

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

**SUBKLİNİK MASTİTİSLİ SIĞIR SÜTLERİNDEN İZOLE EDİLEN
STAPHYLOCOCCUS İZOLATLARINDA BİYOFİLM ÜRETİMİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Cemil DEMİR

Danışman

Doç. Dr. Özkan ASLANTAŞ

HATAY - 2008

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

**SUBKLİNİK MASTİTİSLİ SIĞIR SÜTLERİNDEN İZOLE EDİLEN
STAPHYLOCOCCUS İZOLATLARINDA BİYOFİLM ÜRETİMİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Cemil DEMİR

Danışman
Doç. Dr. Özkan ASLANTAŞ

Bu çalışma Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi tarafından
Proje No: 08 L 0602 nolu proje olarak desteklenmiştir.

HATAY - 2008

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

**SUBKLİNİK MASTİTİSLİ SIĞIR SÜTLERİNDEN İZOLE EDİLEN
STAPHYLOCOCCUS İZOLATLARINDA BİYOFİLM ÜRETİMİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi
Cemil DEMİR

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 04/09/2008 günü sözlü olarak yapılan
tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi: Jüri Başkanı : Doç. Dr. Özkan ASLANTAŞ
Üye : Doç. Dr. Nizami DURAN
Üye : Yrd. Doç. Dr. Burçin ÖZER

Bu tez, Enstitümüz Mikrobiyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

04/09/2008
Doç. Dr. Nizami DURAN
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimin süresince benden yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Özkan ASLANTAŞ başta olmak üzere, laboratuvar çalışmalarında yakın desteklerini gördüğüm M.K.Ü Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencileri Veteriner Hekim Mehmet Ali YILMAZ ve Biyolog Bilge DİLSİZ'e teşekkür etmeyi bir borç bilirim. Ayrıca, maddi ve manevi her türlü desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen aileme en içten teşekkür ve şükranlarımı sunarım. Tez çalışmam sırasında manevi desteklerini benden esirgemeyen tüm arkadaşlarıma da teşekkürlerimi bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VII
KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
ÖZET	IX
ABSTRACT	X
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Etiyoloji	3
2.2. Epidemiyoloji	4
2.3. Türkiye’de ve Dünyada Stafilocok Mastitislerinin Görülme Sıklığı	5
2.4. Stafilocok Mastitislerinin Patogenezisi	5
2.5. Stafilocokların Virulans Faktörleri	6
2.5.1. Hücre Duvarı	6
2.5.2. Ekzotoksinler	8
2.5.3. Enzimler	10
2.6. Klinik Belirtiler	11
2.7. Tanı	12
2.8. Stafilocokkal Mastitislerin Tedavisi, Korunma ve Kontrol	13
2.9. Stafilocoklarda Antibiyotik Direnci	14
2.10. Biyofilm	15
2.10.1. Biyofilm Formasyonu	16
2.10.2. <i>ica</i> operon	18
2.10.3. <i>ica</i> operonun Ekspresyonu ve Biyofilm Formasyonunun Regülasyonu	19
2.10.4. Hastalık Patogenezisinde Biyofilm Formasyonun Önemi	20
2.10.5. Stafilocoklarda Hücrelerarası İletişim (Quorum-Sensing) Sistemi	21
2.10.6. Biyofilm Oluşumunda agr Sisteminin Rolü	24
2.10.7. Biyofilme Karşı Konak İmmun Sisteminin Yanıtı	25
2.10.8. Antimikrobiyal Ajanlara Biyofilm Direnci	27
2.10.9. Biyofilm ve Mastitis	29

3. GEREÇ ve YÖNTEM	32
3.1. GEREÇ	32
3.1.1. Bakteri Suşları	32
3.1.2.Çalışmada Kullanılan Besiyerleri	32
3.2. YÖNTEM	35
3.2.1. Biyofilm Üretiminin Fenotipik Olarak Belirlenmesi	35
3.2.1.1. Congo Red Agar (CRA) Metodu İle Biyofilm Üretiminin Saptanması	35
3.2.1.2. Mikropleyt (MP) Metodu İle Biyofilm Üretimin Saptanması	36
3.2.1.3. Standard Tüp (ST) Yöntemi İle Biyofilm Üretiminin Saptanması	36
3.2.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi	37
3.2.3. İstatistiksel Analiz	37
4. BULGULAR	38
4.1. Biyofilm Üretimi	38
4.2. Antibiyotik Duyarlılıkları ve Biyofilm Oluşumu ile İlişkisi	41
5. TARTIŞMA	43
6. SONUÇ	47
7.KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ	54

Şekiller Dizini

	Sayfa No
Şekil 1.1. Stafilokok hücre duvarı.....	6
Şekil 1.2. Biyofilm formasyonu ve olgunlaşması.....	18
Şekil 1.3. <i>S.epidermidis</i> 'te icaADBC lokusunun ekspresyonunu kontrol eden regülatör ağ.	19
Şekil 1.4. Stafilokokkal <i>agr</i> quorum-sensing sistemi.....	22
Şekil 4.1. Biyofilm üretiminin Congo Red agar yöntemi ile değerlendirilmesi.....	38
Şekil 4.2. Biyofilm üretiminin mikropleyt yöntemi ile değerlendirilmesi.....	38
Şekil 4.3. Biyofilm üretiminin standart tüp yöntemi ile değerlendirilmesi	39

Çizelgeler Dizini

	Sayfa No
Çizelge3.1. Stafilokok suşlarının farklı fenotipik yöntemlerle saptanan biyofilm üretme yetenekleri.....	37
Çizelge3.2. Mikropleyt yöntemi ile saptanan optik dansitelerine göre aderans değerleri.....	39
Çizelge3.3. Biyofilm pozitif ve negatif stafilok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları	41

Kısaltmalar Dizini

Agr	Accessory gene regulator
AI	Auto inducer
Bap	Biofilm associated protein
BN	Biyofilm negatif
BP	Biyofilm pozitif
CMT	Kalifornia mastitis test
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CRA	Congo red agar
EPS	Ekstrasellüler polisakkarit
FISH	Fluorescent in situ hybridisation
IcaR	<i>ica</i> operon regülator
<i>ica</i>	İntersellüler hücre adhezin
KPS	Koagülaz pozitif stafilokok
KNS	Koagülaz negatif stafilokok
MSCRAMM	Microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules
NAGA	N-asetilglukoz amin
NAMA	N-asetilmuramik asit
SarA	Staphylococcal accessory regulator
PS/A	Polisakkarit/adhezin
PIA	Polisakkarit intersellüler adhezin
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PMNL	Polimorfonükleer lökosit
PSM	Phenol soluble modulin
SHS	Somatik hücre sayısı
TSST-1	Toksik şok sendrom toksin 1
TSS	Toksik şok sendrom

TcaR	Teicoplanin-associated locus regulator
TSB	Tryptic soy broth
QS	Quorum sensing

ÖZET

Subklinik İnek Mastitislerinden İzole Edilen Stafilocok Türlerinde Biyofilm Üretiminin Araştırılması

Bu çalışmada, subklinik inek mastitislerinden izole edilen 127'si *Staphylococcus aureus* ve 65'i koagulaz negatif stafilocok (KNS) toplam 192 stafilocok suşunun biyofilm üretimi Congo Red Agar (CRA), Mikropleyt (MP) ve Standart Tüp (ST) yöntemleri kullanılarak araştırıldı ve test sonuçları karşılaştırıldı. İncelenen stafilocok suşlarının CRA, MP ve ST testleri ile biyofilm üretimi sırasıyla %72.4, %67,7 ve %62.9 oranında pozitif bulundu. CRA, MP ve ST testleri arasında istatistiksel olarak önemli farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Ayrıca, stafilocok suşlarının çeşitli antibiyotiklere karşı olan dirençlilikleri agar disk difüzyon yöntemi ile araştırıldı. Biyofilm pozitif (BP) stafilocok suşlarında penisilin G, ampisilin, amoksisilin/klavulanik asit, tetrasiklin, eritromisin, gentamisin, enrofloksasin olan direnç oranları sırasıyla %73.8, %69.7, %6.2, %20.7, %21.4, %1.4, %0.7, biyofilm üretmeyen (BN) stafilocok suşlarında ise %42.6, %23.4, %4.3, % 14.9, %19.1, %0.0 olarak tespit edildi. İncelenen tüm stafilocoklar ise vankomisin ve teikoplanine duyarlı bulundu. Antibiyotiklere dirençlilik oranları BP suşlarda BN suşlara göre daha yüksek bulunmakla birlikte, sadece penisilin, ampisilin ve eritromisine dirençlilik oranları istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).

Sonuç olarak, stafilocok suşlarında biyofilm üretiminin belirlenmesinde CRA testinin daha pratik ve spesifik olduğu, antibiyotiklere direnç gelişiminde de biyofilm üretiminin önemli rol oynadığı kanısına varıldı.

Anahtar Sözcükler: Biyofilm, antibiyotik direnci, mastitis, *Staphylococcus* spp.

