzenli bakım ve dezenfeksiyonu, rasyon kalitesinin artırılması, mikrobiyel kontaminasyonun en düşük seviyede tutulması yüksek kaliteli süt üretimi için gereklidir (Oviedo-Boyso ve ark, 2007; Haveri, 2008).

Sağım öncesi meme başındaki kir ve dışkılar uzaklaştırılmalıdır. Ön süt uzaklaştırdıktan sonra meme başını antiseptiğe daldırma yöntemi uygulanır. Tek kullanımlık kağıt peçete ile kurulanır. Sağım başlıkları sonra takılmalıdır. Sağım gereçlerinin temizliği sık sık yapılmalıdır. Sağılan sütlerin ön muayenesi ile klinik mastitislerin erken tanısı yapılarak tedavi edilebilir. Böylece mastitis etkeninin sürüdeki diğer ineklere veya sütlere karışması da engellenir. Sürüdeki hayvanların sağımları dzen içerisinde yapılmalıdır. şüpheli klinik mastitisli hayvanların sağımı sonra yapılır. Sağım sonrasında başlıklar dezenfektanlı sıcak su ile yıkanmalıdır. Ayrıca aşı uygulaması, altlık ve barınma şartlarının dzenlenmesi ile vitamin E ve selenyum vitaminleri yapılır (Baştan, 2013).

Süt sığırcılığı işletmelerinde perakut, akut meme hastalıklarının tedavisinde ilaçlar meme içi ve sistemik olarak beraber tercih edilir; subakut, kronik olanlarda kuru dönemde meme içi kullanılırlar. Sistemik olarak kullanılacak ilaçların farmakolojik özellikleri EKEY’u kk olmalı, uygulandığında hızlı ve iyi emilmeli, zayıf organik bazik olmalı, yağda kolay çözünmeli, plazma proteinlerine düşük oranda bağlanmalı, yarı ömrü en az 12

saat arayla kullanıma elverişli olmalı, hayvan için istenmeyen etkileri küçük olmalı, kesim öncesi bekletme ve sütle atılma süresi kısa olmalıdır (Kaya ve ark, 2007).

Mastitis tedavisinde birçok antibiyotik kullanılmaktadır. Penisilinler; meme dokusunda düşük iritan olmaları ve proteinlere düşük düzeyde bağlanmaları nedeniyle tedavide uygun seçenek oluştururlar. Kloksasilin, ampisilin ve amoksisilin gibi sentetik penisilin türevleri daha yüksek lipid çözünürlüğü göstermeleri ve memedeki iyi dağılımları nedeniyle meme içi uygulamada en çok tercih edilenlerdir. Aminoglikozidler; meme içi uygulanan mastitis tedavi preparatları olarak kombinasyon şeklinde kullanılırlar. Aminoglikozidler içerisinde çoğunlukla neomisin tercih edilmektedir. Neomisinin zayıf lipid çözünürlüğü nedeniyle meme dokusuna penetrasyonu sınırlıdır. Süt ortamı neomisinin aktivitesini azaltır. Tetrasiklinler; bu gruptan oksitetrasiklin ve klortetrasiklin sütte kalsiyum ve magnezyum iyonlarıyla şelat oluşturmaları ve kazeinle kombinasyon şekillendirmeleri nedeniyle önemli ölçüde aktivite kaybına uğrarlar. Oksitetrasiklin kas içi uygulandığında da meme dokusunda terapötik düzeye ulaşmamaktadır. Meme içine tetrasiklinlerin uygulanmasının meme dokusunda irritasyona neden olduğu bildirilmiştir. Makrolidler; parenteral uygulamada yüksek lipid çözünürlükleri nedeniyle meme dokusuna büyük oranda geçtikleri bildirilmiştir. Makrolidler, parenteral ve meme içi antibiyotiklerin kombine edilmesi gerektiğinde en başarılı seçeneği oluştururlar. Sulfonamid+Trimetoprim kombinasyonları; dirençli suşlar açısından risk söz konusu değilse damar içi uygulandığında meme bezlerine iyi derecede dağıldığı bildirilmiştir. Florokinolonlar; koliform bakterilerden kaynaklanan mastitislerin sağaltımında parenteral yolla uygulandığında, sütte koliform EKEY düzeyinin çok üzerine ulaşması nedeniyle en iyi tedavi seçeneği olarak bildirilmiştir. Sefalosporinler; *beta laktamaz* üreten stafilokoklar dahil mastitis patojenlerinin büyük çoğunluğuna etkili olduklarından meme içi mastitis preparatlarında en çok tercih edilen antibiyotikler arasında yer alırlar. Sefalosporinlerin, parenteral uygulamada meme dokusuna geçişleri sınırlı olmasına karşın meme içi uygulamada yüksek yağ çözünürlüğü ve süt pH'sında iyonize olmama oranı nedeniyle meme içi preparatlarda en çok tercih edilen ajan oldukları bildirilmiştir. Polimiksinlerden polimiksin B ve kolistin Gram negatif bakteriler ve *Pseudomonas spp.*'ler için uygun seçenektir. Polimiksinlerin, meme içi uygulamada meme dokusuna difüzyonları çok zayıftır. Bu nedenle polimiksinleri parenteral uygulamanın daha elverişli olduğu bildirilmiştir (Sekkin ve Kum, 2010).

Stafilokok mastitislerini antibiyotiklerle tedavi etmek oldukça zordur. Gelişen fibröz doku nedeniyle antibiyotikler, meme içinde iyi dağılamamakta ve skar dokusundan dolayı ise etken ilacın etkisinden kurtulmaktadır. Ayrıca gelişen bariyer nedeniyle doğal antikolar ve kan enfekte bölgede iyi dolaşım sağlayamazlar. Sonuçta enfekte memeler, uzun süre etkeni yayan kaynak olarak iş görür ve böyle ineklerin kesime gönderilmesi daha uygun bir seçenek olarak önerilmektedir (Alaçam, 1997; Baştan, 2001).

### 2.3. Antibiyotik Direnci

Antibiyotikler insanlarda ve hayvanlarda enfeksiyöz hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bilinçsiz ve yaygın antibiyotik kullanımı sonucu, antibiyotiklerin yan etkileri artmakta ve toplum kaynaklı patojen etkenlerde antibiyotik direnç sorunları ortaya çıkmaktadır. Ayrıca kullanılan antibiyotikler patojenlerin yanı sıra normal flora bakterileri üzerinde de bakterisidal veya bakteriyostatik etki göstermektedirler (Cizman, 2003).

Direnç, bakterinin antimikrobiyel ajanın öldürücü veya üremeyi durdurma etkisine sahip bir yeteneği ya da antibiyotiğin lokal konsantrasyonunun, duyarlı bakteri popülasyonu için en küçük etkin yoğunluk (EKEY) dozundan yüksek bulunması olarak tanımlanmaktadır. Direnç gelişimi ve yayılımı çoğunlukla antibiyotik kullanımına bağlı olmakta, bakterilerin olumsuz çevre koşullarında yaşamını devam ettirmek için kullandığı savunmanın parçasıdır. Antibiyotiklerin yoğun olarak kullanılması çoklu direnç mikroorganizmalarını oluşturmuştur. Enfeksiyonların tedavisinde sorunlar yaşanmıştır (Greenwood 2008, Adaleti ve ark, 2010).

Stafilokok türleri antibiyotiklere karşı duyarlı olmalarına rağmen antibiyotik dirençliliği artmaktadır. Stafilokoklarla gelişen enfeksiyonların sağaltımında kullanılan ilaçlar değişmektedir. Stafilokoklar, nazokomiyal patojen olarak yüksek oranda morbidite ve mortalite gösteriyor, hastanın tipi (yaşlı, bağışıklık yetmezliği, bağışıklığı baskılanmış olanlar) enfeksiyon riskini arttırmaktadır (Derbentli, 2005).

İlk kez 1945 yılında *penisilinaz* oluşturarak penisiline karşı direnç kazanmış olan *S. aureus* suşları vardır. Bu suşlar 1950'li yıllarda etkili olmuşlardır. *Penisilinaza* dirençli penisilinlerin 1960'lı yıllarda kullanıma girmişlerdir. İki yıl sonra metisiline dirençli *S. aureus* izolatu olarak ilk kez saptanmıştır. 1995 yılında Fransa'da (VISA, vankomisine orta düzeyde dirençli *S. aureus*), 1996'da Japonya'da hetero-VISA ve 2002 yılında A.B.D.'nde

(VRSA, vankomisin dirençli *S. aureus*) suşlarının tespit edilmesi ile stafilokoklarda çoklu antimikrobiyal direnç problemi ortaya çıkmıştır (Baddour ve ark, 2007).

Antibiyotiklere direnç gelişmesinde, hücre içine giren antibiyotik miktarının azalması, antibiyotiğin detoksifiye edilmesi ve antibiyotiğin hedefinde değişiklik olmak üzere üç genel biyokimyasal mekanizma sorumludur. Mikroorganizmalar bir veya birkaçını kullanarak etki mekanizmaları farklı olan antibiyotiklere direnç kazanmıştır (Durupınar, 2001).

Antibiyotikle hücre içine penetre olarak etki gösterirler. Hücre içindeki antibiyotik miktarının azalmasına sebep aktif pompalar ile antibiyotiğin hücre dışına atılmasıdır. Tetrasikline dirençli olan mikroorganizmalarda direnç gelişimi bu yolla olmaktadır. Dirençli mikroorganizmalar tetrasiklinin terapötik dozunun 100 katına kadar dayanıklı olabilmektedir. Aktif pompalama sistemi, makrolidler gibi birbirleriyle ilişkili olmayan antibiyotiklere direnç gelişmesinde rol oynamaktadır.  $\beta$ -laktamlar, kinolonlar, kloramfenikol ve tetrasiklinlere direnç göstermiştir. Antibiyotikler, bakterinin üremesini spesifik bir bileşeni ile etkileşerek inhibe edebilirler. Genetik mekanizma ile oluşan direnç ise doğal direnç (intrinsik direnç) ve kazanılmış direnç olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. Kalıtsal özellikte olmayana doğal direnç tipi olarak tanımlanır. Antibiyotiğin bağlı halde etkili olduğu hedef molekülünün olmaması ve ilacın hedefe ulaşmasını önleyen doğal engeller vardır. Birçok Gram negatif bakteri vankomisin ve metisiline, enterokoklar sefalosporinlere duvar yapıları nedeniyle intrinsik direnç gösterirler. (Öztürk, 1997).

Kazanılmış dirençte düşük yoğunluklarda ilaca duyarlılık gösteren bakterilerin sonra ilacın katı yoğunluklarına duyarsızlaşmasıdır. Kromozomal mutasyonla oluşan kazanılmış direnç bir veya birden fazla aşamada oluşabilir. Tek aşamada oluşan mutasyonda antibakteriyel ilaç etkileşim sonucu direnç gelişir. Bu duruma streptomisin tipi direnci denir. Streptomisin tedavisine başladıktan 3-4 gün sonra, *Haemophilus influenzae* ve üriner kanal içinde yangıya neden olan bakterilerin streptomisine karşı ileri derecede dirençli olduğu saptanmıştır. Rifampine karşı *Escherichia coli* ve *S. aureus* bu direnç oluşumu sağlar. Çok aşamalı mutasyonda direnç yavaş ve derecesi artan biçimde oluşur. Buna penisilin tipi direnç denir. Bu tipteki direncin gelişmesi için DNA molekülünde farklı yerlerde bulunan genlerde ardışık bir dizi mutasyon olayı meydana gelmektedir. Penisilinlere ve tetrasiklinlere karşı bu tip direnç oluşabilir (Kayaalp, 2005).