ABSTRACT

Investigation of Biofilm Production in *Staphylococcus* Strains Isolated from Subclincic Bovine Mastitis

In this study, biofilm production in 192 *Staphylococcus* spp. consisting of 127 *Staphylococcus aureus* and 65 coagulase negative staphylococci (CNS) isolated from subclinical bovine mastitis was investigated with Congo Red Agar (CRA), Microplate (MP), and Standart Tube (ST) test and the test results compared to each other. The rate of biofilm production in all *Staphylococcus* spp. investigated with CRA, MP, and ST tests were 72.4%, 67.7%, and 62.9%, respectively. No statistically significant difference was found among the tests ($p>0.05$). In addition, antibiotic resistance of *Staphylococcus* spp. against various antibiotics was also determined by the agar disk diffusion method. The percentage of resistance against penicilin G, ampicilin, amocycilin/clavulanic acid, tetracyclin, eritromycin, gentamycin, and enrofloxacin in biofilm producing (BP) *Staphylococcus* spp. was 73.8 %, 69.7 %, 6.2 %, 20.7 %, 21.4 %, 1.4 %, and 0.7%, respectively. For non-biofilm producing (BN) *Staphylococcus* spp. was 42.6%, 23.4%, 4.3%, 14.9 %, 19.1%, 0.0%, respectively. All the strains were susceptible to vancomycin and teicoplanin. Although higher antibiotic resistance rates were observed in SP strains than that of SN strains, statistically significant difference in resistance to three antibiotics (penicilin, ampicilin, and eritromycin) were found between BP strains and BN strains ($p<0.05$). In conclusion, CRA could be used for the detection of biofilm production due to its reliability and specificity, and biofilm production plays important role in antibiotic resistance.

Key Words: Biofilm production, antibiotic resistance, bovine mastitis, *Staphylococcus*

1. GİRİŞ

Süt sığırı yetiştiriciliğinin en önemli hastalığı olan mastitis, meme bezlerinin travmatik etkilere ve meme içerisine ekzojen veya endojen olarak giren mikroorganizmalara karşı bir tepkisidir (Blood ve Radostits 1989).

Mastitis, klinik seyirlerine göre klinik ve subklinik mastitisler olarak sınıflandırılmaktadır. Meme dokusunda ve sütte değişikliklerin görüldüğü klinik mastitisler, memede şişme, ağrı, kızarıklık, sıcaklık ve duyarlılık gibi lokal belirtilerin yanında ateş, halsizlik, iştah ve kilo kaybı gibi sistemik hastalık belirtileri ile karakterizedir (Baştan 2002).

Mastitisin, ikinci formu olan subklinik mastitisler meme dokusunu, süt verimini ve bileşimini etkilemesi nedeniyle daha fazla önem arz etmektedir. Subklinik mastitisler klinik semptom göstermeden seyrettiği için gözden kaçmakta ve kolaylıkla yayılabilmektedir (Baştan 2002). Süt veriminin azalması, sütün kalitesinin bozulması, tedavi süresince sütün atılması, tedavi ve veteriner hekim giderleri nedeniyle süt sığırcılığı işletmelerinde büyük ekonomik kayıplara neden olan mastitislerin % 70'ni subklinik mastitisler oluşturmaktadır (De Graves ve Fetrow 1993).

Mastitislerin ortaya çıkışında konağa, çevreye ve mikroorganizmalara ait determinantlar önemli rol oynamaktadır. Konağa ait determinantlar arasında ırk ve kalıtım, yaş ve laktasyon sayısı, laktasyon dönemi, memenin doğal savunma mekanizmaları ve immun sistemin gücü sayılabilir. Çevresel determinantlara ise hava koşulları, mevsim, beslenme, sağım ile ilgili faktörler ve barınak koşulları örnek verilebilir. Mastitis vakalarının büyük çoğunluğu mikroorganizmalar (bakteriler, viruslar ve mantarlar) tarafından oluşturulmaktadır (Arda 1997). Sığırlardaki mastitis vakalarından 135'ten fazla mikroorganizma izole edilmesine rağmen infeksiyonların çoğunluğu stafilokoklar, streptokoklar ve Gram negatif bakteriler tarafından

oluşturulmaktadır (Tenhagen ve ark 2006). Bu etkenlerden bazıları kontagiyöz bazıları ise çevresel mastitis etkeni durumundadır. *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus agalactiae* kontagiyöz mastitis etkenleridir ve meme dokusunda bulunan patojenlerdir. Sağım sırasında sağımcıların elleri ve sağımda kullanılan ekipmanlar ile duyarlı ineklerin memesine bulaşmaktadır. Çevresel mastitis etkenleri hayvanların bulunduğu ortamda temas ettiği gaita, su, altlık ve toprakta çok fazla miktarda bulunmaktadır. Çevresel mastitise neden olan etkenlere *Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae* ve *Streptococcus uberis* örnek verilebilir (Baştan 2002). Mastitisin etiyolojisinde *S.aureus* ve diğer stafilokok türleri % 60-80 oranında bir paya sahip olmakla birlikte bu oran yerleşim yerlerine, mevsimsel farklılıklara ve farklı yetiştirme koşullarına bağlı olarak uygulanan mastitis kontrol programlarına göre değişebilmektedir (Hadimli ve Erganiş 2001).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Etiyoloji

Stafilokoklar ilk defa 1884 yılında Rosenbach tarafından irinli yaralardan izole edilmiştir (Schleifer 1986). Önceki yıllarda Micrococcaceae familyası içinde yer alan Stafilokok cinsi, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'nin son baskısında Bacilli sınıfında Bacillales takımında yer almaktadır. Stafilokok cinsi içerisinde yer alan türler, patojenite kriteri olarak kabul edilen koagulaz enzimi sentezleme yeteneklerine göre koagulaz pozitif stafilokoklar (KPS) ve koagulaz negatif stafilokoklar (KNS) olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. KPS'lar *S. aureus*, *S. intermedius* ve *S. hyicus* türlerini içine almaktadır (Akan 2006).

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

Stafilokoklar insanlarda ve hayvanlarda çeşitli hastalıklara neden olmaktadır. *S. aureus*'un insanlarda, nazokomiyal enfeksiyonlara, toksinlere bağlı enfeksiyonlara, invazyon ve/veya sistemik yayılım sonucu ortaya çıkan enfeksiyonlara, deri ve yumuşak

doku enfeksiyonlarına, cerrahi yara enfeksiyonlarına, santral sinir sistemi enfeksiyonlarına, solunum sistemi enfeksiyonlarına, üriner sistem enfeksiyonlarına, kardivasküler sistem enfeksiyonlarına, kas ve iskelet sistemi enfeksiyonlarına neden olmaktadır. KNS'lar ise insanlarda endokardit, osteomyelit, oküler operasyonlara bağlı gelişen endoftalmit, üriner sistem enfeksiyonlarına, nazokomiyal ve toplumsal kökenli gelişen enfeksiyonlara, immunsuprese bireylerde bakteriyemi ve vücuda uygulanan protez implantlarını takiben gelişen enfeksiyonlara yol açmaktadır (Bilgehan 2000).

Hayvanlarda ise stafilokoklar farklı klinik tablolarla karakterize enfeksiyonlara neden olmaktadır. İneklerde mastitis ve meme impetigosu, koyunlarda mastitis, kuzularda enzootik kene piyemisi, periorbital ekzama, dermatit ve follikülit, keçilerde mastit ve dermatit, domuzlarda mastitis, meme bezlerinin botriyomikozisi, nekrotize stafilokokal endometritis ve meme impetigosu, atlarda mastit ve botriyomikozis, tavşanlarda ve yeni doğanlarda eksudatif dermatit, apse, konjunktivit, kanatlılarda stafilokokkal artrit, septisemi ve omfalit, kedi ve köpeklerde piyoderma, piyometra, sistit ve otitis eksternaya neden olmaktadır (Quinn ve ark.1994).

2.2. Epidemiyoloji

Stafilokoklar deri ve mukoz membranların normal florasında bulunan mikroorganizmalardır. Vücut savunma mekanizmalarının bozulması, iç ve dış stres faktörleri, vücuttaki portandreler stafilokokların hastalık oluşturmasını kolaylaştırır. Bu nedenle fırsatçı patojen olarak da nitelendirilmektedir. Mastitisli hayvanlar sütleriyle de çok sayıda bakteriyi dışarı çıkarmaları nedeniyle aynı zamanda primer enfeksiyon kaynağıdır (Akan 2006, Roberson ve ark.1994). *S. aureus*'un bulaşmasında sağımcıların elleri, sağıcı ekipmanları, ahırda kullanılan malzemeler ve sağıcı hijyenine dikkat

edilmemesi önemli rol oynamaktadır (Gillespe ve ark.1999, Roberson ve ark.1998, Baştan 2002).

2.3. Türkiye’de ve dünyada stafilocok mastitislerinin görülme sıklığı

Mastitis Dünya’da ve Türkiye’de süt inekçiliği yönünden önemli bir enfeksiyondur. Multifaktöriyel bir etiyojolojiye sahip olan mastitisin eradikasyonu mümkün olmamakla birlikte, geliştirilen kontrol programları ile ancak insidensi düşük seviyelere çekilebilmiştir (Erganiş ve Uçan 2001). Türkiye’de mastitislerin yaygınlığını ve mastitislere neden olan mikroorganizmaların belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda farklı stafilocok izolasyon oranları bulunmuştur. Türütoğlu ve ark. (1995), Marmara bölgesinde %28.1 *S. aureus* ve %23.1 *S. epidermidis*, Kuyucuoğlu ve Uçar (2001) Afyon bölgesinde %40.1 *S. aureus*, Ergün ve ark. (2004), %42.4 KNS ve %25.1 *S. aureus*, Gürtürk ve ark. (1998) Van ve yöresinde %41 oranında stafilocok izole etmişlerdir.