Aktarılabilir direnç, bakterilerin kromozomlarında oluşmuş mutasyon sonucu veya bakterilerin ortamdan ya da diğer bakterilerden transdüksiyon, transformasyon ve konjugasyon olaylarından biriyle direnç yapan gen paketini alması (yani R plazmidleri veya transpozonlar aracılığı ile olan direnç) sonucu meydana gelir. Genetik direnç kromozom, plazmid veya transpozon kontrolü altındadır. Kromozomal direnç, spontan mutasyon oluşması sonucu kromozomda ortaya çıkmaktadır. Plazmidler, ekstrakromozomal genetik elemanlardır. Çift zincirli sirküler yapıda DNA molekülüne sahiptirler. Molekül ağırlığı 1-200 milyon dalton arasında değişir. Ağır metallere dirençlidirler. Direnç genleri taşıyan plazmidlere rezistans plazmidleri (R-plazmidleri) denir. Çok sayıda antibiyotiğe karşı direnç genlerini taşır. Direnç plazmidleri diğer duyarlı bakterilere karşı transdüksiyon, transformasyon ve konjugasyon olayları ile geçiş sağlayarak direnç genini aktarır. Direncin yayılmasına neden olur. Transpozonlar, DNA molekülünden kromozomdan plazmide ve plazmiden kromozoma geçebilen DNA dizileridir. Bağımsız olarak replike olamazlar. Ampisilin, kloramfenikol, kanamisin, tetrasiklinler ve trimetoprime karşı direnç gelişimini sağlayan yapılardır. İlaç dirençli (multiple-drug resistance) izolatların ortaya çıkışı ve yayılımında transpozonların rolü bulunur (Kayaalp, 2005; Özaslan, 2009).

### **2.3.1. *S. aureus* ve Antibiyotik Direnci**

*S. aureus*'un antibiyotiklere etkili direnç mekanizması geliştirebilme yeteneğine sahiptir. 1930'da sülfanamidlere karşı direnç gelişmiş, 1940'da kullanıma başlanan benzil penisilinler den *penisilinaz* üreten suşlar etkinliklerini kaybetmişlerdir. 1961'de metisilin direncine 1970'lerde birçok antibiyotiğe dirençlilik gelişmiştir. *S. aureus*lr sirküler kromozom, plazmidler ve transpozonlar içermektedir. Virulans ve antibiyotik direnç genleri kromozomlar üzerinde bulunmaktadır. Bu genler Gram pozitif ve negatif bakteriler arasında ekstrakromozomal elementlerle transfer olmaktadır. Mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı direncinden dört mekanizma sorumludur. Bunlar enzimatik inhibisyon, hücre membranının ilaca permeabilitesinin azalması, efluks pompaları ve antibiyotiklerin hücre içindeki hedefine bağlanmasının azalmasıdır (Reygeart, 2013). Tablo 1'de *S. aureus*'un antibiyotik direncinde rol oynayan genler ve etki mekanizmaları belirtilmiştir (Lowy, 2003; Sakarya, 2011).

**Tablo 1:** *S. aureus*'un antibiyotik direncinde rol oynayan genler ve etki mekanizmaları (Lowy, 2003; Sakarya, 2011).

Antibiyotik	Direnç Geni	Genin Lokasyonu	Genin Ürünü	Direnç Mekanizması
β laktamlar	blaZ	Plazmid	<i>β laktamaz</i>	β laktam halkası inhibisyonu
	mecA	Kromozomal kaset	PBP2a	PBP'lerin affinitesinin azalması
Glikopeptinler (Vankomisin)	Gen bilinmiyor	Kromozomal	Değişen peptidoglikan	Hücre membranının kalınlaşması
	vanA	Plazmid-Transpozon	D-alanin-D-laktat	Dipeptit sentezi ile vankomisine duyarlılığın azalması
Kinolonlar	ParC	Kromozomal	<i>Topoizomerez 4</i> 'ün komponenti ParC (GrlA)	Kinolon direncini belirleyen bölge (QRDR)'de mutasyon ve efluks pompalarının aktivasyonu
	gyrA, gyrB		<i>Giraz</i> 'ın komponenti GyrA ve GyrB	
Aminoglikozidler	Aac, aap, ant	Plazmid-Transpozon	<i>Asetiltransferaz, Fosfotransferaz</i>	<i>Asetiltransferaz, Fosfotransferaz</i> ile antibiyotik modifikasyonu
Trimetoprim, Sulfamethoksazol	dfrB	Plazmid	<i>Dihidrofolat redüktaz</i>	İlacın hedefindeki enzimin modifikasyonu
	sulA (dhps)	Kromozomal	<i>Dihidropteroat sentaz</i>	
Oksazolidinonlar	Rrn	Kromozomal	23S RNA	rRNA mutasyonu
	Cfr	Plazmid	<i>RNA metiltransferaz</i>	rRNA metilasyonu
Makrolid, Linkozamidler ve Streptograminler	ermA, ermB, ermC	Plazmid	<i>Metiltransferaz</i>	RNA metilasyonu
Tetrasiklinler	tetK	Plazmid	Ribozom Koruyucu Protein	Efluks pompalarının aktivasyonu
	tetM			İlacın hedef bölgesine yarışmacı bağlanma

### 2.3.1.1. β-Laktam direnci

β-laktam antibiyotikler hücre duvarı peptidoglikan oluşumu sırasında reaksiyonları katalize eden enzimlere bağlanıp, hücre duvarı sentezini inhibe ederek antibakteriyel etkilerini göstermektedirler (Vanderhaeghen ve ark, 2010). *S. aureus*'ta β-laktam antibiyotiklere karşı direnç genellikle penisilin bağlayan protein (PBP)'lerde oluşan değişiklikler ve *β-laktamaz* enzimleri ile antibiyotiğin inaktive edilmesi şeklinde gerçekleşmektedir (Zetola ve ark, 2005).

*S. aureus*'ta peptidoglikan tabaka üç bölümden oluşmaktadır. Bunlardan ilki birbirine  $\beta$  (1,4) bağlarıyla bağlı, tekrarlayan NAGA ve NAMA alt birimlerinden oluşan polisakkarit yapıda bir iskelet. İkincisi NAMA'e bağlı D ve L aminoasitlerden oluşmuş tetrapeptid zincir. Üçüncüsü bir tetrapeptidin dördüncü aminoasitinin (alanin)  $\alpha$ -terminal karboksil grubu ile komşu NAMA'daki tetrapeptidin üçüncü aminoasitinin amino grubu arasındaki çapraz bağlarıdır (Stapleton ve Taylor, 2002; Lowy, 2003).

NAGA ve NAMA,  $\beta$  (1,4) bağları ile bağlanarak peptidoglikan iskeletini oluşturmaktadır. Muramik asite bağlı tetrapeptid zincirlerindeki alanin aminoasitinin karboksi terminali ile lizin aminoasitinin amino grubu pentaglisin peptid zincirleri ile çapraz bağlanmaktadır. Pentaglisin çapraz köprüleri, *fem* (metisiline direnç için gerekli olan faktör, methicillin) genlerinin kodladığı *femX*, *femA*, *femB* proteinleri ile sitoplazmada oluşturulmaktadır. Bu *fem* proteinleri ana peptiddeki L-lizin rezidülerine, glisin rezidülerini bağlamaktadırlar. Peptidoglikan tabakanın yapısında bulunan çapraz bağların oluşumu (transpeptidasyon) reaksiyonlarını sitoplazmik membranın dış yüzeyinde yer alan PBP katalize etmektedirler (Stapleton ve Taylor, 2002; Lowy, 2003).

*S. aureus*'ta dört penisilin bağlayan protein (PBP1-PBP2-PBP3-PBP4) bulunmaktadır. Bu PBP'ler yüksek molekül ağırlıklı iki protein domainine sahiptirler. Bu protein domainlerinden bir tanesi transpeptidasyonu (çapraz bağlamada), diğeri ise transglikolizasyonu (glikan zincirini büyüten) katalize etmektedirler. Ana peptide bağlı terminal D-alanin-D-alanin'e benzeyen beta-laktam antibiyotikler, PBP'lerin transpeptidasyon domainlerini inhibe ederek çapraz bağlanma reaksiyonunu durdurmaktadırlar. Peptidoglikanın çapraz bağlanması olmayınca hücre duvarı mekanik olarak zayıflamakta, stoplazmik içeriklerin bazıları dışarı salınmakta ve hücre ölmektedir (Lowy, 2003; Hardy ve ark, 2004).

### 2.3.1.2. Penisilin direnci

Penisilinlerin stafilokokal enfeksiyonlara terapötik amaçlı kullanılmaya başlamasından kısa bir süre sonra, *S. aureus*'un bu antibiyotiklere karşı direnç kazandığı bildirilmiştir. Penisiline karşı olan dirençlilik ilk kez 1941 yılında bulunmuş, ilk olarak klinikten elde edilen hastaane kaynaklı suşlarda ortaya çıkmakla birlikte, daha sonra popülasyon geneline yayılmıştır. Penisiline karşı şekillenen direnç, 1960 yılının sonlarına doğru hem hastane hem de toplum kaynaklı suşların % 80'ine ulaşmıştır (Lowy, 2003). Penisilin direnci plazmidlere bağlı bir direnç olup, bu plazmidlerin aktarılması sonucunda

1980'li yıllarda klinik hastalarından izole edilen *S. aureus* suşlarının % 90'ından fazlasının *penisilinaz* üretebilen suşlar olduğu bildirilmiştir (Pesavento ve ark, 2007).

*Penisilinaz*'lar, penisilin ile beraber bazı  $\beta$ -laktam antibiyotikleri de parçaladıkları için  *$\beta$ -laktamaz* olarak da adlandırılmaktadırlar. Stafilokoklarda tanımlanan  *$\beta$ -laktamaz*, *blaZ* geni tarafından kodlanmaktadır. *blaZ* geni ardışık iki adet düzenleyici genin antiinhibitör *blaR1* ve inhibitör *blaI* kontrolü altında bulunmaktadır. Bunun dışında, *blaR2*'nin enzimin sentezinde görev aldığı düşünülmektedir. İnhibisyondan sorumlu *blaI* geni  $\beta$ -laktam antibiyotik yokluğunda *blaZ* ve *blaR* gen bölgelerinin çalışmasını baskı altına alarak düşük seviyede  *$\beta$ -laktamaz* üretimine sebep olmaktadır. Bulunduğu yerlerde  $\beta$ -laktam antibiyotik varlığında ise *blaR1*, *blaR2* genleri tarafından *blaZ* geni uyarılarak yüksek seviyede  *$\beta$ -laktamaz* üretimi sağlanmaktadır (Lowy, 2003; Zetola ve ark, 2005). Ortamdaki  *$\beta$ -laktamaz* enzimi antibiyotiğin  $\beta$ -laktam halkasını hidrolize ederek ilacın inaktivasyonunu sağlamak ve sonuç olarak hücredeki PBP'lere bağlanmasını engellemiş olmaktadır (Reygaert, 2013).

### 2.3.1.3. Metisilin direnci

Stafilokokal  *$\beta$ -laktamaz* enziminin hidrolizine dirençli penisilin grubu antibiyotikler içerisinde ilk olarak metisilin elde edilerek, 1959 yılında klinik kullanıma girmiştir. MRSA ilk olarak 1961 yılında İngiltere'de klinik suşlarında saptanmış ve 1970'lerin ortasında birçok ülkede endemik hale gelmiştir. Sıklıkla hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olan bazı MRSA suşları ise epidemik özellik göstermektedir. MRSA'lar yaygın olarak kullanılan aminoglikozidler, makrolidler, florokinolonlar, kloramfenikol ve tetrasiklin gibi antibiyotiklere karşı da çoğunlukla dirençli bulunmaktadır (Lee, 2003; Lowy, 2003; Normanno, 2007).

Metisilin direnci kromozomal olarak lokalize olan *mecA* geni varlığında oluşmaktadır. *mecA* geni, PBP2a olarak isimlendirilen ve metisilin ile diğer  $\beta$ -laktam antibiyotiklere affinitesi düşük olan farklı bir PBP kodlamaktadır (Zetola ve ark, 2005).

PBP2a, hücre membranına bağlı ve peptidoglikan zincirlerinin çapraz bağlanması için gerekli olan transpeptidasyon reaksiyonunu katalizlemektedir. Böylece stafilokokal PBP'ler  $\beta$ -laktam antibiyotikler ile inhibe olsa da, PBP2a'nın *transpeptidaz* aktivitesi sayesinde hücre duvarı sentezi devam etmektedir. Transpeptidasyon reaksiyonunun devam



etmesinin oluşan direncin bir göstergesi olduğu belirtilmiştir (Vanderhaeghen ve ark, 2010). PBP2a, diğer stafilokokal PBP'lerden farklı olarak tüm  $\beta$ -laktam antibiyotiklere düşük affinite göstermekle birlikte, MRSA'nın hemen hemen tüm  $\beta$ -laktam antibiyotiklere karşı direncinden sorumludur (Normanno ve ark, 2007).

MRSA'da, metisilin duyarlı *S. aureus*'ta (MSSS, methicilin sensitive *S. aureus*) bulunmayan ve stafilokokal kaset kromozom mec (SCCmec, staphylococcal cassette chromosome mec) olarak isimlendirilen bir direnç adası bulunmaktadır. MSSS'nin SCCmec adasına horizontal gen transferiyle MRSA'ya dönüştüğü belirtilmektedir (Zetola ve ark, 2005).

SCCmec, 21-67 kb büyüklüğünde, mobil genetik eleman olup, rekombinaz genleri (*ccrA*, *ccrB*, *ccrC*) ile *mecA* geni ve bunu regüle eden *mecI* ve *mecRI* genlerinden oluşan *mecA* gen kompleksinden oluşmaktadır (Sundsford ve ark, 2004). *mecI* ve *mecRI* genlerinin  $\beta$ -laktamaz enzimini kodlayan *blaZ* geninin regülatörleri olan *blaR1* ve *blaI* genleri ile homolog yapıda oldukları saptanmıştır. *mecI* geni, *mecA* transkripsiyonunu baskılayan MecI proteinini, *mecR1* ise membrana bağlı sinyal transdüksiyon proteini olan MecR1'i kodlamaktadır (Lee, 2006). Bu genlerin kontrolünde *mecA* geninin  $\beta$ -laktam antibiyotiklere yanıt vermesinin, bakterinin penisiline maruz kaldığında *blaR1* ve *blaI* genlerinin *blaZ* genini regüle etmesiyle benzer şekilde ortaya çıktığı belirlenmiştir (Lowy, 2003).

Metisilin direncinin fenotipik olarak ekspresyonu değişkenlik göstermektedir. *mecA* veya *mecI* genlerindeki mutasyon ya da delesyonların asıl mec ekspresyonuna neden olduğu bilinmektedir. Ancak bazı *S. aureus* suşlarının *mecA* geni taşımalarına rağmen metisilin direncini eksprese edemedikleri ve fenotipik olarak metisiline duyarlı oldukları bulunmuştur. Bu suşlarda *mecI*'nin *mecA* transkripsiyonunu baskıladığı ve çoğu  $\beta$ -laktam antibiyotiğin *mecR1*'i aktive edememesine bağlı olarak, metisiline duyarlılık şekillendiği tespit edilmiştir. *mecA* geni taşımalarına rağmen metisiline duyarlı olan bu suşlar pre-MRSA olarak tanımlanmaktadır (Lowy, 2003; Lee, 2006).

Metisilin direncinin düzenlenmesinde, *mecA* gen kompleksi dışına *fem* genlerinin de rol oynadığı bildirilmiştir. Bu genler peptidoglikan zincirlerinin çapraz bağlanmasında görev alarak metisilin direncini ekspresyonuna katkı sağlamakla birlikte, MSSA'larda da *fem* geni bulunabilmektedir (Lowy 2003).

*S. aureus* suşları, *mecA* genine sahip olmamasına karşılık oksasilin, sefoksitin gibi metisilin duyarlılıklarını belirleyen testlerde pozitif sonuç verebilirler. Bu durumun nedenleri arasında ise *mecA* homologu olan, yeni tespit edilen *mecC* geni ile diğer  $\beta$ -laktam direncini sağlayan faktörler bulunmaktadır (Garcia Alvarez ve ark, 2011; Petersen ve ark, 2013).

#### 2.3.1.4. Glikopeptid direnci

Glikopeptidlerin ilk temsilcisi olan vankomisin 1956 yılında kullanıma girmiş ve uzun yıllar dirençli suşların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılmıştır. Metisiline dirençli stafilokokların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde vankomisin yaygın ve artan şekilde kullanılması sonucu stafilokoklar vankomisine direnç kazanmışlardır. İlk olarak Japonya'da 1997 yılında klinikten izole edilen *S. aureus* suşunun vankomisine karşı orta düzeyli bir dirençliliğinin (VISA; vancomycin intermediate-resistant *S.aureus*) olduğu saptanmış ve daha sonra diğer ülkelerde de etkenin sahip olduğu bu direncin varlığı rapor edilmiştir (Lowy, 2003; Janapatla ve ark, 2007).

Glikopeptidler gram pozitif bakterilerin hücre duvarı sentezindeki transpeptidasyon basamağını peptidoglikan öncülerinden peptidil D-alanin-D-alanin yapısının uç kısmına bağlanır. Transglikozilaz ve transpeptidaz enzimlerinin bağlantı noktalarını bozarak inhibe olmasını sağlar (Shorr, 2007).

*S. aureus*'ta şekillenen glikopeptid direncinin oluşmasında iki önemli mekanizmanın rol oynadığı belirtilmektedir. Bunlar peptidoglikan biyosentezindeki değişiklik ve plazmid kökenli *vanA*'nın konjugal transferidir. Birinci mekanizmada oluşan direnç kromozomal olup, peptidoglikan tabakanın suşlarda vankomisine karşı azalan bir duyarlılık mevcuttur ve VISA suşlarında gözlenmektedir. VISA'nın nedeni peptidoglikan biyosentezindeki değişikliktir. Bu suşlardaki hücre duvarı daha kalın ve düzensiz şekildedir. Bu suşlarda hücre duvarındaki peptidoglikan zincirleri arasındaki çapraz bağ sayısı daha az olduğundan serbest D-alanin-D-alanin rezidülerinin sayısı daha fazladır. Çapraz bağ sayısının azalmasının sebebi pentapeptid köprüdeki D-glutamatın amidasyonu için ihtiyaç olan L-glutamin miktarındaki azalmadır. Sonuç olarak vankomisini yakalayıp ona bağlanabilecek daha fazla D-alanin-D-alanin rezidüsü olduğundan vankomisine orta düzeyde direnç oluşmaktadır. Rezidülere bağlanan vankomisin, diğer vankomisin moleküllerinin sitoplazmik membrandaki hedeflerine ulaşmalarını engelleyerek direnç oluşturmaktadır

(Appelbaum, 2007; Sancak B, 2011). İkinci mekanizmada oluşan direnç ise vankomisin dirençli enterokoklardan Tn1546 transpozonu ile vanA geninin konjugasyonu sonucu aktarılmasıyla oluşmaktadır. Bu konjugasyon sonucunda VRSA suşları oluşmaktadır. Ayrıca hem MRSA hem de (VRE, vankomisin dirençli enterococcus) ile enfekte bireylerde bakteriler arasında olası plazmid aktarımına bağlı olarak VRSA'nın hızlı bir biçimde yayılabileceği belirtilmektedir (Lowy, 2003; McCallum ve ark, 2010). vanA D-alanin-D-lanin *ligaz* enziminin üretilmesini ve bu enzim aracılığıyla D-alanin-D-laktat sentezlenmesine neden olmaktadır. Glikopeptid antibiyotikler D-alanin-D-laktat dipeptidine bağlanmadıkları için bu durum direnç gelişimini sağlamaktadır (Sancak B, 2011).

### 2.3.1.5. Kinolon direnci

Kinolonlar 1980'li yıllarda Gram negatif bakterilerden kaynaklanan enfeksiyonlara karşı tedavi amaçlı geliştirilmişlerdir. Ancak Gram pozitif bakterilere karşı olan spektrumundan dolayı stafilokok enfeksiyonlarında da tedavi amaçlı kullanım alanı bulmuştur. Buna bağlı olarak *S. aureus* suşlarında kinolonlara karşı şekillenen direnç hızlı bir şekilde ortaya çıkmış ve yayılmıştır (Lowy, 2003).

Kinolonlar DNA replikasyonunda rol oynayan *DNA giraz* (topoizomeraz II) ve *topoizomeraz IV* enzimlerini inhibe ederek antibakteriyel etkilerini göstermektedirler. *DNA giraz* DNA replikasyonu, rekombinasyonu ve onarımında rol oynamaktadır. *Topoizomeraz IV* ise replikasyon sırasında oluşan yavru DNA iplikçiklerinin birbirinden ayrılarak yavru hücrelere geçmelerine yardım etmektedir. *DNA giraz* enzimi *gyrA* geni tarafından kodlanan iki A alt birimi ile *gyrB* geni tarafından kodlanan iki B alt biriminden oluşmaktadır. *Topoizomeraz IV* ise *parC* geni tarafından kodlanan iki *parC* alt biriminden ve *parE* geni tarafından kodlanan iki *parE* alt biriminden oluşmaktadır. Kinolon grubu antibiyotiklerin hedefi topoizomerazlardan oluşan bu iki enzimdir. *Topoizomeraz*-DNA kompleksine bağlanan kinolonlar DNA sentezini hızla inhibe ederek hücre ölümünde rol oynamaktadır. Kinolon direncinden sorumlu mekanizmalar kinolonların hedefi olan *DNA giraz* ve *topoizomeraz IV*'teki kromozomal mutasyonlar ve efluks pompasının indüksiyonudur. Kromozomal mutasyonlarda ve kinolon dirençli mutantların oluşmasında yüksek bakteri yoğunluğu, dirençli subpopulasyon varlığı ve enfeksiyon bölgesindeki kinolon konsantrasyonunun oldukça etkili olduğu belirtilmektedir. Enzim-DNA kompleksinin (QRDR, kinolon direncini belirleyen bölge) sorumlu bölgelerindeki aminoasit değişiklikleri

kinolonların bu hedefe affinitesini düşürmektedir (Lowy, 2003). *Topoizomereaz IV*'teki parC (GrlA) alt ünitesi ile DNA girazdaki GyrA alt ünitesi direnç mutasyonunun en sık görüldüğü bölgelerdir. *S. aureus*'ta birincil hedef *topoizomereaz IV* olduğu için, bu enzimde meydana gelen mutasyonların daha önemli olduğu ve bunun sonucunda kinolon grubu antibiyotiklerin hepsine çapraz direnç geliştirebileceği bildirilmektedir (Hooper, 2002). Direnç gelişimindeki efluks pompası indüksiyonu mekanizmasında, efluks pompaları alışveriş tipi bir tepkimeyle ortamdaki protonları hücre içine alarak antibiyotikler dahil, çok sayıda yabancı, sitotoksik ve metabolizma ürününü hücreden uzaklaştırmaktadır. NorA plazmid aracılığıyla taşınmakta olan bir gen olup, kinolon efluks proteini olan NorA'yı kodlamaktadır. NorA'nın promotor bölgesindeki mutasyonlar, bu genin transkripsiyonunu artırıp kinolonlara karşı direnç oluşturmaktadır (Bisagnano ve ark, 2000).

#### **2.3.1.6. Aminoglikozid direnci**

Aminoglikozidler hücre duvarındaki porin kanallarından girerek 23s rRNA'nın 30s alt birimine geri dönüşümsüz bağlanıp translasyonu bozarak mRNA'nın taşıdığı genetik kodun yanlış okunmasına neden olmaktadır. Bu antibiyotiklere karşı direnç ribozomal, enzimatik ve permeabiliteye bağlı olmak üzere üç şekilde şekillenmektedir. *S. aureus*'ta ribozomal ve permeabiliteye bağlı direnç nadiren oluşmakla birlikte, en sık enzimatik direnç gözlenmektedir (Sudsfjord ve ark, 2004).