Yurtdışında yapılan çalışmalarda Tenhagen ve ark. (2006) Almanya’da %9.1 KNS ve %5.7 *S. aureus*, Piepers ve ark. (2007) Belçika’da %41.1 non-*S. aureus* ve %25 *S. aureus*, Giannechini ve ark. (2002)_Uruguay’da %62.8 *S. aureus* ve %7.4 KNS, Pitkälä ve ark. (2004) Finlandiya’da %49.6 KNS ve %10.2 *S. aureus*, Workineh ve ark. (2002) Etopya’da %40.5 *S. aureus* ve %16.5 KNS izole etmişlerdir.

2.4. Stafilocok mastitislerinin patogenezi

Stafilocokların sahip olduğu toksinler, enzimler, yüzey proteinleri, kapsül ve slime gibi virulans faktörleri mastitislerin patogenezisinde önemli bir yere sahiptir. Bu faktörler konak savunma mekanizmalarından etkenin korunmasına, memede enfeksiyon başlatmasına ve invazyonuna yardımcı olurlar (Karahan 2005).

Akut inek mastitislerinde küçük meme kanallarının fibrin pıhtılarıyla hızlı bir şekilde tıkanması, irinli bir sekresyon, fibrin birikimi, etkilenen dokuların ödematöz şişkinliği görülür. Yangının şiddeti birkaç gün içinde azalmaya başlar ve meme kanallarının etrafında meydana gelen doku üremesine bağlı olarak meme dokusunda atrofi meydana gelir (Quinn ve ark 1994).

Kronik ve subklinik mastitiste, somatik hücre sayısında (SHS) artış ve bakterilerin etkilenen meme loblarına invazyonu söz konusudur. Bakterilerin üremesi genellikle sütün toplandığı kanallarda ve daha az olarak alveollerde meydana gelir. Yangısal tabloya bağlı olarak alveollerde atrofi ve süt kanallarında tıkanma şekillenir. Fagositik hücrelerin göçü sonucu yangının geliştiği bölgelerde apse odakları ve fibrozis gelişir. Fibrozis antibiyotiklerin penetrasyonunu sınırlandırdığı gibi fagositozu da önemli düzeyde engeller (Quinn ve ark 1994).

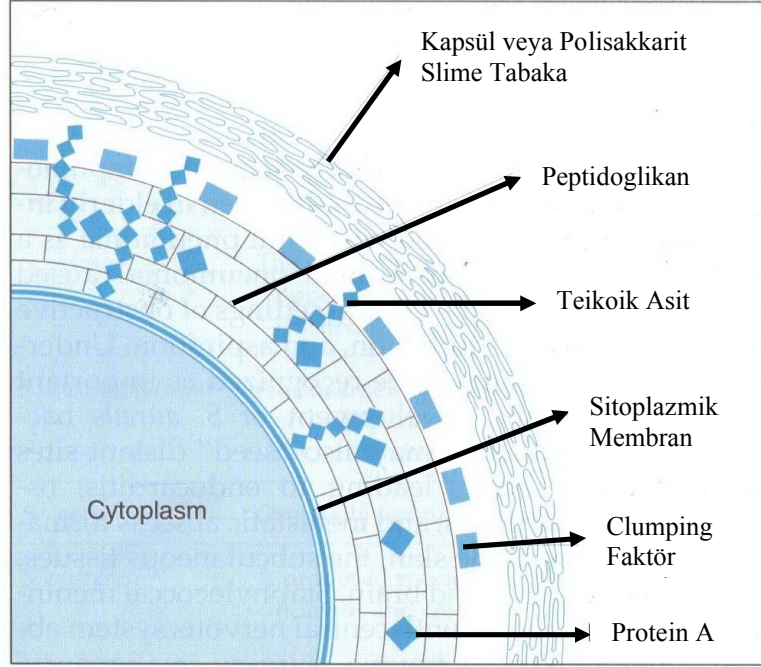
Akut, kronik ve subklinik mastitis tablolarının dışında bakterilerin sentezlediği toksinler ve doku yıkımı sonucu ortaya çıkan ürünlere bağlı toksemi tablosu ve ölüm de görülebilir (Blood ve Radostits 1989).

2.5. Stafilokokların Virulans Faktörleri

2.5.1. Hücre Duvarı

Peptidoglikan, teikoik asit ve protein A stafilokokların hücre duvarında bulunan üç önemli antijenik yapıdır (Resim 1). Peptidoglikan, stafilokoklarda N-asetilglukoz amin (NAGA) ve N-asetilmuramik asit (NAMA) monomerlerinin çapraz bağlanması ile meydana gelir. Bakteriye şekil ve elastikiyet kazandırır. Teikoik asit peptidoglikan tabakaya kovalent olarak bağlanmış fosfat içeren polimerlerdir. Mukozal yüzeylere stafilokokların adhezyonuna aracılık eder. Peptidoglikan ve teikoik asit virulanse katkı sağlayan çok sayıda biyolojik aktiviteye de sahiptir. Bu özellikler arasında

komplementin aktivasyonu, yangı hücrelerinin kemotaksisininin inhibisyonu ve antikor üretiminin stimülasyonu sayılabilir (Koneman 1997).



Resim1. Stafilokok hücre duvarı (Koneman 1997).

Protein A, *S. aureus* hücre duvarında IgG'nin Fc bölgesine bağlanma özelliğinde olan bir proteindir. Hücre duvarına bağlı olarak bulunabildiği gibi üreme sırasında besiyeri ortamına da salgılanabilmektedir. Protein A'nın opsonizasyonu ve fagositozu engellemesi, kompleman aktive etmesi ve geçikmiş aşırı duyarlılık reaksiyonlarına neden olmasından dolayı bir virulans faktörü olarak fonksiyon görmektedir. Kapsül, bazı *S. aureus* suşlarının ürettiği bakteriyi fagozitozdan koruyan ekzopolisakkarittir. Bu ekzopolisakkarit materyal aynı zamanda etkenin hücelere ve prostetik cihazlara adherensini artırmaktadır. *S. aureus*'un klinik izolatları kapsüler polisakkarit antijenlerine göre 8 serotipe klasifiye edilmiştir. En yaygın serotiplerin serotip 5 ve 8 olduğu bildirilmiştir (Koneman 1997).

2.5.2. Ekzotoksinler

Stafilokoklar çeşitli hücreler üzerine sitolitik etki gösteren ekzotoksinler salgılamaktadır. Virülenste büyük rol oynayan bu toksinler alfa, beta, gama ve delta olmak üzere dört gruba ayrılmaktadır (Akan 2006).

Alfa toksin: Alfa hemolizin adı da verilen bu toksinin hemolitik ve dermonekrotik etkisi vardır. Tavşan eritrositleri üzerine hemolitik etkinliği fazla olup, insan eritrositleri üzerine bir etkinliği bulunmamaktadır. Aynı zamanda potansiyel bir nörotoksindir. Defibrine koyun kanı katılmış Kanlı agar'da *S. aureus* kolonilerin etrafındaki hemoliz zonunun oluşumundan sorumludur (Koneman 1997).

Beta toksin: Birçok hücre üzerine etkili olan bir sfingomyelinazdır. Koyun, insan ve tavşan eritrositleri üzerine hemolitik etkisi vardır (Ekrem 2004). "Sıcak-soğuk hemolizin" adı verilen fenomenden sorumludur. B grubu streptokoklar tarafından oluşturulan CAMP faktörü ile birlikte sinerjetik hemolizisten sorumludur (Koneman 1997).

Gama toksin: İlk defa 1938 yılında saf olarak elde edilen bu toksine, insan, tavşan ve koyun eritrositleri duyarlı; at eritrositleri ise dirençli bulunmuştur (Ekrem 2004). Gama toksinin beta toksin ile birlikte doku irritasyonuna neden olduğu rapor edilmiştir (Karahana 2005).

Delta toksin: İlk defa 1947 yılında tespit edilen bu toksin bazı *S. aureus* suşlarında tespit edilmiştir. Alfa ve beta toksinlerden farklı olarak immunolojik aktiviteye sahip değildir. Eritrosit, lökosit ve trombositler hücre membranları üzerinde hasara neden olmaktadır (Ekrem 2004).

Lökosidin: Polimorfonükleer lökosit (PMNL) hücre membranları üzerine direkt etki göstermek suretiyle degranülasyona, hücrenin şişmesine ve ölümüne neden olmaktadır (Fox ve ark.1991). Toksini birbiriyle sinerjetik etki gösteren iki komponentten oluşmaktadır. Toksin hücre membranlarında porlar açarak permeabilitenin bozulmasına neden olmaktadır (Koneman 1997).

Toksik şok sendrom toksin-1 (TSST-1): İnsanlarda ateş, hipotansiyon, kusma, başağrısı, böbrek yetmezliği ve üşüme ile karakterize toksik şok sendrom (TSS) olarak adlandırılan multisistem hastalığından sorumludur. Toksin geniş biyolojik aktiviteye sahip olmakla birlikte, TTS'nin patogenezisindeki rolü tam olarak belli değildir. Deneme hayvan modelinde TSST-1'in Gram-negatif endotoksine karşı vücudun yanıtını önemli düzeyde artırdığı tespit edilmiştir. TSST-1, stafilokokkal enterotoksinler (SE) ve eksfoliyatif toksin (ETA) ile birlikte "superantijen" aktivitesine sahiptir (Koneman 1997).

Stafilokokkal enterotoksinler : SE'ler insanlarda gıda kaynaklı zehirlenmesine neden olmaktadır (Koneman 1997). Stafilokokkal gıda zehirlenmelerinin klinik belirtileri kısa inkubasyon süresini (2-6 saat) takiben ortaya çıkar. Klinik semptom olarak bulantı, kusma, karın ağrısı ve diyare görülür (Erol ve İşeri 2004). Klinik semptom oluşturan doz çok düşük olup, maymunlarda emetik dozun 5-20 µg/maymun olduğu bildirilmiştir (Balaban ve Rasooly 2000). Önceleri SE'lerin klasik olarak 5 tipinin (SEA, SEB, SEC, SED, SEE) olduğu kabul edilmekte iken, son yıllarda yapılan çalışmalarda yeni SE tipleri (SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO ve U) saptanmıştır (Cremonesi ve ark. 2005, Leterte ve ark. 2003, Jarraud ve ark. 2002). Stafilokokkal gıda zehirlenmelerinin %95'inden SEA-SEE, %5'inden ise yeni belirlenen SE tiplerinin sorumlu olduğu rapor edilmiştir (Cremonesi ve ark. 2005).

2.5.3. Enzimler

Koagülaz: Koagülaz, fibrinojeni fibrine çevirme özelliğinde protrombin benzeri aktiviteye sahip bir proteindir. Koagülaz enzimi infeksiyon sırasında *in vivo* fibrin bir bariyer oluşturur ve bakteriyi fagositozdan korur. Koagülaz bağlı ve serbest olmak üzere iki formda bulunur. Bağlı koagülaz (clumping factor) bakteriyel hücre duvarına bağlı halde bulunur, kültür filtratlarında serbest olarak bulunmaz. Bakteriler plazma içinde süspansiyon edildiğinde, bakteriler arasında fibrin iplikçikleri oluşur ve bakterilerin gözle görünen kümeler oluşturmasına neden olur. Serbest koagülaz ise kültür filtratlarında bulunan bir enzimdir. Koagülaz üreten mikroorganizma süspansiyonu plazma ile bir tüpte karıştırıldığında görülebilir pıhtı oluşur (Koneman 1997).

Katalaz: Stafilokoklar tarafından üretilen katalaz enzimi mikroorganizmalar fagosite edildikten sonra fagositik hücreler içinde miyeloperoksidaz tarafından oluşturulan toksik miyeloperoksidaz ve serbest radikalleri inaktive eder (Koneman 1997).

Hyaluronidaz: Dokulardaki intersellüler mukopolisakkarit matriksi hidrolize ederek bakterinin çevre dokulara yayılmasına yardımcı olur (Koneman 1997).

Fibrinolizin: Dokulardaki fibrin kümelerini parçalayarak infeksiyonun çevre dokulara yayılmasını sağlar (Koneman 1997).

Lipaz: Kutanöz ve subkutanöz dokulardaki lipidleri parçalayarak bakterinin lipidlerden zengin bölgelerde yaşamasını sağlar. Bu sayede etken fronkül ve karbonkül gibi deri infeksiyonları meydana getirir (Koneman 1997, Kireççi 2004).

Deoksiribonukleaz: DNA omurgasında fosfodiester bağlarını hidrolize eden bir enzimdir. Genellikle *S. aureus* suşlarında bulunan bu enzim koagülaz gibi bir patojenite faktörü olarak kabul edilmektedir (Arda 2000).

Pensilinaz (beta-laktamaz): Beta-laktam antibiyotikleri hidrolize ederek direnç gelişmesine neden olan enzimlerdir. Beta-laktamaz enzimi, büyük bir plazmid üzerinde yer alan *blaZ* geni tarafından kodlanmaktadır (Fuda ve ark 2005). Stafilocokların dışında Gram negatif bakterilerde de tespit edilen beta-laktamazlar molekül ağırlıklarına ve etki tarzlarına göre 4 sınıfa (A, B, C, D) ayrılmıştır. Stafilocokların sentezlediği beta-laktamazlar A sınıfında yer almaktadır (Özmen 2001).

2.6. Klinik belirtiler

Mastitisler meme dokusunda gelişen yangının şiddetine göre klinik ve subklinik tarzda görülür. Klinik mastitisler, meme dokusunda ve sütte gözle görülebilir değişikliklerle karakterizedir. Ayrıca klinik mastitisler perakut, akut, subakut ve kronik mastitis olarak da sınıflandırılmaktadır (Baştan 2002).

Perakut formun prognozu çoğunlukla olumsuz olmasına rağmen, kronik-subklinik form en önemli ekonomik kayıpların görüldüğü formdur (Quinn ve ark 1994). Perakut form, genellikle doğumu takiben kısa sürede ortaya çıkar ve mortalitesi yüksektir. Süt sulu, kanlı, flakonlu ve pıhtılı görünümde olabilir (Baştan 2002). Yüksek ateş, hızlı kalp atışı, anoreksi, depresyon, rumen hareketlerinde azalma ve kaslarda güçsüzlük gibi şiddetli sistemik reaksiyonlar gözlenebilir. Lokal ve sistemik reaksiyonlar ani olarak gelişir. Normal gözüken inek aniden yatabilir ve komaya girebilir. Memeler aşırı şişmiş, sert ve ağırlıdır. Meme ucunda başlayan morarma daha sonra meme loplarını da kapsayabilir. Etkilenmeyen meme lopları da genellikle şişmiştir. Tokseminin hızlı geliştiği vakalar ölümle sonuçlanır (Akay ve Aydın 1984, Baştan 2002, Quinn ve ark.1994).

Akut mastitisler, genellikle laktasyonun erken dönemlerinde meydana gelir. Memelerde şiddetli şişkinlik, sütte irin veya kan pıhtıları görülür. Akut formda sistemik

belirtiler olarak ateş, anoreksi, depresyon, zayıflama görülür. Lokal semptomlar ise meme bölgesinde şişme, ağrı, ödem ve sıcaklık artışı gibi yangısal belirtiler ile karakterizedir (Karahana 2005).

En yaygın görülen mastitis formu subklinik formdur. Subklinik formun başlangıcında memede ve hayvanın genel durumunda bir değişiklik farkedilmez. Fakat ilerleyen dönemlerde sütün yapısında değişiklikler meydana gelir. Sütte sulu bir görünüm veya pıhtı oluşumu ile birlikte, memelerde atrofi ve yavaş şekilde gelişen sertleşmeler gözlenebilir. Sütte somatik hücre sayısı artmıştır. Sütte meydana gelen değişiklikleri indirekt saptayan testler veya memelerin palpasyonu düzenli şekilde yapılmadığı takdirde hastalık memelerin fonksiyonlarını kaybetmesi ile sonuçlanabilir (Akay ve Aydın 1984).

2.7. Tanı

Mastitislerin tanısı klinik, kimyasal, fiziksel, hücresel ve bakteriyolojik muayeneler ile yapılmaktadır. Klinik olgularda meme ve sütteki nitelik ve niceliksel değişiklikler belirgin iken, subklinik mastitislerin tanısında meme ve sütte değişiklikler gözle izlenemediğinden sütteki değişiklikleri belirlemeye yönelik testlerden yararlanılmaktadır (Baştan 2002). Bu amaçla uygulaması en pratik olan ve sütteki somatik hücre sayısını belirlemeye yönelik olan California Mastitis Testi (CMT)'dir. Bunun dışında artan SHS'nı belirlemeye yönelik Whiteside ve Wisconsin mastitis testleri ile sütteki kan, kıvam ve pıhtı varlığını incelemeye yönelik Strip Cup Testleri bulunmaktadır (Arda ve ark 1997).

CMT ile saptanan pozitiflik incelenen hayvanın mastitisli olması yönünden bir ön fikir oluşturur. Ancak mastitise neden olan etkenin identifikasyonu amacıyla laboratuvar tanısı gereklidir. Bu amaçla kültür ve biyokimyasal testlerden

yararlanılmaktadır (Riffon ve ark 2001). Kültürel yoklamalar sürü düzeyinde infeksiyonun izlenmesi, antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi ve kontrolü yönünden de önemlidir (Milner ve ark 1997).

Mastitisli sütlerden izole edilen stafilocokların koagulaz pozitifliğine bakılarak bakterinin *S. aureus* olarak isimlendirilmesi birçok mikrobiyoloji laboratuvarı tarafından yeterli olarak görülmektedir (Goh ve ark.1992). Ancak *S. aureus* dışında koagulaz pozitif özellik gösteren stafilocok türlerinin de varlığı da göz önüne alındığında koagulaz testinin dışında *S. intermedius* ve *S. hyicus* gibi koagulaz pozitif türlerin *S. aureus*'tan ayrımı için DNase ve Clumping faktör testlerinin de yapılmasının gerekliliği vurgulanmıştır (Yavuz ve Esenal 2002). Stafilocokların laboratuvarlarda hızlı identifikasyonuna yönelik ticari StaphTrac, Minitex Gram-Positive Set ve Api-STAPH gibi kitler geliştirilmiştir (Quinn ve ark 1994).

Stafilocokların identifikasyonuna yönelik kısa sürede sonuç veren, sensitivite ve spesifitesi yüksek olan moleküler tekniklerden de yararlanılmaktadır. *S. aureus*'un 16S ve 23S rRNA bölgelerine spesifik primerlerin kullanıldığı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile kısa sürede çok sayıda numunenin identifikasyonu yapılabilmektedir (Riffon ve ark 2001).