Aminoglikozidleri modifiye eden enzimler plazmid veya transpozon kökenlidirler. Bu enzimler N-asetilasyon, O-nükleotidilasyon ve O-fosforilasyon olmak üzere üç önemli reaksiyondan sorumlu tutulmaktadır. Bu genel reaksiyonların her biri için enzim grupları bulunmaktadır. Bunlar Aac geni tarafından kodlanan asetil transferazlar (AAC), Ant geni tarafından adeniltransferazlar (ANT) ve Aap geni tarafından kodlanan fosforiltransferazlar (APH)'dir. Bu enzimlerden ANT ve APH hidroksil gruplarını, AAC ise amino gruplarını etkilemekte ve antibiyotik moleküllerine adenil, asetil ve fosforil gruplarını ekleyerek ilacın etkinliğini yitirmesine neden olmaktadır. Antibiyotiğin yapısının değiştirilmesi, protein sentezinin önlenmesini ve ilacın hücre içine alınmasını engellemektedir (McCallum ve ark, 2010).

### 2.3.1.7. Trimetoprim-sülfametoksazol direnci

Sülfametoksazol diğer paraaminobenzensülfanamid türevleri gibi paraaminobenzoik asitten (PABA) dihidropteroik asit oluşturan *dihidropteroat sentetaz* enzimini inhibe ederek folik asit sentezini engellemektedir. Trimetoprim ise dihidrofolik asidi tetrahidrofolik aside çeviren *dihidrofolat redüktaz* (DHFR) enzimini inhibe ederek etki göstermektedir. Her iki antibiyotik de tek başlarına folik asit sentezini inhibe etseler de, beraber kullanıldıklarında sinerjistik etkilidirler (Winston ve Chambers, 2009).

Sülfanamide karşı oluşan direnç sulA geni kontrolünde kromozomal mutasyonlar sonucu PABA'nın aşırı sentezi ile folat metabolizmasında sülfanamidlerin oluşturduğu inhibisyonun engellenmesidir. Trimetoprime karşı oluşan direnç ise trimetoprime düşük affiniteli ya da tamamen dirençli DHFR enziminin üretilmesi kaynaklıdır. Stafilokoklarda görülen bu direnç tipi plazmidlerle taşınan *drfB* genleri tarafından kodlanmaktadır (Peacock, 2005).

### 2.3.1.8. Oksazolidinon direnci

Linezolid yeni bir bakteriyel sınıf olan oksazolidinonlar içinde yer almakta ve bakteriyostatik etki göstermektedir. Linezolidler bakteriyostatik etkilerini 50S ribozomal alt üniteye *peptidil transferaza* bağlanıp N-formilmethionil-tRNA'nın 70S ribozoma bağlanmasını önleyip, 30S başlatıcı kompleks oluşmasının engelleyerek ve bunun sonucunda da bakterinin protein sentezini inhibe ederek göstermektedirler (Doğruman ve ark, 2008).

Linezolidlere karşı bilinen iki direnç mekanizması bulunmaktadır. Bunlardan birincisi kromozomal kökenli, RNA-polimeraz  $\beta$ -alt ünitesini kodlayan *rrn* geni ile ilişkili olup, nokta mutasyonlar sonucunda ilacın ribozoma bağlanmasını engelleyerek etki göstermektedir. İkinci direnç mekanizmasından plazmid kökenli, RNA *metiltransferazi* kodlayan *cfr* geni sorumludur. Bu gen rRNA'nın metilasyonunu sağlayıp, ilacın bağlanmasını engelleyerek etki göstermektedir (Arias ve ark, 2008).

### 2.3.1.9. Makrolid-linkozamid-streptogramin direnci

Makrolid-Linkozamid-Streptogramin (MLS) türü antibiyotikler kimyasal olarak farklı olsalar da, bakterilerdeki RNA bağımlı protein sentezini, 70S ribozomunun 50S alt

ünitesine bağlanarak aynı yere tRNA bağlanmasını ve peptid zincirinin uzamasını önleyerek engellediklerinden aynı grup içerisinde değerlendirilmektedirler (Mayer ve ark, 1995)

MLS tipi antibiyotiklere dirençli *S. aureus* suşlarında görülen direnç tipi, 23S rRNA'yı metile eden *metiltransferaz* enzimi salgılanarak bu antibiyotiklerin ribozoma bağlanmasının engellenmesi şeklindedir. Bu enzimi kodlayan genler plazmid kökenli olup genel olarak erm (eritromisin ribozam metilasyon) olarak adlandırılmaktadırlar. *Metiltransferaz* enzimi tarafından 50S ribozomal alt ünitenin 23S parçasığında bulunan adeninlerin dimetillenmesi işlemi sonucu, antibiyotikler ribozom üzerinde hedef bölgeye bağlanamamakta ve böylece direnç gelişmiş olmaktadır (Reygaert, 2013).

#### **2.3.1.10. Tetrasiklin direnci**

Tetrasiklinler, 1950 yılında keşfedilmiş bakteriyostatik etkili, toprak kökenli olan birçok *Streptomyces* türünden elde edilen, bakteri protein sentezini inhibe eden antibiyotik grubudur. Tetrasiklinler, protein sentezini ribozomun 30S alt ünitesine bağlanarak engellemektedirler. Tetrasiklin direncinin genel olarak artması ve yayılması aktarılabılır plazmidler, transpozonlar ve integronlar ile desteklenmektedir. *S. aureus*'ta, taşınabilir tet geninin kodladığı iki farklı türde tetrasiklin direnç proteinleri ile iki farklı tipte direnç mekanizmaları oluşturmaktadır. Bunlardan birincisi, aktif efflux pompası mekanizmasıdır. Bu direnç tet geninin kodladığı yaklaşık 46kDa ağırlığında olan ve sırasıyla 459 ve 458 aminoasitten meydana gelen tetK ve tetL proteinleri ile oluşmaktadır. Bu proteinlerin varlığında tetrasiklinler efflux pompası yoluyla enerji kullanılarak hücre dışına atılmaktadırlar. Yakın zamanda tanımlanan kromozomal olarak kodlanan tet38 efflux pompası, *S. aureus*'da tetrasiklin direncine katılmaktadır. Tet38, MgrA geni tarafından düzenlenmektedir (Sköld, 2011;Wendlandt ve ark, 2013).

Bu araştırma kapsamında, çiğ sütlerde *S. aureus* varlığı ve antibiyotiklere olan duyarlılığının araştırılması amaçlanmıştır. Böylece sağlıklı beslenme açısından çiğ sütlerin *S. aureus* bakımından güvenli bir gıda maddesi olup olmadığı belirlenecek ve izole edilen suşların antibiyotiklere olan duyarlılığı da ortaya konularak tüketici sağlığının korunmasında katkı sağlayacaktır.

## 3. GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1. Gereç

#### 3.1.1. Araç ve Gereçler

Çalışma kapsamında Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalında bulunan spektrofotometre (Shimadzu UV-1601), buzdolabı/derin dondurucu (Samsung RL62ZBSW), distile su cihazı (Nüve NS 112), ısıtılmalı manyetik karıştırıcı (IKA RH Basic 2 ve Nüve MK 418), vorteks (Nüve NM110 ve IKA MS3 Basic), terazi (Shimadzu EB-2200 HU), hassas terazi (Shimadzu AX 120), su banyosu (Memmert WNB 10) ve etüv (Nüve FN 500) kullanıldı.

Çalışmada araç ve gereç olarak mikropipetler (Eppendorf 10ml-100ml, 20-200 ml, 100-1000 ml), balon joje (Isolab 10, 25, 50 ve 100 ml), farklı boyutlarda deney tüp (Isolab 5,10,15 ml), beher glas (Isolab 10, 25, 50 ve 100 ml) ve pudrasız cerrahi eldiveninden (Beybi) yararlanıldı. Ayrıca mikropiplakalardaki bakteri yoğunluğu analizi için ADÜ Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'nda bulunan ELISA okuyucu (Thermo Scientific Multi-Scan Go Spectrophotometer), otoklav (Nüve, OT 4060) ve suşların muhafaza işlemi için de ADÜ Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda bulunan -80 °C'den (NU 9668E, Nuair) yararlanıldı.

#### 3.1.2. Süt Örneklerinin Toplanması

Araştırmanın materyalini, Ocak 2015 - Mart 2015 tarihleri arasında Muğla İli'nin Milas İlçesine bağlı Ağaçlıhöyük, Baharlı ve Kuru köylerindeki 100 farklı güğümden alınan 100 adet çiğ inek sütü örneği oluşturmaktadır. Örnekler steril kaplarda soğuk zincir altında Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin/Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı laboratuvarına getirildi.

### 3.1.3. Antibiyogramda Kullanılan Antibiyotikler

Çalışma kapsamında antibiyogram testinde kullanılan başlıca antibiyotikler Tablo 2 de gösterilmiştir.

**Tablo 2:** Antibiyogram testinde kullanılan antibiyotikler.

Antibiyotik	Marka-Kod
Sefoksitin	Sigma-C4786
Metisilin	Sigma-51454
Tetrasiklin	Sigma- T7660
Tilosin	Sigma- T6134
Florfenikol	Sigma-F1427
Neomisin	Sigma-N1876
Siprofloksasin	Sigma-17850
Linkomisin	Sigma-621434
Polimiksin B	Sigma-P4932

### 3.1.4. Besiyerleri

#### 3.1.4.1. Mueller-hinton agar (MHA)

MHA (Merck 1.10293) besiyerinden 38 gr tartıldı ve 1000 ml distile su içerisinde karıştırılarak 121°C’de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. MHA mikrodilüsyon yönteminde *S. aureus* suşunun 0,5 McFarland'a ayarlanması aşamasında ve mikroplakalara ekiminde besiyeri olarak kullanıldı.

#### 3.1.4.2. Nutrient broth (NB)

NB (Merck 1.05443) besiyeri 8 gr tartıldı ve 1000 ml distile su içerisinde karıştırılarak 121°C’de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. NB mikrodilüsyon yönteminde *S. aureus* suşunu inkübatörde çoğaltmak amacıyla kullanıldı.

### 3.1.5. Çözücüler

HCl (Hidroklorik asit) : 1 ml HCl ve 9 ml distile su ile hazırlanan çözücü, siprofloksasin'in çözündürülmesinde kullanıldı.



DMSO (Dimetilsülfoksit) : 0,5 ml DMSO ve 9,5 ml distile su ile hazırlanan çözücü, tetrasiklin, florfenikol, tilosin, polmiksin B, linkomisin, neomisin, metisilin ve sefoksitinin çözdürülmesinde kullanıldı.

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. *S. aureus* izolasyonu**

Analizi yapılan çiğ süt örneklerinde *S. aureus* sayımı TSE 6582 ISO 6888 (2001) standardı çerçevesinde gerçekleştirildi. Numuneler, aseptik şartlarda stomacher torbalarına 10'ar ml olacak şekilde alınıp, üzerine 90 ml steril fizyolojik peptonlu su (OXOID CM0009) ilave edilerek karıştırıcıda (Bag mixer, Interscience, France) 2 dakika boyunca homojenize edildi. Homojenize edilen örneklerden  $10^{-2}$ 'ye kadar seri dilüsyonlar hazırlandı. Bu dilüsyonlardan Egg yolk-Tellurite Emulsion (OXOID SR0054C) içeren Baird Parkar Agar (BPA)'a (OXOID CM275) yüzeyde yayma plak yöntemiyle inokulasyon yapıp, 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından etrafı şeffaf zonla çevrili, gri ve siyah renkli karakteristik koloniler *S. aureus* şüpheli koloniler olarak değerlendirildi. Şüpheli kolonilere gram boyama, katalaz testi ve DNaz testi, mannitol fermantasyonu, tüp koagülaz testi uygulandıktan sonra, pozitif sonuç veren kolonilere Dry Spot Staphytest Plus Test Kiti (OXOID DR0100) prosedürleri uygulanarak doğrulama yapıldı.

### **3.2.2. *S. aureus* identifikasyonu**

#### **3.2.2.1. Gram boyama**

Stafilokok olduğu düşünülen ve saflaştırılan bakteriler Hucker's modifiye Gram boyama tekniği ile boyandı (Downes ve Ito, 2001). Bu amaçla lam üzerinde % 0,9 NaCl içerisinde çözüldürülen bakteriler ateşte fikse edildikten sonra 1 dakika kristal viyole, yıkamayı takiben 1 dakika iodine ve 15 saniyeyi geçmeyecek şekilde % 95 etanol ile muamele edildi. Kontur boyaması için 30 saniye safranin içerisinde bekletildi. Mikroskop altında 100x objektifte bakterilerin renkleri ve morfolojileri incelenmiş olup Gram pozitif (viyole renkte) ve tek ya da ikili veya üzüm salkımı morfolojisinde düzensiz kümelenmiş mikroorganizmalar stafilokok olarak tanımlandı.