2.8. Stafilocokkal mastitislerin tedavisi, korunma ve kontrol

S. aureus mastitislerinin tedavisinde meme içi veya parenteral yolla farklı antibiyotik uygulamalarından yararlanılmaktadır. Akut mastitis olgularında hızlı tedaviye başlamak esas olduğundan, kültür sonuçları beklenmeden geniş spektrumlu bir antibiyotik ile yüksek dozlarda tedaviye başlanır. İlacın 24 saat aralıklarla üç kez tekrar uygulanması tedavi şansını artırır. Ancak, laktasyon dönemindeki mastitis olguları

antibiyotik uygulaması ile tümüyle sağaltılamaması nedeniyle kuru döneme geçildikten sonra da sağaltıma devam edilmesi tavsiye edilmektedir (Şanlı 1984).

Perakut mastitis olgularında öncelikle memenin tamamen boşaltılması esastır. Parenteral ve meme içi antibiyotik uygulaması ile infekte meme bölümü ve hayvan kurtarılabilir. Antibiyotik tedavisine paralel olarak toksemiye karşı antihistaminik ve elektrolit tedavisi de uygulanır (Şanlı 1984).

Mastitislerin kontrolünde en etkin yöntem uygun ve hijyenik sağım prosedürleri ve meme sağlığı kontrol programlarının uygulanmasıdır (Hutton ve ark 1990). İnfekte hayvanların izolasyonu da yeni mastitis vakalarının sayısını azaltmak için başvurulan bir diğer yöntemdir (Wilson ve ark.1995). Mastitislerin aşılama ile eradikasyonu ve kontrolü ulaşılması güç bir hedef olmakla birlikte, mastitis oranının azaltılması, şiddetinin hafifletilmesi ve kendiliğinden iyileşme süresinin kısaltılmasına yönelik yararlanılmaktadır (Yancey 1993, Hadimli 2000).

2.9. Stafilokoklarda antibiyotik direnci

Mastitisin tedavisinde antibiyotiklerin yaygın ve bilinçsiz kullanımı direnç gelişimine neden olmaktadır. Bu nedenle, mastitislere neden olan patojenlerin identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi sadece tedavi açısından değil, populasyon içinde veya populasyonlar arasında dirençli izolatların yayılımının izlenmesi açısından da önem arz etmektedir (Güler ve ark. 2005).

Türkiye'nin farklı bölgelerinde mastitisli inek sütlerinden izole edilen stafilokok suşlarında değişen direnç oranları bildirilmiştir. Türütoğlu ve ark (2002), Burdur ilinde mastitisli inek sütlerinden izole ettikleri 250 stafilokok türünün %58.4'ünün eritromisine, %50.4'ünün penisiline, %48'inin oksitetrasikline, %45.6'sının ampisiline, %42'sinin amoksisiline, %18.8'inin kloksasiline ve %40'ının gentamisine dirençli

olduğunu bildirmişlerdir. Güler ve ark (2005) 1995-2004 yılları arasında Konya Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne getirilen farklı sürülere ait mastitisli süt örneklerinden izole ettikleri 250 *S. aureus* izolatının antibiyotik duyarlılıklarını belirlemişlerdir. Araştırmacılar, penisilin ve ampicilline %63.3, oksitetrasikline %27.9 ve trimetoprim-sulfametaksazol'a %1.8 oranında direnç saptamışlardır. Ergün ve ark. (2004), Hatay ilinde subklinik mastitislerden izole ettikleri 58 *S. aureus* suşunun enrofloksasin, danofloksasin, ampisilin-sulbaktam, amoksisilin-klavulanik asit, sefaperozon, amoksisilin, penisilin, eritromisin, sulfametaksazol-trimetoprim, oksitetrasiklin, gentamisin ve streptomisine direnç oranını sırasıyla %10.3, %6.8, %8.6, %7.2, %20.6, %37.9, %70.6, %24.1, %32.7, %65.5, %36.2 ve %52.6; 98 KNS suşunun ise direnç oranını sırasıyla %4.4, %12.5, %5.2, %17.2, %27.1, %33.3, %55.2, %31.2, %31.3, %68.7, %32.3 ve %23.9 olarak saptamışlardır. Kuyucuoğlu ve Uçar (2001), Afyon yöresinde mastitisli süt örneklerinden izole ettikleri 62 *S. aureus* suşunun amoksisilin-klavulanik asit, ampisilin-sulbaktam, enrofloksasin, danofloksasin, sefaperozon, streptomisin, penisilin G, tetrasiklin ve eritromisine direnç oranını sırasıyla %17.8, %29.1, %40.9, %25.9, %22.6, %75.0, %77.5, %72.6 ve %45.2 olarak bulmuşlardır. Şahin ve ark (1998) Kars ilinde mastitisli ithal simental ırkı ineklerden izole ettikleri 17 *S. aureus* suşunu enrofloksasin, danofloksasin ve ampisilin-sulbaktama duyarlı bulurlarken, linkomisine %58.82'sinin, eritromisine %17.64'ünün, sefaperozona %29.41'inin, sulfametaksazol-trimetoprimine %23.5'inin ve penisiline de %88.23'ünün dirençli olduğunu saptamışlardır.

2.10. Biyofilm

Doğal çevresel ortamlarda bakteriler planktonik (serbest) ve sesil (bağlı) olmak üzere iki formda bulunmaktadır. Planktonik form bakterilerin çoğalması ve yayılması için önemli iken sesil form bakteri popülasyonunun kalıcı olması açısından önemlidir. Tüm ekosistemlerdeki mikroorganizmalar biyofilm olarak adlandırılan yapısal topluluklar içinde çoğalırlar (Clutterback ve ark 1999). Biyofilm, cansız veya canlı bir yüzeye adhere olmuş bakteriler tarafından üretilen polimerik bir matriks içinde bulunan yapısal bakteriyel topluluklardır (Costerton ve ark 1999). Biyofilm formasyonu planktonik formdan sesil forma geçişi de kapsayan oldukça kompleks bir prosedir. Sesil üreme formu biyofilm içindeki bakteri topluluğun olumsuz çevresel koşulların ve antimikrobiyal ajanların etkisinden korunmasına yardımcı olur. İnfeksiyon ve hastalık süreci içinde biyofilm antimikrobiyal ajanlara ve konak immun sistem mekanizmaları tarafından eliminasyona direnç ile karakterizedir. Bu nedenle, biyofilm oluştuktan ve olgunlaştıktan sonra geleneksel antibiyotik konsantrasyonları ile tedavi etkisiz kalmaktadır (Clutterback ve ark1999).

2.10.1. Biyofilm Formasyonu

Biyofilm formasyonu kompleks ve dinamik bir süreçtir. Stafilokoklarda biyofilm oluşumu iki aşamada gerçekleşmektedir. Birinci aşama adhezyondur. Adhezyon aşamasında microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMM) adı verilen yüzey proteinleri önemli bir işleve sahiptir. Bakteriler bu yüzey proteinleri ile fibronektin, fibrinojen, kollajen, elastin ve vitronektin gibi farklı hücre yüzeyi ligandlarına veya inert yüzeylere bağlanabilir (Vancraeynest ve ark.2004). İlk defa sığır mastitislerinden izole edilen mutant *S. aureus* V329 suşunda saptanan biofilm associated protein (bap)'nin de biyofilm oluşumunda önemli rol oynadığı saptanmıştır. Bap, 2276 aminoasitlik bir proteindir. Adhezyon ve hücre-hücre

adhezyonunu güçlendirdiği gösterilmiştir. *bap* geninin fonksiyonunun engellenmesi PIA akümülyasyonunun azalmasına neden olmaktadır (Lasa ve Penadés 2006).

İkinci aşamada hücre-hücre adhezyonunu takiben bakteriler bölünerek çoğalmaya başlar ve ekstrasellüler polimerler üretilir. Bu süreç mikroorganizmaların hidrate bir ekzopolimer matriks ile çevrilmesi ile sonuçlanır. Matriksin içinde bakteriler birbirine yakın pozisyonda hareketsizdir ve beslenmeleri sıvı fazdan subsrat akımına ve/veya biyofilm içindeki diğer bakteriler ile besin alışverişine bağımlıdır (Clutterback ve ark 1999).

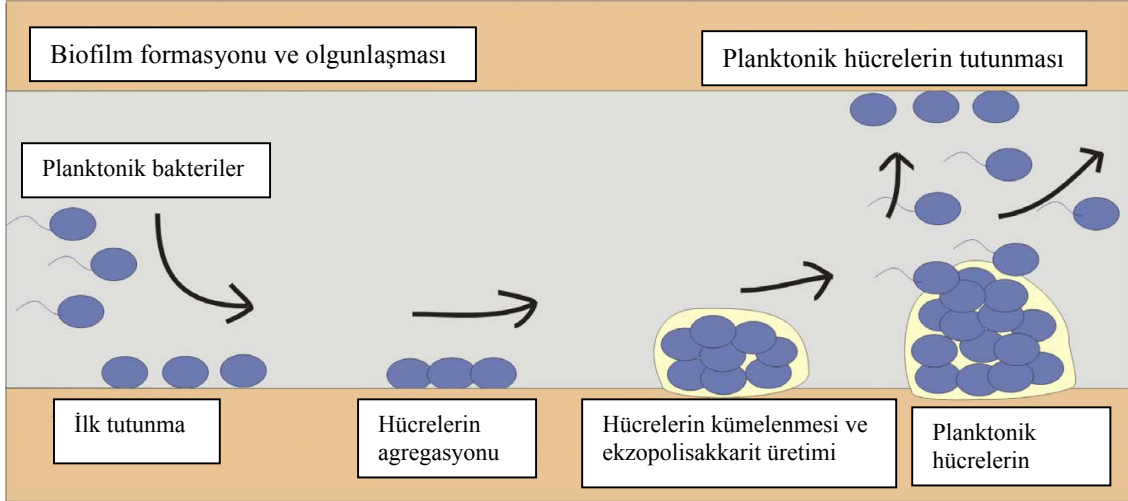
Biyofilmleri hidrofilik yapan temel komponent sudur. Biyofilmlerin içinde yeralan su kanalları genetik madde kazanılmasına ve alışverişine izin veren bir gen havuzu olarakta fonksiyon görebilir. Bu interstisyel porlar ve kanallar biyofilmin büyümesine olanak sağlamak için besin maddelerinin biyofilme ulaşmasına da izin verir (Clutterback ve ark. 1999).

Biyofilm içinde mikroorganizmalar farklı morfolojik yapıya sahip kümeler şeklinde bulunmaktadır. Bu kümelerin daha çok mantar benzeri silindirik yapılardan filamentöze kadar değişen yapısal bir özellik taşıdığı gösterilmiştir. Mantar benzeri yapı optimal besin alımına ve atıklara minimal maruziyete izin vermektedir. Nitekim, herhangi bir bakteriyel biyofilmin büyüme potansiyeli biyofilm içindeki hücrelere nutrientlerin ulaşması ve biyofilm içine kadar uzanan kanalların perfüzyonu devam ettirmesi ile sınırlıdır (Clutterback ve ark 1999).

Biyofilmin olgunlaşmasını kontrol eden diğer faktörler; internal pH, oksijen perfüzyonu, karbon kaynağı ve ozmolaritedir. Biyofilm kritik bir hacime ulaştığında en dış tabaka planktonik mikroorganizmaların oluşturulmaya başladığı dinamik bir dengeye ulaşır (Resim 2). Bu aşamadan sonra bakteriler biyofilmden ayrılmak üzere serbest kalırlar ve diğer yüzeylere kolonize olurlar (Melchior ve ark 2006).

2.10.2. *ica* Operon

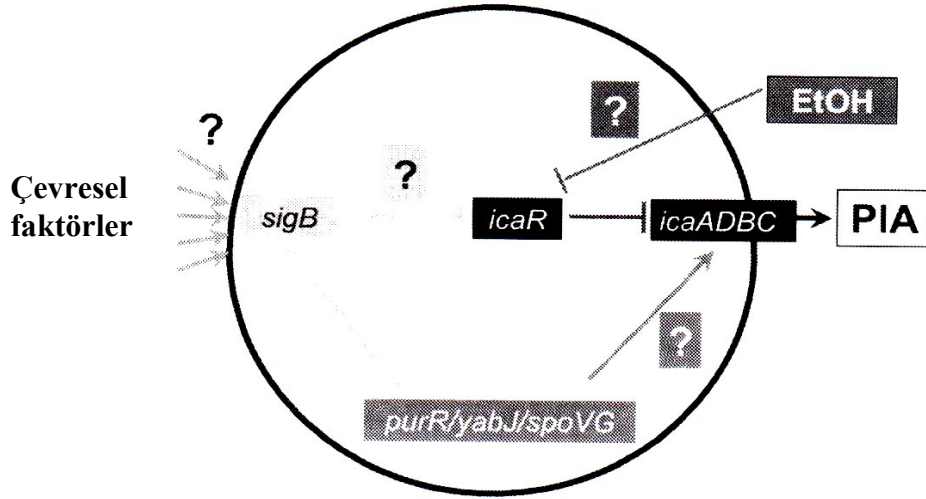
S. aureus'ta kapsüler polisakkarit/adhezin (PS/A) ve *S. epidermidis*'te ise polisakkarit intersellüler adhezin (PIA) olarak adlandırılan ekstrasellüler polisakkarid üretimi *ica* (intercellular adhesin) lokusu tarafından regüle edilmektedir (Fitzpatrick ve ark 2005). PS/A ve PIA yapısal olarak ortak β -1-6-glukozamin omurgasına sahiptir fakat amino grupları yönünden farklılık göstermektedir (Vasudevan ve ark.2003). *ica*ADB ve C genlerinden oluşan *ica* lokusu PS/A ve PIA sentezine aracılık eden proteinleri kodlamaktadır. *ica* genleri arasında *icaA* ve *icaD* *S. aureus* ve *S. epidermidis* suşlarında biyofilm formasyonunda önemli rol oynamaktadır. *icaA* geni UDP-N-asetilglukozamin'den N-asetilglukozamin oligomerlerinin sentezinden sorumlu olan N-asetilglukozaminotransferaz enzimini kodlar. Yalnız *icaA* geninin ekspresyonu düşük enzimatik aktiviteye neden olurken, *icaA* geninin *icaD* geni ile birlikte ekspresyonu N-asetilglukozaminotransferaz aktivitesinde önemli artışa ve fenotipik kapsular polisakkarit ekspresyonuna neden olmaktadır (Vasudevan ve ark.2003, Arciola ve ark 2001). *icaC* geninin deasetilasyon yaparak zincirin uzamasına katkı sağladığı, *icaB*'nin ise deasetilasyon aşamasında katalizatör olarak rol oynadığı düşünülmektedir (Şahin 2007).



Resim 2. Biyofilm formasyonu ve olgunlaşması (Melchior ve ark 2006).

2.10.3. *ica* Operonun Ekspresyonu ve Biyofilm Formasyonunun Regülasyonu

ica operon ekspresyonunun regülasyonu ve biyofilm gelişimi *ica* operon regülatör (IcaR), teicoplanin-associated locus regülatör (TcaR), çevresel faktörler (glukoz, etanol, yüksek ozmolarite ve sıcaklık), anaerobiozis, tetrasiklin veya quinupristin-dalfopristin'in sub-inhibitör konsantrasyonlarından olumsuz yönde etkilenir (Fitzpatrick ve ark 2005). *S. epidermidis*'de alternatif sigma faktör (σ^B) *icaR* ekspresyonunu negatif yönde regüle ederek *ica* operonun ekspresyonunu pozitif yönde etkiler (Resim 3). σ^B aktivitesini etkileyen mutasyonlar bu nedenle biyofilm-negatif fenotipe neden olur. *S. epidermidis*'in aksine *S. aureus*'da *sigB* lokusundaki mutasyonlar biyofilm-negatif fenotipe neden olmaz. Bu durum, *ica* operonun regülasyonu ve biyofilm gelişiminde türler arasında önemli bir farklılığı vurgulamaktadır (Fitzpatrick ve ark 2005, Mack ve ark 2004).



Resim 3. *S. epidermidis*'te *icaADBC* lokusunun ekspresyonunu kontrol eden regülatör ağ

Staphylococcal accessory regulator (SarA)'de meydana gelen mutasyonlar hem *S. aureus* ve *S. epidermidis*'de biyofilm-negatif fenotip ile sonuçlanmaktadır. SarA *ica* transkripsiyonu ve PA/PIA üretimini pozitif yönde regüle etmektedir. *S. aureus* genomunda *sarA*'ya homolog *sarR*, *sarT*, *sarU*, *sarS* ve *rot* genleri identifiye edilmiş ve bu genlerin büyük bir kısmının SarA regülatör basamaklarına dahil olduğu ve bu nedenle de biyofilm formasyonu üzerine bir etkisi olabileceği bildirilmiştir. SarA'ın staphylococcal accessory gene regulator (Agr) sistemi de dahil 100'den fazla genin ekspresyonunu etkilediği düşünüldüğünde, antibakteriyel ajanlar için önemli bir hedef olabilir. Çünkü, SarA'ın aktivitesinin inhibisyonu eş zamanlı olarak ekstrasellüler toksin üretimi ve biyofilm formasyonunu kontrol etmektedir. Bununla birlikte, stafilokoklarda quorum-sensing (QS) sistemini kodlayan *agr* lokusunun engellenmesi artmış biyofilm gelişimi ile ilişkilidir. Agr sisteminin aktivasyonu bu nedenle biyofilmden parçaların ayrılmasına ve sekonder infeksiyon alanlarına metastatik yayılımına katkıda bulunabilir. Bu nedenle, SarA ailesinin kompleks yapısı ve Agr

sistemi ile interaksyonu terapötik uygulamalardan önce tam olarak aydınlatılmalıdır (Fitzpatrick ve ark 2005).

2.10.4. Hastalık Patogenezisinde Biyofilm Formasyonunun Önemi

Bakteriyel biyofilmler insanlarda çok farklı infeksiyonlara neden olmaktadır (Costerton ve ark.1999). İnsanlarda kateter gibi implante medikal cihaz taşıyan ve immun yetmezliği olan bireyler biyofilm infeksiyonları için önemli bir risk grubu olarak kabul edilmektedir (Clutterback ve ark 2007). Bu nedenle kateterlerdeki biyofilmleri elimine etmeye yardımcı yeni metodlar geliştirilmiştir. Çünkü bir yüzeye bağlı olarak üreyen bakteriler biyofilm içinde üreyerek korunmakta ve biyofilm antijenlerine karşı üretilen antikorlar biyofilmden ayrılan planktonik hücreleri elimine etmesine rağmen biyofilm içindeki bakterilere ulaşamamakta ve bunun yerine çevre dokulara zarar vermektedir (Costerton ve ark 1999). Benzer şekilde antibiyotik tedavi biyofilmleri eradike etmede yetersiz kalmakta ve planktonik hücreleri öldürerek sadece infeksiyonların semptomlarını baskılamaktadır (Clutterback ve ark 2007). Bunun sonucunda infeksiyonlar yıllarca persiste olmakta ve her antibiyotik tedavisinden sonra tekrarlayan semptomlar ortaya çıkmaktadır (Costerton ve ark 1999). İnfeksiyonlara neden olmasının yanı sıra implante kateterlerin lumenini tıkayarak sağlık problemlerine de neden olmaktadır. Ayrıca iyileşmeyen infekte yaralarla ilişkili olarak biyofilm klinik olarak önemli role sahiptir (Clutterback ve ark 2007).