### 3.2.2.2. DNaz testi

*S. aureus* izolatları, DNaz enzimi üretmekte ve koloni etrafındaki DNA'yı yapısal birimleri olan nükleotidlerine parçalamaktadır. Bu amaçla öncelikle şüpheli koloniler DNaz agara (OXOID CM0321) öze yardımıyla geçildi ve 37°C'de, 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası petri yüzeyini kaplayacak biçimde, 1N HCl ilave edildi ve DNA'nın HCl ile muamelesi sonrası presipitasyon varlığı incelendi. Sonuç olarak DNA'nın mikroorganizmalar tarafından kullanılmayan bölgeleri mat, *S. aureus* tarafından bakteri DNaz enzimi sayesinde DNA'nın parçalandığı bölgelerde şeffaf zonlar gözlemlendi ve bu sonucu veren koloniler DNaz pozitif olarak değerlendirildi (Bridson, 2006).

### 3.2.2.3. Katalaz testi

Bakteri kültüründen alınmış birkaç koloni temiz bir lam üzerinde birkaç damla % 3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile karıştırıldı. Gaz kabarcıklarının çıkması katalaz pozitif olarak değerlendirildi (Koneman ve ark, 2006).

### 3.2.2.4. Mannitol fermentasyonu

BPA'da gelişen *S. aureus* izolatları Mannitol Salt Agar'a (OXOID CM0085) geçildi. Besiyerinin fenol kırmızısı renginin sarıya dönüşmesi mannitol fermentasyonu açısından pozitif olarak değerlendirildi (Muratoğlu, 2010).

### 3.2.2.5. Tüp koagülaz testi

BPA'da üreyen *S. aureus* için şüpheli koloniler 10 ml NB (OXOID CM0001) içeren tüplere aktarıldı, 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 0,3 ml tavşan plazması içeren tüplere NB'da gelişen kültürden 0,1 ml inokule edildi ve 37°C'de inkübasyona bırakıldı. 4 saat sonra pıhtılaşma durumu kontrol edilip pıhtılaşmanın gözlenmesi koagülaz testi yönünden pozitif olarak değerlendirildi (Koneman ve ark, 2006).

### 3.2.2.6. Dry spot staphylect plus testi

Dryspot staphylect plus testi (OXOID DR0100) ile stafilokokların clumping faktör, protein A ve kapsülar polisakaritlerinin ayrımı yapılmaktadır. Test kartının işaretli

bölümüne bir damla serum fizyolojik üzerine bir öze dolusu şüpheli *S. aureus* konularak homojenizasyon sağlandı. Daha sonra homojenize sıvı test kartındaki reaksiyon bölümü ile muamele edildi ve 60-90 saniye sonra aglütinasyon (kümeleşme) görülmesi pozitif olarak değerlendirildi (Bridson, 2006).

### 3.2.3. Antibiyogram Testi

*S. aureus* suşlarının izolasyonu ve identifikasyonu yapıldıktan sonra -80 °C'de muhafaza edildi. Suşların antibiyogram testine hazır hale getirilebilmesi için sırasıyla önce -20 °C'de, +4 °C'de ve oda sıcaklığında 24'er saat bekletilerek canlandırıldı. Oda sıcaklığında bulunan suşlar daha sonra bir gece 37 °C'de inkübatörde inkübe edildi. Antibiyogram kapsamında pipet uçları, falkon tüpler ve cam tüpler ile hazırlanan MHB ve NB besiyerleri steril edildi. Hava sirkülasyonundan kaynaklanabilecek kontaminasyonu engellemek amacıyla pencereler ve laboratuvar kapısı kapatıldı. Antibiyogramın yapıldığı laboratuvar kabini % 70'lik etil alkol ile steril edilerek bek alevi açıldı. Sterilize edilmiş 50 ml'lik falkon tüplerde bulunan NB'tan 5'er ml steril cam tüplere aktarıldı. Canlandırılmış bakteri kültürlerinden otomatik pipet ile 50'şer µl alındı ve bu cam tüplere aktararak kapakları ile sıkıca kapatıldı. Suş ilave yapılmış cam tüpler 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Ertesi gün kültürlerde bakteri süspansiyonu oluşumu kontrol edildi ve bulanık görüntü oluşumu gözlemlendi.

Spektrofotometrede absorbans ölçümü öncesi çalışma alanı % 70'lik etil alkol ile dezenfekte edildi ve bek alevleri açıldı. İki adet quartz küvete 1'er ml MHB besiyeri konuldu ve 625 nm dalga boyunda sıfırlama yapıldı. Bakteri süspansiyonunun yoğunlukları ise 0,5 McFarland olarak ayarlandı. Yani bakteri süspansiyonunun 625 nm dalga boyunda 0,08-0,1 absorbans değerini göstermesi sağlandı. Bu amaçla içerisinde 1 ml MHB besiyeri bulunan küvete karşı okuma yapıldı. Boş olan diğer küvete toplamda 1 ml olacak şekilde belirli miktarlarda bakteri süspansiyonu ve MHB besiyeri eklendi ve absorbansın 0,08-0,1 aralığında olması sağlandı. Böylece her bir bakteri için 0,5 McFarland değerinin hangi miktarlarda elde edileceği hesaplandı.

İzole edilen suşların antibiyotik duyarlılık testleri CLSI (Clinical and Laboratory Standarts Institue) tarafından bildirilen broth mikrodilüsyon yöntemi esas alınarak yapıldı (CLSI, 2016). Antibiyotik stok solüsyonlarının hazırlanmasında üretici firmanın direktifleri dikkate alındı. Konsantrasyonlarının ayarlanmasında ise literatür bilgileri kullanıldı. Bu

kapsamda literatürlerde *S. aureus* suşlarının ilgili antibiyotiklere karşılık gelen EKEY<sub>50</sub> değerleri göz önünde bulunduruldu.

Antibiyoqram testinin yapıldığı laboratuvar kabini % 70'lik etil alkol ile steril edilerek bek alevi açıldı. Mikrodilüsyon testinde kullanılmak üzere her biri suş için steril cam tüpte ve 0,5 McFarland yoğunluğunda, toplamda 10 ml'lik bakteri süspansiyonu ve MHB içeren karışım hazırlandı. Bakteri süspansiyonu ve MHB oranı spektrofotometrik ölçüm sonuçlarına göre hesaplandı.

Mikrodilüsyon testi 96 kuyucuklu "U" tabanlı mikropklarda yapıldı. Mikropklalar, satırlar suşları ve sütunlar antibiyotiği temsil edecek şekilde kullanıldı. Bakteri üremesinin gözlemlenmesi ve belirlenmesi için 11. sırada yer alan kuyucuğa sadece 0,5 McFarland yoğunluğundaki bakteri süspansiyonundan 200 µl konuldu (pozitif kontrol sütünü). Kontaminasyonun oluşmadığının belirlenmesi için ise 12. sırada yer alan kuyucuğa 200 µl MHB konuldu (negatif kontrol sütünü). Literatürlerden elde edilen bilgiler doğrultusunda EKEY<sub>50</sub> değerleri belirlenen her bir stok antibiyotik çözeltisinden 10'ar ml'lik steril cam tüplerde iki kat seri dilüsyonlar yapıldı ve istenilen konsantrasyonlar hazırlandı. Mikropklaların ilk 10 sırasına ise 100'er µl önceden hazırlanmış bakteri süspansiyonu ve MHB içeren karışım konuldu. Bunun üzerine ilgili antibiyotik konsantrasyonlarından 100'er µl ilave edildi.

İnokulasyonu gerçekleşen mikropklalar 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda EKEY değerlerinin belirlenmesi için kuyucuklardaki üreme yoğunluğu negatif kontrol sütununda yer alan kuyucuklar ile karşılaştırıldı, üremenin gözlenmediği en düşük antibiyotik konsantrasyonu değerlendirmeye alındı. Ayrıca mikropklalar ELISA okuyucuda da analiz edildi ve her bir kuyucuğun 600 nm dalga boyunda optik dansitesi ölçüldü. Burada da üremenin olmadığı en düşük antibiyotik konsantrasyonu değerlendirildi. Yani, negatif kontrol sütununda yer alan kuyucuk ile aynı veya yakın optik dansiteye sahip kuyucuk EKEY'un olduğu kuyucuk olarak değerlendirildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Bakteri Suşlarının İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Farklı 100 güğüme ait 100 adet çiğ inek sütü örneklerinden etken izolasyonu ve identifikasyonu yapılarak 47 adet *S. aureus* elde edildi.

Stafilokok izolasyonunda gram boyama, *katalaz* testi, tüp *koagulaz* testi, *DNAaz* testi, mannitol fermantasyonu uygulandı ve dry top staphylect plus testi ile doğrulandı. Gram boyamada mikroskop altında 100x objektifte bakterilerin renkleri ve morfolojileri incelenmiş olup Gram pozitif (viyole renkte) ve tek ya da ikili veya üzüm salkımı morfolojisinde düzensiz kümelenmiş mikroorganizmalar stafilokok olarak tanımlandı. *S. aureus* tarafından bakteri *DNaz* enzimi sayesinde DNA'nın parçalandığı bölgelerde şeffaf zonlar gözlemlendi ve bu sonucu veren koloniler *DNaz* pozitif olarak değerlendirildi. Bakteri kültüründen alınmış birkaç koloni temiz bir lam üzerinde birkaç damla % 3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile karıştırıldı. Gaz kabarcıklarının çıkması *katalaz* pozitif olarak değerlendirildi. BPA'da gelişen *S. aureus* izolatları Mannitol Salt Agar'a (OXOID CM0085) geçildi. Besiyerinin fenol kırmızısı renginin sarıya dönüşmesi mannitol fermentasyonu açısından pozitif olarak değerlendirildi. BPA'da üreyen *S. aureus* için pıhtılaşma durumu kontrol edilip pıhtılaşmanın gözlenmesi *koagulaz* testi yönünden pozitif olarak değerlendirildi. Dryspot tect plus testinde aglütinasyon (kümeleşme) görülmesi pozitif olarak değerlendirildi.

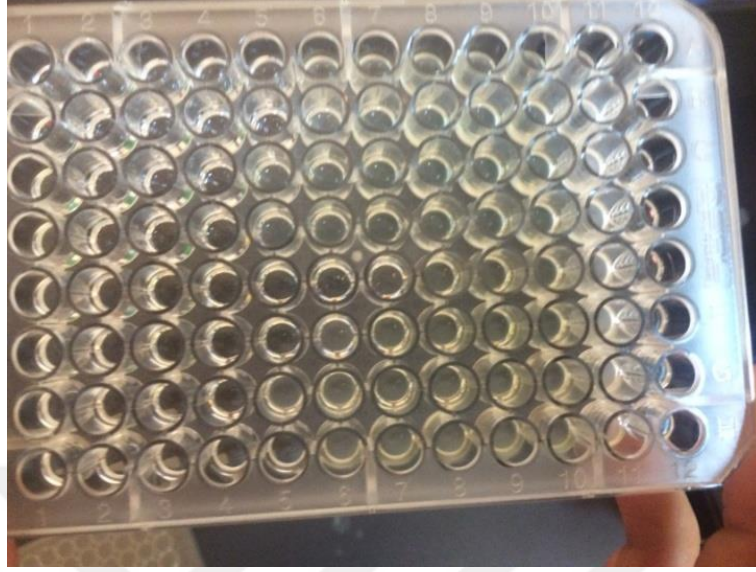
İzole edilen *S. aureus* suşlarının antibiyotik duyarlılık testinde NB ve MHB besiyerleri kullanıldı ve mikrodilüsyon yöntemi ile gerçekleştirildi. Suşların EKEY değerleri Clinical Laboratory Standart Enstitute (CLSI, 2012 ve 2016)' ye göre değerlendirildi (Tablo 3).

**Tablo 3:** *S. aureus* suşuna ait EKEY ( $\mu\text{g/ml}$ ) aralığı (CLSI, 2012 ve 2016).

Antibiyotik	EKEY aralığı ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	R	I	S
Sefoksitin	$\geq 8$	-	$\leq 4$
Metisilin	$\geq 16$	-	$\leq 8$
Tetrasiklin	$\geq 16$	8	$\leq 4$
Tilosin	$\geq 8$	4	$\leq 2$
Florfenikol	$\geq 32$	16	$\leq 8$
Neomisin	$\geq 64$	32	$\leq 16$
Siprofloksasin	$\geq 4$	2	$\leq 1$
Linkomisin	$\geq 4$	1-2	$\leq 0,5$
Polimiksin B	$\geq 8$	4	$\leq 2$

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

Etken izolasyonu ve identifikasyonunun ardından yapılan antibiyogram testi için mikrodilüsyon yöntemine göre hazırlanmış mikroplaka Resim 3’de gösterilmiştir.



**Resim 3:** Mikrodilüsyon yöntemine göre hazırlanmış mikroplaka.

Yapılan mikrodilüsyon metoduna göre izole edilen suşların % 53,2’sinin tetrasikline duyarlı olduğu belirlendi (Tablo 4).

**Tablo 4:** İzole edilen *S. aureus* suşlarının (n=47) mikrodilüsyon metoduna göre EKEY, EKEY<sub>50</sub>, EKEY<sub>90</sub> değerleri ve direnç oranı. EKEY: En küçük etkili yoğunluk.

Antibiyotik	EKEY (µg/ml) değerine göre izole edilen suş sayısı																EKEY (µg/ml)	EKEY <sub>50</sub> (µg/ml)	EKEY <sub>90</sub> (µg/ml)	Direnç (%)
	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096				
Sefoksitin											1		1	45			128-1024	1024	1024	100
Metisilin												3	43	1			256-1024	512	512	100
Tetrasiklin						7	18	8	8	2	3	1					4-256	8	64	46,8
Tilosin							1			1	1	1	2	7	34		8-1024	1024	1024	100
Florfenikol								2	19	12	13	1					16-256	32	128	95,7
Neomisin									5	15	16	7	3	1			32-1024	64	256	89,3
Siprofloksasin	2	4	2	3	10	5	13	5	2	1							0,125-64	2	16	55,3
Linkomisin											1	2	3	16	17	8	128-4096	1024	2048	100
Polimiksin B						6	2	2	1	1	1			5	1	28	4-4096	2048	4096	87,2

## 5. TARTIŞMA

Mastitis çok etmenli bir hastalık olup, çevre ve ineğe ait olumsuz faktörlerin etkisiyle oluşur. Süt ineği yetiştiriciliğinde mastitis; fiziksel nedenlerle meme dokusunda meydana gelen yaralanma, tahrişe sebep olan kimyasal maddeler ve mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlar sonucu meydana gelir (Kesenkaş, 2008). Mastitis hastalığı memeli hayvanların hepsinde görülmekle beraber süt inekleri için ayrı bir önem taşımaktadır. Çünkü süt, özellikle insan beslenmesinde yer alan en önemli gıda kaynaklarından biri olarak bilinmektedir ve sütün başlıca kaynağı olarak ilk sırada süt ineklerinin yer alması sığır mastitisini diğer memelilerde görülen mastitislere oranla daha önemli kılmaktadır (Özpuat, 2011).

*S. aureus* en yaygın görülen kronik mastitis tiplerine neden olan bakteridir. Bazı sığırlar buzağılamadan sonra klinik mastitise yakalansa da enfeksiyon genelde subklinik ve süte ya da memede fark edilebilir değişiklikler olmadan somatik hücre sayısında artışlara neden olur. Bakteri, enfekte olmuş sığırın meme bezlerine, süt kanallarına ve memelerdeki lezyonlarına yerleşir ve bulaşıcıdır. Enfeksiyon *S. aureus* ile kontamine olmuş meme bezinden diğer meme bezine bulaşmasıyla gerçekleşir (Paterson 2013).

Mastitise neden olan bakterilerden *S. aureus*'un incelenerek antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirildiği birçok literatür bulunmaktadır. Bunun nedeni mastitisin sık ve yaygın bir şekilde görülen bir hastalık olmasından kaynaklanmaktadır. Hayvan ve insan sağlığı açısından değerlendirildiğinde ise konunun önemi daha çok artmaktadır. Çalışmaların çoğu disk difüzyon yöntemi ile yapılmış olup, mikrodilüsyon yöntemi kullanılan çalışmaların sayısında artış vardır.

Ülkemizde disk difüzyon antibiyotik testi ile yapılan çalışmalara bakıldığında Kaynarca (2009) Aydın İlinde yaptıkları çalışmada mastitisli ineklerden izole ve identifiye edilen 71 adet *S. aureus* suşunun neomisine % 70.5 dirençli, İkiz ve ark (2013) Marmara bölgesinde yaptıkları çalışmada 15 farklı çiftlikten 270 adet çiğ süt örneğinden elde edilen 12 adet *S. aureus* etkenlerinin neomisine % 91.67 dirençli, Genç (2015) 100 adet süt örneğinden izole edilen 28 adet *S. aureus* suşunun neomisine % 100 dirençli olduğunu bildirmişlerdir.



Farklı antibiyotik duyarlılık testleri ile tetrasikline direnç oranının araştırıldığı çalışmalara bakıldığında Ünal (2012) Türkiye’de mastitisli inek ve koyunlardan izole edilen 152 adet *S. aureus* ve koagülaz pozitif suşlarının tetrasikline % 3.3-26.1 dirençli, Kaynarca (2009) Aydın İlinde yaptıkları çalışmada mastitisli ineklerden izole ve identifiye edilen 71 adet *S. aureus* suşunun tetrasikline % 87.5 dirençli, Tanrıbuyurdu (2014) 100 adet çiğ süt örneğinden izole edilen 27 adet *S.aureus* suşlarında agar dilüsyon yöntemi ile yaptıkları çalışmada tetrasikline % 81 dirençli, Yang ve ark (2016) Çin’de yaptıkları çalışmada izole edilen 44 adet *S. aureus* suşunun disk difüzyon yöntemi ile yapılan çalışmada tetrasikline % 15,91 dirençli olduğunu bildirmişlerdir.

Genç (2015) disk difüzyon yöntemi ile yapılan antibiyogram testinde 100 adet süt örneğinden izole edilen 28 adet *S. aureus* suşunun florfenikole % 100 duyarlı olduğunu, Abed ve ark (2018) Mısırda yaptıkları çalışmada izole edilen 237 adet *S. aureus* suşlarının disk difüzyon yöntemi ile florfenikole % 32 dirençli olduğunu belirtmişlerdir.

Kaynarca (2009) Aydın İlinde mastitisli ineklerden izole ve identifiye edilen 71 adet *S. aureus* suşunun disk difüzyon yöntemi ile sefoksitin için % 93 olarak dirençli, Abed ve ark (2018) Mısırda yaptıkları çalışmada izole edilen 237 adet *S. aureus* suşlarının disk difüzyon yöntemi sonucunda sefoksitine % 75 dirençli olduğunu belirtmişlerdir.

Ünal (2012) Türkiye’de mastitisli inek ve koyunlardan izole edilen izole edilen 152 adet *S. aureus* ve koagülaz pozitif suşlarının linkomisine % 22,3 dirençli olduğunu belirtmiştir.

Yapılan çalışmalarda metisilin dirençli stafilokok izolasyonunun artarak ilerlediği bildirilmiştir (Leonard ve Markeley 2007). Türkiye’de mastitisli ineklerden elde edilen çiğ sütlerde metisilin direnci ile yapılan çalışmalarda Uçan ve Aslan (2002) 75 *S. aureus* izolatından birinin ve Hadimli ve ark (2001)’ları 78 *S. aureus* izolatından 14’ünün metisilin direncine sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Yapılan araştırmalar coğrafik bölgelerde farklı antibiyogram testlerinin ve antibiyotiklerin seçildiğini göstermektedir. Sonuçların arasındaki farklılıkların, test edilen suşların farklılığından ve orijininin, bölgesel kullanım alışkanlıkları veya hedef mikroorganizma için etkisiz antibiyotik kullanımı, araştırma yapılan hayvanların genotipik yapıları, yaş, laktasyon sayısı ve dönemi, immun sistem gücü, meme yapıları, ortamda eksik hijyen gerekliliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

TÜBA (Türkiye Bilimler Akademisi) insan ve hayvan sağlığında akılcı antibiyotik kullanımı ve antibiyotik dirençliliği 2017 raporuna göre; Türkiye’de Veteriner Tıbbi Ürünlerin hammadde ithalatında % 46 ile antibakteriyeller ilk sırada yer almaktadır. Bunun % 23’ünü tetrasiklin, % 18’ini penisilin ve linkozamid, % 11’ini makrolid grubu antibiyotikler oluşturmaktadır. Antibiyotik hammadde ithalat verilerine bakıldığında, 2015 yılında, 2013 ve 2014 yıllarına göre bir azalma göze çarpmaktadır. Bu düşünün denetimlerin sıklaştırılmasına, farkındalık artışı ve bilinçli ilaç tüketimine bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir.

Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından 2017 yılında “Veteriner Hekimlik Alanında Antimikrobiyal Direnç (AMD) İzleme ve Kontrol Stratejileri Eylem Planı” hazırlanmıştır. Eylem planı içerisinde; Veteriner Hekimlik Alanında Antimikrobiyal Direnç Oluşumunun Azaltılması ve Yayılmasının Kontrolü İçin Koordinasyonun Sağlanması, Veteriner Hekimlik Alanında Antimikrobiyal Direncin İzlemesi, Hayvancılık Ekonomisi ve Halk Sağlığını Tehdit Eden Bakteriyel Enfeksiyonların Kontrol ve Eradikasyon Planlarının Geliştirilerek Uygulanması, Veteriner Hekimlik ve Tarım Alanında Antibiyotik Kullanımının Değer Zinciri İçerisinde İzlenmesi ve Akılcı Kullanımının Sağlanması, Bilinçli Antibiyotik Kullanımı ve Antimikrobiyal Direnç Üzerine Farkındalık Yaratılması, AMD Alanında Araştırmaların Desteklenmesi ve Alternatif Antimikrobiyallerin Geliştirilmesi başlıkları yer almaktadır.

Küresel antimikrobiyal direnç sorunu ve tedavisinde de yeni yaklaşımlar vardır. Birinci olarak peptid antibiyotikler ve ikinci olarak antisens antibakteriyel etki, oligomerlerin kullanılarak genlerde protein yapımının durdurulmasıdır.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Antibiyogram sonuçları açısından değerlendirildiğinde antibiyotik dirençliliği yönünden bölgesel farklılıkların olduğu görülmektedir. Bu nedenle mastitis sağaltımında ve kontrol programlarında kullanılacak antibiyotiğin belirlenmesinde antibiyotik duyarlılık testinden faydalanılması önemli bir noktadır. Türkiye’de hayvanlarda mastitislerden izole edilen stafilokoklarda antibiyotik direnci coğrafik bölgeler, hayvanın klinik durumu, hayvanın yaşı, sürü ve izolat kaynağı bakımından farklıdır. Antibiyotik kullanımı ile direnç artışı arasında paralellik olduğundan dolayı çiftlik hayvanlarında antibiyotik kullanımı kontrol edilmeli, akılcı antibiyotik kullanımı konusunda yetiştiriciler bilgilendirilmelidir. Veteriner hekim kontrolünde antibiyotik kullanımı ile ilgili sıkı önlemler alınmalıdır. Veteriner alanda antibiyotik kullanımı öncesi mastitiste doğru tanı için antibiyogram uygulamasının yapılması ve doğru antibiyotiklerin uygun süre ve dozlarda kullanımına dikkat edilmelidir. Bu çalışmada metisilin, sefoksitin, tilosin, florfenikol, neomisin, linkomisin, polimiksin B ve siprofloksasin direncinin bölgede göz önünde bulundurulması gerektiği, mastitis sağaltımı ile veteriner hekim kontrolünde bu antibiyotiklerin kullanımına dikkat edilmesi gerektiği sonucuna varıldı.