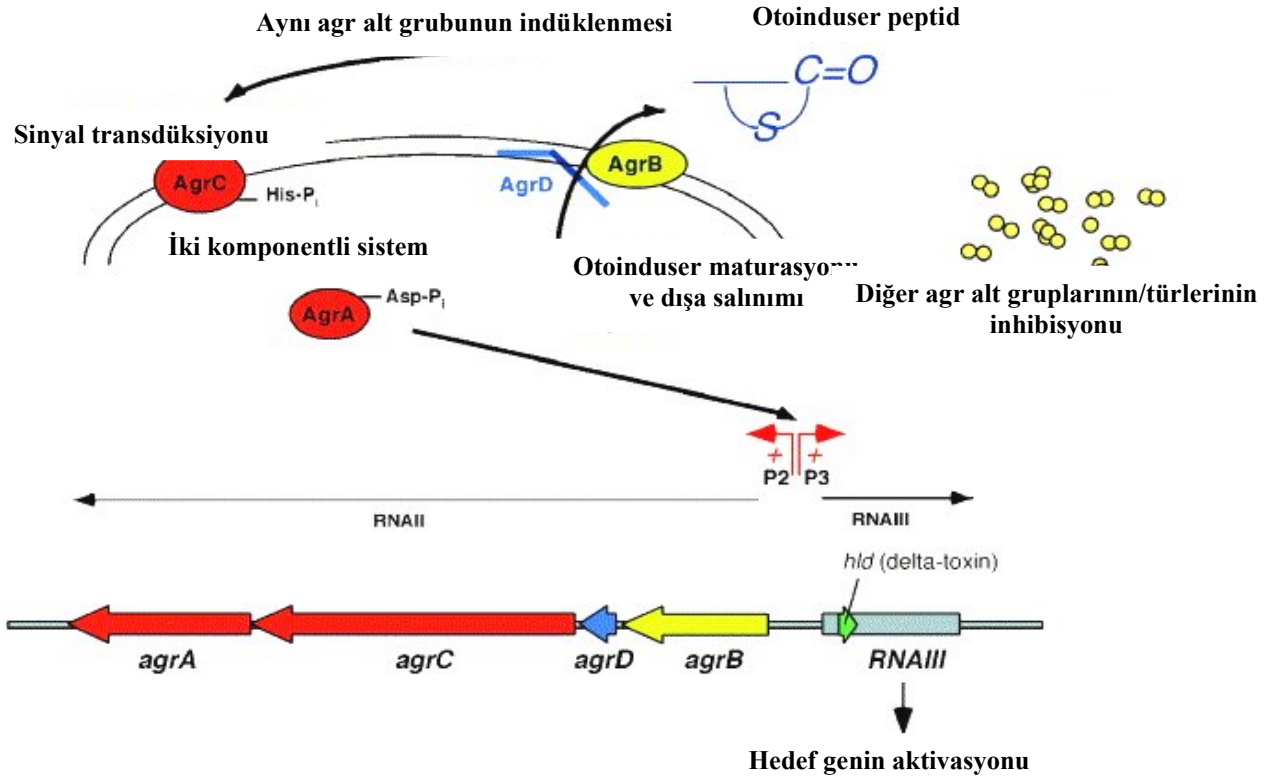
2.10.5. Stafilokoklarda hücrelerarası iletişim (Quorum-Sensing) sistemi

Bir infeksiyonu oluşturmak için bakteriler patojenitelerini belirleyen virulens faktörlerinin ekspresyonunu iyi organize etmek zorundadır. Tür spesifik virulens faktörlerinin koordinasyonu patojenin yaşaması ve konağa invazyonu için oldukça

önemlidir. Bu nedenle patojenler, infeksiyon sırasında değişen çevresel koşullara virulens genlerinin ekspresyonunu adapte etmek için kompleks regülatör sistemler geliştirmişlerdir (Kong ve ark 2006). Türler arası veya türler içi iletişim olarak tanımlanan quorum sensing (QS), virulens, intraselluler üreme ve biyofilm formasyonu ile ilişkili biyolojik öneme sahip bir fenomendir (Harraghy ve ark 2007). QS sistemlerinin sinyalleri auto inducer (AI) olarak adlandırılan küçük moleküllerdir. Düşük bakteri popülasyonunun mevcudiyetinde AI'ler düşük konsantrasyondadır. Hücreler belirli bir popülasyon yoğunluğuna ulaştığında transkripsiyonel regülatörün aktivasyonu sonucu AI'ler bir eşik konsantrasyon değerine kadar birikir. Bu transkripsiyonel faktör sırasıyla bir seri virulans faktörlerini de içeren değişik genlerin ekspresyonunu regüle eder (Kong ve ark 2006).

Gram pozitif bakterilerde yapısal olarak farklı peptid bazlı AI'lere sahip çok sayıda QS sistemi tanımlanmıştır. Gram pozitif bakterilerin AI'leri genellikle membranda lokalize olmuş bir proteine bağlanmak suretiyle etkinlik göstermektedir (Lyon ve Novick 2004).

Stafilokoklarda en önemli ve iyi karakterize edilmiş QS sistemi accessory gen regulator (*agr*) sistemidir (Resim 4). *Agr* sistemi *S. aureus*'un virulansı için önemlidir ve çok sayıda adhezin, enzim ve toksini kodlayan genler dahil 150 gen bu sistemin kontrolü altındadır. *Agr* sisteminin aktivasyonu virulans faktörlerinin aktivasyonu için kritik öneme sahiptir (Harraghy ve ark 2007). *Agr* sistemi farklı transkripsiyon mekanizmasına sahip RNAII ve RNAIII adlandırılan iki üniteden oluşmaktadır (Kong ve ark 2006, Harraghy ve ark 2007).



Resim 4. Stafilokokkal *agr* quorum-sensing sistemi (Kong ve ark 2006).

Bu sistemin AI'sı 8 amino asit uzunluğunda bir peptiddir. Farklı stafilokok türlerindeki AI'ler farklı amino asit sekansına ve tipik halka yapısına sahiptir (Otto ve ark 1999). Stafilokokkal AI'ler bir transmembran proteini olan ve iki komponentten oluşan regülatör sistem kinaz sensörü olarak hareket eden AgrC'ye bağlanır. Bu bağlanma regülatör AgrA'yı aktive eder ve sırasıyla RNAII ve RNAIII'ün transkripsiyonunu indükler.

Stafilokoklarda bulunan diğer QS sistemi LuxS'dir. *luxS* geni *S. aureus*'ta AI-2 üretimine neden olmaktadır. Bu genin izogenik mutanı *S. epidermidis*'de de gösterilmiş ve bu genin *S. epidermidis*'de fonksiyonel olduğu, *agr* lokusuna benzer şekilde biyofilm oluşumu üzerine etki gösterdiği tespit edilmiştir. *luxS* mutant suşların daha kalın ve kompakt biyofilm oluşturduğu, deneme hayvanlarında ise venöz kateter

uygulamasını takiben daha başarılı kolonize olduğu gösterilmiştir (Kang ve ark. 2006, O'Gara 2007). Ancak, *agr* sisteminin etki mekanizmasının aksine *luxS* biyofilm formasyonunu *ica* gen lokusunun transkripsiyonel regülasyonu ile sağlamaktadır (Kang ve ark. 2006).

2.10.6. Biyofilm oluşumunda *agr* sisteminin rolü

Biyofilm oluşumu tutunma, hücre-hücre adhezyonu ve proliferasyon, olgunlaşma ve ayrılma gibi farklı aşamaları içermektedir (Otto 2004). Stafilocoklarda QS sistemi, biyofilm oluşumunu bu aşamalarda etkilemektedir. Bir yüzeye adhezyon serbest planktonik hücrelerin biyofilm oluşturmalarında önemli bir geçiş aşamasıdır ve çok sayıda adhezyon molekülünün etkileşimi ile gerçekleşir. *Agr* sisteminin fonksiyonel olmaması polisistren yüzeylere stafilocokların tutunmasını sağlar. Bu durum muhtemelen adhezyon moleküllerinin olumlu yönde regülasyonu ve biyofilmden ayrılmayı sağlayan moleküllerin negatif regülasyonu ile sağlanmaktadır (Vuong ve ark. 2000).