## KAYNAKLAR

- Aarestrup FM, Larsen HD, Jensen NE.** Characterization of *Staphylococcus simulans* strains isolated from cases of bovine mastitis. *Veterinary Microbiology* 1999, 66, 165- 170.
- Abed AH, Attia ASR, Atia AA.** Genotyping of  $\beta$ -Lactams resistant staphylococci isolated from bovine subclinical mastitis. *Bacteriology, Mycology and Immunology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Beni-Suef University, Mısır* 2018.
- Adaleti R, Nakipoğlu Y, Ceran N, Taşdemir S.** Prevalence of phenotypic resistance of *S. aureus* isolates to macrolide, lincosamide, streptogramin B, ketolid and linezolid antibiotics in Turkey. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2010, 14(1), 4-11.
- Akan M.** Staphylococcus infeksiyonları Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). Ed Nejat Aydın, Jale Paracıkoğlu, Ankara, 2006, İlke Emek Yayınları.
- Alaçam E, Şahal M.** Sığır Hastalıkları Mastitis. Medisan Yayınevi 1997, Ankara, 389-406.
- Albayrak, A. İ.** Mastitisli ineklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının REP-PCR ile tiplendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya 2007.
- Alen S, Koneman E, Janda W, Schreckenberger P, Winn W, Woods G, Procop G.** The gram positive cocci, Part 1, Staphylococci and related organism. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5. Baskı, Philadelphia, 2006, 539-576.
- Applebaum PC.** Microbiology of antibiotic resistance in *S. aureus*. *Clinical Infectious Diseases* 2007, 45(3), 165-170
- Arda M, Minbay A, Aydın N.** Özel Mikrobiyoloji, Ankara, 1982, 96-106, Ankara Üniversitesi Basımevi.
- Arda M, Minbay A, Leloğlu N, Aydın N, Akay Ö.** Özel Mikrobiyoloji, Kars, 1992, 78-93.
- Arias CA, Vallejo M, Reyes J.** Clinical and microbiological aspects of linezolid resistance mediated by the cfr gene encoding a 23S rRNA methyltransferase. *Journal of Clinical Microbiology* 2008, 46(3), 892-896.

**Aslantaş Ö, Fatma Öztürk, Ayten Çelebi, Leyla Açık, Yaşar Ergün.** Subklinik inek mastitislerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının protein paterni, antibiyotik direnci ve plazmid profili yönünden karakterizasyonu. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2006, 53, 47-51.

**Atasever S, Erdem H.** Süt sığırlarında mastitis ile sütün elektriksel iletkenliği arasındaki ilişkiler. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 2008, 23(2), 131-136.

**Baddour MM, Kheir MM, Fatani AJ.** Comparison of mecA polymerase chain reaction with phenotypic methods for the detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Current Microbiology* 2007, 55, 473-479.

**Barkar S.** Toplum kaynaklı metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (CAMRSA) suşlarında kromozomal kaset tiplerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemleri ile araştırılması. Doktora Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara Üniversitesi, Ankara 2009.

**Baştan A.** İneklerde Mastitis. 1. baskı, Ankara, 2001, 41-51, Hatiboğlu Yayınevi.

**Baştan A.** İneklerde Meme Sağlığı ve Sorunları. 2. baskı, Ankara, 2013, Kardelen Ofset.

**Bilgehan H.** Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. Fakülteler Kitabevi 2000, İzmir, 239-268.

**Bisognano C, Vaudaux P, Rohner P, Lew DP, Hooper DC.** Induction of fibronectin-binding proteins and increased adhesion of quinolone-resistant *S. aureus* by subinhibitory levels of ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000, 44, 1428-1437.

**Bridson EY.** The Oxoid Manual, Unipath Limited, Hampshire, England, 2006.

**Cizman M.** The use and resistance to antibiotics in the community international *Journal of Antimicrobial Agents* 2003, 21, 297-307.

**CLSI.** Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Second Informational Supplement, Wayne, PA, USA, 2012, M100-S, 22 32 3.

**CLSI.** Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Six Edition, Wayne, PA, USA, 2016, M100-S.

**Clutterbuck AL, Woods EJ, Knottenbelt DC, Clegg PD, Cochrane CA, Percival SL.** Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary Microbiology* 2007, 117-212.

**Derbentli Ş.** Hastane Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisinde Moleküler Biyolojik Yöntemlerin Yeri. 1. Baskı, Ed. Ağaçfıdan A, Badur S, Türkoğlu S, Enfeksiyon Hastalıkların Laboratuvar Tanısında Moleküler Yöntemler Kongre kitabı, Genomed AŞ, 2002, 6-13.

**Derbentli Ş.** Stafilokoklarda antibiyotik direnci 2003-2004 Türkiye haritası. *Antibiyotik ve Kemoterapi Derneği dergisi* 2005, 19 (EK 2), 54-60.

**Deurenberg RH.** The molecular evolution of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection* 2007, 13(3), 222-35.

**Dilsiz B.** Subklinik mastitisli inek sütlerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında metisilin direncinin fenotipik ve genotipik araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Hatay 2010.

**Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM.** Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews* 2000, 13(1), 16-34.

**Doğruman F, Akca G, Aykan B, Sipahi AB, Çağlar K.** Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarında kinopristin/dalfopristin, linezolid duyarlılıkları ve makrolid-linkozamid-streptogramin B direnci. *Turkish Journal of Infection* 2008, 22(3), 153-163.

**Durupınar B.** Antibiyotiklere dirençte yeni eğilimler. *Klinik Dergisi* 2001, 14(2), 47-56.

**Duval J.** Treating mastitis without antibiotics. AGRO-BIO-370-11E, *Ecological Agriculture Projects* 1997.

**García-Álvarez L, Holden MT, Lindsay H.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *The Lancet Infectious Diseases* 2011, 11, 595-603.

**Genç F.** subklinik mastitisli sığırlardan *staphylococcus aureus*, *streptococcus uberis* ve *streptococcus dysgalactiae* etkenlerinin izolasyonu ve antibiyotiklere duyarlılıklarının belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın 2015.

**Gran HM, Wetlesen A, Mutukumira AN, Rukure G, Narvhus CA.** Occurrence of pathogenic bacteria in raw milk, cultured pasteurized milk and naturally soured milk produced at small-scale dairies in Zimbabwe. *Food Control* 2003, 14, 539-544.

**Greenwood D.** Antimicrobial Drugs, Chronicle of a Twentieth Century Medical Triumph. New York, Oxford University Press 2008, 85-139.

**Gülbandılar A.** Kütahya yöresinde çeşitli kaynaklardan elde edilen *Staphylococcus aureus* izolatlarının karakterizasyonu. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir 2006.

**Güler L, Ok U, Gündüz K, Gülcü Y, Hadimli HH.** Antimicrobial susceptibility and coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis cases in Turkey. *Journal of Dairy Science* 2005, 88, 31, 49-54.

**Hadimli HH, Ateş M, Güler L, Kav K, Öncel T.** Mastitisli süt ineklerinden izole edilen stafilokokların  $\beta$ -Laktamaz aktiviteleri ve antibiyotiklere duyarlılıkları. *Veteriner Bilimler Dergisi* 2001, 17, 21-25.

**Hardy KJ, Hawkey PM, Gao F, Oppenheim BA.** Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the critically ill. *British Journal Anaesthesia* 2004, 92, 121-130.

**Haveri M.** *Staphylococcus aureus* in bovine intramammary infection, molecular, clinical and epidemiological characteristics. Academic Dissertation, Department of Production Animal Medicine Faculty of Veterinary Medicine University of Helsinki Helsinki, Finland, 2008.

**Hooper DC.** Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. *The Lancet Infectious Diseases* 2002, 2(9), 530-538.

**Hu S, Concha C, Johannisson A, Meglia G, Waller KP.** Effect of subcutaneous injection of ginseng on cows with subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Veterinary Medicine Series B* 48(7), 2001, 519-528.

**İkiz S, Başaran B, Bingöl Eb, Çetin Ö, Kaşıkçı G, Özgür Ny, Uçmak M, Yılmaz Ö, Gündüz Mc, Sabuncu A.** Presence and antibiotic susceptibility patterns of contagious mastitis agents (*Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*) isolated from milks of dairy cows with subclinical mastitis. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science* 2013, 37, 569-574.

**Jain NC.** Common mammary pathogens and factors in infection and mastitis. *Journal of Dairy Science* 1979, 62, 128-134.

**Janapatla RP, Yan JJ, Huang AH, Chen HM, Wu HM, Wu JJ.** Inducible Clindamycin Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolates Causing Bacteremia at a University Hospital in Southern Taiwan. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2007, 58, 203–209.

**Kalkan S, Halkman K.** Bacillus Cereus ve İçme Sütünde Oluşturduğu Sorunlar. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 2006, 41, 1-11.

**Kanber G.** Mastitisli İneklerden İzole Edilen *Staphylococcus Aureus* Suşlarının Moleküler Tiplendirmesi. Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir 2014, 72.

**Karahan M.** Mastitisli inek sütlerinden izole edilen Streptokok ve Stafilokok etkenlerinde genetik polimorfizmin araştırılması. Doktora Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fırat Üniversitesi, Elazığ 2005.

**Kaya S, Pirinççi İ, Ünsal A, Karaer Z, Traş B, Bilgili A, Akar F.** Veteriner Farmakoloji. Cilt 2, 4. Baskı, Medisan Yayınları 2007, Ankara, 464-465.

**Kayaalp O.** Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 11. Baskı, Hacettepe-Taş Yayınları 2005, Ankara.

**Kaynarca S.** sığır mastitislerinden izole edilen stafilokoklarda metisilin direnci ve slaym pozitifliği. Yüksek lisans tezi, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın 2009.

**Kesenkaş H.** İzmir İli ve Çevresinde Seçilen Pilot İşletmelerde Mastitisin Belirlenmesi ve Süt Kalitesine Etkisi Üzerine Bir Araştırma. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü Ege Üniversitesi, İzmir 1999, 93.

**Kesenkaş H.** Mastitis ve somatik hücre sayısı nedir? Alınması gereken önlemler nelerdir?, Süt Dünyası, Süt Ürünleri Ve Teknolojileri Dergisi, Sayı 17, 2008.

**Koneman EW, Allen SD, Janda WM.** The Gram positive cocci: Staphylococci and related organisms. *Diagnostic Microbiology* 1997, 539-576.

**Koneman EW, Winn WC, Allen SD, Janda WM, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL.** Medical Bacteriology: Taxonomy, Morphology, Physiology, and Virulence; Staphylococci and Related Gram- Positive Cocci. In: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th Ed. USA: Lippincott Williams and Wilkins, p, 2006, 167-207, 624-662.



**Küplülü Ö, Sarımehtetoğlu B, Kaymaz Ş.** Pastörize sütlerde Elisa tekniği ile stafilokokal enterotoksin varlığının belirlenmesi. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science* 2002, 26, 631-637.

**Larsen HD, Sloth KH, Elsberg C, Enevoldsen C, Pedersen LH, Eriksen NHR, Aarestrup FM, Jensen NE.** The dynamics of *Staphylococcus aureus* intramammary infection in nine Danish dairy herds. *Veterinary Microbiology* 2000, 71-89-101.

**Le Loir Y, Baron F, Gautier M.** *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research* 2003, 2(1), 63-76.

**Lee HJ.** Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from cattle and chicken, and analyses of their *mecA*, *mecR1* and *mecI* genes. *Veterinary Microbiology* 2006, 114, 155-159.

**Lee JH.** Methicillin (Oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Applied and Environmental Microbiology* 2003, 69(11), 6489-6494.

**Leloğlu N.** Staphylococcus ve Staphylococcus Efeksiyonları. Özel Mikrobiyoloji, 4. Baskı, Medisan Yayınevi 1997, Ankara, 39-44.

**Leonard FC, Markey BK.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: A review. *The Veterinary Journal* 2007, 175, 27-36.

**Loken T.** Alternative therapy of animals homeopathy and other alternative methods of Therapy. *Acta Veterinaria Scandinavica* (Suppl 2) 2001, 95, 47-50.

**Lowy FD.** Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Clinical Investigation* 2003, 111(9), 1265-1273.

**Lowy FD.** *Staphylococcus aureus* infections. New England, *Journal of Medicine* 1998, 339, 520-532.

**Mayer KH Opal SM Medeiros AA.** Mechanisms of antibiotic resistance. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Fourth ed. New York: Churchill Livingstone, 1995, 212-225

**McCallum N, Berger-Bachi B, Senn MM.** Regulation of an antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology* 2010, 300, 118-129.

**Melchior MB, Fink-Gremmels, Gaastra W.** Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. *Journal of Veterinary Medicine Series B* 2006, 53, 326-332.

**Metin M.** Süt Teknolojisi: Sütün Bileşimi ve İşlenmesi. 3. Baskı, E.Ü. Mühendislik Fakültesi Yayınları, İzmir, 2001, 793.

**Moreillon P, Que Y, Glauser MP.** *Staphylococcus aureus* including staphylococcal toxic shock. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practise of Infectious Diseases 6. Baskı, *Elsevier* 2005, 2321-2352.

**Mukherjee R, Dasha PK, Ram GC.** Immunotherapeutic potential of *Ocimum sanctum* (L) in bovine subclinical mastitis. *Research in Veterinary Science* 2005, 79, 37-43.

**Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA.** *Staphylococcus* and related organisms. *Mosby* 2002, 202-216.

**Normanno G, Firinu A, Virgilio S, Mula G, Dambrosio A, Poggiu A, Decastelli L, Mioni R, Scuota S, Bolzoni G, Di Giannatale E, Salinetti AP, La Salandra G, Bartoli M, Zuccon F, Pirino T, Sias S, Parisi A, Quaglia NC, Celano GV.** Coagulase- positive *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *International Journal of Food Microbiology* 2005, 98, 73-79.

**Oviedo-Boyso J, Valdez-Alarcon JJ, Cajero-Juarez M, Ochoazarzosa A, Lopez-Meza JE, Bravo-Patino A, Baizabalaguirre VM.** Innate immun response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *Journal of Infection* 2007, 54, 399-409.

**Özaslan A.** Adana içme suyunda fekal koliform düzeyinin belirlenmesi ve antibiyotik dirençlilik frekansı. Yüksel Lisans Tezi, Fen bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Çukurova Üniversitesi, Adana 2009.

**Özpulat B.** Sığır mastitislerinden *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* ve *Streptococcus uberis*'in kültür ve moleküler yöntemlerle tanısı. Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın 2011.

**Öztürk R.** Antibiyotiklerin etki mekanizmaları, antimikrobik ilaçlara karşı direnç gelişmesi. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu 2, İstanbul, 1997.

**Paterson GK, Morgan FJE, Harrison EM, Peacock SJ, Parkhill J, Zadoks RN Holmes MA.** Prevalence and properties of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bovine bulk tank milk in Great Britain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2013, 1-5.

**Peacock SJ, Moore CE, Justice A, Kantzanou M, Story L, Mackie K.** Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity* 2002, 70, 4987-4996.

**Pesavento G, Duccib B, Comodo N, Lonostro A.** Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: A research for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Food Control* 2007, 18, 196-200.

**Petersen A, Stegger M, Heltberg O, Christensen J, Zeuthen A, Knudsen LK, Urth T, Sorum M, Schouls L, Larsen J, Skov R, Larsen AR.** Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the novel mecC gene in Denmark corroborates a zoonotic reservoir with transmission to humans. *Clinical Microbiology and Infection* 2013, 19, 16-22.

**Pyörola S.** Staphylococcal and Streptococcal Mastitis. Ed Sandholm M, Honkanen T., Kaartinen L, Pyörola S, The Bovine Udder and Mastitis. Faculty of Veterinary Medicine University of Helsinki, 1995, 143-147.

**Rainard P, Corrales JC, Barrio MB, Cochard T, Poutrel B.** Leucotoxic activities of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows, ewes, and goats with mastitis: Importance of LukM/LukF'-PV leukotoxin. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2003, 10(2), 272-277.

**Reygaert WC.** Antimicrobial resistance mechanisms of *S. aureus* Formatex. 2013, 297-305.

**Sakarya S.** Genomic plasticity and antibiotic resistance. *Journal of Infection disease* 2011, 4(1), 24-27.

**Sancak B, Ünal S.** Staphylococci, Enterococci: Evaluation of Resistance. *Journal of Infection Disease* 2011, 4(1), 37-49.

**Sandholm M, Honkanen T, Kaartinen L, Pyörola S.** The Bovine Udder and Mastitis. University of Helsinki, 1995.

**Sekkin S, Kum C.** Mastitis tedavisinde kullanılan antibakteriyel ilaçlar ve özellikleri. *Türkiye Klinikleri Veteriner Bilimleri Dergisi* 2010, 1 (1), 1-9.

**Shorr AF.** Epidemiology of Staphylococcal resistance. *Clinical Infectious Diseases* 2007, 45(1), 171-176.

**Šilhavá M, Šoch M, Lukešová D.** Recurrence of mastitis in cattle treated either by allopathic, preventive homeopathic or combined therapy. *Agricultura Tropica et Subtropica* 38(3-4), 2005, 57-63.

**Sköld O.** Antibiotics and antibiotic resistance. *John Wiley and Sons* 2011, Canada.

**Stapleton PD, Taylor PW.** Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*, *Science progress* 2002, 85, 57-72.

**Sundsford A, Simonsen GS, Haldorsen BC, Haaheim H, Hjelmevoll S, Littauer P, Dahl KH.** Genetic methods for detection of antimicrobial resistance. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica (APMIS)* 2004, 112, 815-837.

**Tanrıbuyurdu E.** Sığır mastitislerinden izole edilen staphylococcus aureus suşlarında biofilm oluşumu ve antibiyotiklere dirençliliğinin belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın 2014.

**Tanrıbuyurdu E.** Sığır mastitislerinden izole edilen *staphylococcus aureus* suşlarında biofilm oluşumu ve antibiyotiklere dirençliliğinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın 2014.

**Uçan US, Aslan E.** İnek mastitislerinden izole edilen koagulaz pozitif stafilokok suşlarının penisilin direnci ve bazı antibiyotiklere duyarlılıkları. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi* 2002, 18, 19-22.

**Ulusoy S, Usluer G, Ünal S.** Gram-Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi 2004, Ankara, 9-68.

**Üçüncü M.** Süt ve Mamülleri Teknolojisi Ders Kitabı. Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü. İzmir, 2005.

**Ünal N.** Mastitisli hayvanlardan izole edilen stafilokokların antibiyotik direnci ve hayvanlarda metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2012, 9(3), 221-231.

**Ünal S.** *Staphylococcus aureus*, Direnç mekanizmaları, Ed. Ulusoy S, Usluer G, Ünal, Gram pozitif bakteri enfeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi 2004, Ankara, 24-38.

**Ünal, N.** İnsan ve hayvan kökenli *Staphylococcus aureus* izolatlarının fenotipik ve genotipik özellikleri üzerine çalışmalar. Doktora Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale 2007.

**Ünlütürk A, Turantaş F.** Gıda güvenliği, mikrobiyolojik kriterler ve hızlı mikrobiyolojik yöntemler. Gıda Mikrobiyolojisi, Mengi Tan Basımevi 1999, İzmir.

**Valsangiacomo C, Dolina M, Peduzzi R, Jaggli M.** Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from hospitalized patients and dairy food (fresh cheese): asurvey over a decade in southern Switzerland. *Clinical Microbiology and Infection* 2000, 6-7.

**Vanderhaeghen W, Hermans K, Haesebrouck F, Butaye P.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in food producing animals. *Epidemiology and Infection* 2010, 138, 606-625.

**Vasudevan P, Nair MKM, Annamalai T, Venkitanaraynan KS.** Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Veterinary Microbiology* 2003, 92, 179-185.

**Walstra P, Jenness R.** Dairy Chemistry and Physics. *Wiley Interscience Publication*, New York, 1984, 467.

**WEB\_1. (2012). Todar K.** *Staphylococcus aureus*,. [http://www.textbookofbacteriology.net/staph\\_2.html](http://www.textbookofbacteriology.net/staph_2.html) (20.07.2018).

**WEB\_2. (2008). Turner SA, Hulbert CL.** What place is there for homeopathy in on farm mastitis control? Dairynewz Summer. 20. <http://www.dairynz.co.nz/file/fileid/28249> (20.07.2018).

**Wendlandt S, Feßler AT, Monecke S, Ehricht R, Schwarz S, Kadlec K.** The diversity of antimicrobial resistance genes among staphylococci of animal origin. *International Journal of Medical Microbiology* 2013, 303 (6), 338- 349.

**Winston LG, Chambers HF.** Antimicrobial resistance in staphylococci: mechanisms of resistance and clinical implications. Ed. Mayers DL, Antimicrobial Drug Resistance, Volume 2, Clinical and Epidemiological Aspects. New York, NY Humana Press, 2009, 735-748.

**Wynn SG, Fougere BJ.** Veterinary Herbal Medicine. *Elsevier* 2007 Philadelphia, USA.

**Yang F, Wang Q, Wang X, Wang L, Li X, Luo J, Zhang S, Li H.** Genetic characterization of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis cases in Northwest China. Laboratory of Applied Organic Chemistry, Lanzhou University, Lanzhou, China, 2016.

**Yıldız A.** Laktasyondaki subklinik ve klinik mastitisli sütçü ineklerde lincomisin-neomisin kombinasyonu ile meme içi tedavinin etkinliği. *Sağlık Bilimleri Dergisi* 2003, Fırat Üniversitesi, 17(1), 65-69.

**Zadoks RN, Van Leeuwen WB, Kreft D, Fox LK, Barkema HW, Schukken YH, Belkum A.** Comparison of *Staphylococcus aureus* Isolates from Bovine and Human Skin, Milking Equipment, and Bovine Milk by Phage Typing. Pulsed-Field Gel Electrophoresis, and Binary Typing. *Journal of Clinical Microbiology* 2002, 40 (11), 3894-3902.

**Zetola N, Francis JS, Nuermberger EL, Bishai WR.** Community- Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*: An Emerging Threat. *Lancet Infect Disease* 2005, 5, 275-286.

# EKLER

## Ek 1: Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Onayı



T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU  
(ADÜ-HADYEK)



Aydın, 29 Ağustos 2014

Sayı: 64583101/2014/125

Konu: Başvuru hakkında bilgilendirme

Sayın, Yrd. Doç. Dr. Murat BOYACIOĞLU

ADÜ Veteriner Fak. Farmakoloji ve Toksikoloji AD Öğr. Üyesi

Kurulumuza 25.08.2014 tarihinde başvurduğunuz "Çiğ sütlerde *Staphylococcus aureus* etkeninin izolasyonu, identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi" adlı çalışmanız Kurulumuzca gündeme alınmış ve değerlendirilmiştir.

Yapılan değerlendirme sonucunda, çalışmanızda canlı hayvan kullanılmayacağı anlaşılmış olup, canlı hayvan kullanımı olmayan çalışmalar için HADYEK onayı gerekmemektedir.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.

Doç. Dr. Tarhan DOST  
ADÜ-HADYEK Başkanı

## ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : DUYUK, Melih  
Uyruk : T.C.  
Doğum yeri ve tarihi : İzmir / 1985  
E-mail : melih@hotmail.com  
Yabancı Dil : İngilizce

### EĞİTİM

**Derece :** **Kurum :** **Mezuniyet tarihi:**  
Lisans Aydın Adnan Menderes Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi 2012

### BURSLAR VE ÖDÜLLER

-----

### İŞ DENEYİMİ

**Yıl :** **Yer/Kurum :** **Ünvanı :**  
2013- ... Tarım ve Orman Bakanlığı Veteriner Hekim