Bakteri birkez tutunduktan sonra, bakteriler slime içinde çoğalmaya başlar ve çok tabakalı hücre yapısı oluşturur. Hücrelerin birbirine adhezyonu bu fazın belirleyici faktörü olarak kabul edilmektedir. Stafilocoklarda intersellüler adhezyon, polisakkarit intersellüler adhezin (PIA) adlandırılan bir ekzopolisakkariti içermektedir (Heilmann ve ark.1997). Ancak, PIA üretimi *agr* sistemi tarafından regüle edilmemektedir. İlginç olarak *luxS S. epidermidis* PIA üretimine neden olmamaktadır (Kong ve ark 2006). Biyofilm olgunlaşırken küçük hücre kümeleri olgun biyofilmden kopar. Ayrılan hücreler uzak bölgelere yayılır. Bu nedenle biyofilmden parçaların ayrılması muhtemelen biyofilm ilişkili infeksiyonun yayılması için temel öneme sahiptir. Ayrılma aşamasında *agr* sisteminin kontrolü önemli rol oynamaktadır. *agr* mutant suşlarının daha kalın biyofilm oluşturmaları, bu nedenle, hücrelerin çoğalma ve

ölümlerine bağlı olmayıp, olgun biyofilmden hücrelerin ayrılamamasına bağlanmaktadır. Olgun biyofilmden hücrelerin ayrılamaması muhtemelen *agr* mutantlarındaki bir grup küçük peptidin üretiminin durmasından kaynaklanmaktadır. Phenol-soluble modulün (PSM) olarak bilinen bu amfipatik peptidler *agr*-bağımlı olarak üretilmektedir. *S. aureus* ve *S. epidermidis* suşları, RNA III tarafından kodlanan delta toksini de içeren bir grup spesifik PSM'ye sahiptir. Bu peptidlerin amfipatik yapısı büyük olasılıkla biyofilmden bakteri hücre gruplarının ayrılmasını kolaylaştırmaktadır (Kong ve ark 2006).

2.10.7. Biyofilme karşı konak immun sistemin yanıtı

Biyofilm matriksinin antifagositik özellikleri fagositik hücrelerin biyofilm içindeki bakterileri fagosite etmesini ve öldürmesini zorlaştırmaktadır. Lökositlerin *S. aureus* biyofilmine penetre olabildiği fakat bakterileri fagosite edemediği gösterilmiştir (Clutterback ve ark 2007).

Çok sayıda faktörün konak immun sisteminin biyofilmleri eradike edememesine neden olduğu düşünülmektedir. Matriks polisakkaritleri konak savunma mekanizmalarına mani olmaktadır. *S. epidermidis* tarafından üretilen ekstrasellüler polimerik substans makrofajların fagositik aktivitesine mani olmaktadır. Kronik kistik fibrozisli hastalarda opsonik antikorların fagositoza katkı sağlamadığı ve komplementin bağlanmasını engellemek suretiyle çoğalan bakteri hücrelerini elimine edemediği saptanmıştır (Clutterback ve ark 2007).

Biyofilmlerin, aynı suşun planktonik hücreleri ile karşılaştırıldığında konak immun yanıtı üzerine farklı etkiler oluşturduğu gösterilmiştir. PMNL'ler tarafından respiratorik yıkımın başlatılması planktonik hücrelerin aksine biyofilmler tarafından stimüle edilen hücreler tarafından azaltılmaktadır. Komplement sisteminin aktivasyonu

ve buna bağlı olarak indirekt fagositozun stimölasyonu bakteri bir biyofilm içinde bulunduğunda azalmaktadır. Diğer bir ifade ile komplement sisteminin aktivasyonu bakteriler biyofilm içinde olduklarında planktonik hücreler ile karşılaştırıldığında optimal düzeyin altında gerçekleşmektedir (Clutterback ve ark 2007).

Konak immun savunmasına direnç, çevreden mikrobiyal olmayan partiküllerle etkileşim sonucunda da gerçekleşebilmektedir. Bu durum biyofilmin yapısını etkilemekte aynı zamanda da konak savunma mekanizmalarından da korumaktadır. İnsanlarda doğal kalp kapakçıkları üzerindeki biyofilmler bu tip etkileşim örnek olarak verilebilir. Bu biyofilmler içinde bakteriyal mikrokolonileri saran fibrin bakterileri lökositlerden korur ve infektif endokarditise neden olur. Biyofilmlerden serbest kalan mikroorganizmaların konak immun yanıtından kaçtığı ve enfeksiyona neden olduğu bildirilmiştir (Clutterback ve ark. 2007).

Biyofilm içindeki tekrar süspense edilip vücuda verildiğinde *in vitro* PMNL'lerin öldürücü etkisine daha az duyarlı olduğu ve bunun nedeni olarak ise PMNL'ler tarafından üretilen aktif oksijen radikallerine biyofilm içindeki bakterilerin dirençli olması gösterilmiştir. Bu durum vücuda implante edilmiş medikal cihazlardaki biyofilmlerden ayrılan hücrelerin kan dolaşımındaki PMNL'lerin fagositik etkisine direnç gösterebileceği ve kanda bir enfeksiyon başlatabileceğini göstermektedir. Planktonik hücrelerin biyofilmdeki sessil hücrelerin aksine spesifik toksin ve proteazların sentezini artırdığını ve bu nedenle de konak savunma mekanizmalarını aşarak sepsis gibi akut enfeksiyonlara daha sık neden olduğu belirtilmiştir (Clutterback ve ark. 2007).

2.10.8. Antimikrobiyal ajanlara biyofilm direnci

Biyofilm içinde çoğalan bakterilerin aynı suşa ait planktonik bakterilerle karşılaştırıldığında antimikrobiyal ajanların çok yüksek konsantrasyonlarda duyarlı olduğu gösterilmiştir (Olson ve ark 2002, Amorena ve ark 1999, Ceri ve ark 1999). Biyofilm içindeki bakterilerin direncinde bilinen antibiyotik direnç mekanizmaları (effluks pompası, enzim modifikasyonu ve hedef mutasyonu) rol oynamaz. Biyofilmin antimikrobiyal ajanlara direncinden sorumlu olan 3 ana mekanizma bildirilmiştir (Mah TFC ve O'Toole GA 2001, Gilbert ve ark 1997, Stewart 2002)

Bu mekanizmalardan ilki antibiyotiklerin biyofilme penetre olamamasıdır. Ekzopolisakkarit matriksin üretimi biyofilmlerin ayırıcı karakterlerinden biridir. Bu matriks antibiyotiklerin biyofilm içindeki bakterilere difüzyonunu engeller. Antibiyotiklerin matriks ile reaksiyonu veya biyofilm matriks komponentleri tarafından adsorbsiyonu biyofilm içine antibakteriyel ajanın transportunu sınırlandırabilir (Stewart 1996). Anderl ve ark. (2000), *Klebsiella pneumonia* tarafından oluşturulan biyofilme ampisilinin penetre olamadığını hatta biyofilm içinde çoğalan beta-laktamaz geni yönünden mutant *K. pneumonia* suşlarının bile ampisiline dirençli olduğunu göstermiştir.

Biyofilmin antimikrobiyal ajanlara karşı bir bariyer olup olmadığını belirlemeye yönelik yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* biyofilminin piperasilinin difüzyonunu engellediği, *S. epidermidis* biyofilminin ise rifampisin ve vankomisin difüzyonuna izin verdiği ve bu antibiyotiklerin etkin şekilde biyofilme penetre olabildiği gösterilmiştir. *K. pneumoniae* tarafından oluşturulan biyofilme ampisilinin penetre olamadığı hatta biyofilm içinde çoğalan *K. pneumonia* beta-laktamaz mutantlarının bile ampisiline dirençli olduğu gösterilmiştir. Biyofilm

kalınlığı ve antibiyotiklere direnç arasında lineer bir korelasyon olduğu gözlenmiştir (Melchior ve ark 2006).

Bu sonuçlar, ekzopolisakkarid matriksin antimikrobiyal ajanların difüzyonuna karşı tam bir engel oluşturmadığını ve farklı mekanizmaların da biyofilmdeki bakterilerin antimikrobiyal direncine katkı sağladığını göstermektedir.

Biyofilmlerin antimikrobiyal direncinde üçüncü mekanizma biyofilmdeki mikroorganizmaların yavaş büyüme fazına girmeleridir. Bakteriler ihtiyaç duydukları besin maddelerini ortamda bulamadıklarında üremeleri yavaşlar ve aktif üreme fazının yavaşladığı veya üremenin olmadığı forma geçerler (Costerton ve ark 1999). Bu durum, biyofilmlerde antibiyotiklerin bakterisidal etkilerini göstermeleri için ihtiyaç duydukları aktif üreme gösteren bakterilerin sayısının azalmasına ve sınırlı etki göstermesine neden olmaktadır. Örneğin penisilin ve sefalosporinlerin aktif üremeyen bakteriler üzerine etkisi yoktur ve bakterileri öldürme oranı üreme oranı ile orantılıdır. Aminoglikozidler ve fluorokinolonlar dahil farklı sınıfa ait antibiyotikler bölünmeyen hücreleri öldürebilmekle birlikte hızlı bölünen hücrelere çok daha etkilidir (Stewart 2002).

Biyofilmlerin antimikrobiyal direncinde üçüncü mekanizma biyofilmdeki değişmiş kimyasal ortam ve persiste hücrelerdir. Biyofilmlerde üremeyi sınırlandıran kimyasal yapılar antibiyotik potensini de değiştirebilmektedir. Örneğin tek başına biyofilmdeki oksijen konsantrasyonu aminoglikozidlerin etkinliğini sınırlandırabilir. Biyofilmin anaerobik bölümünde bulunan bakteriler fermentatif özellikte olsalar bile bu antibiyotiklerin etkisinden korunabilmektedir. Benzer şekilde biyofilmdeki pH değişimleri de antibiyotik etkinliği üzerine olumsuz etki göstermektedir (Melchior ve ark 2006).

Biyofilmlerdeki bakteriler sadece antibiyotikler tarafından öldürülmeye değil klorin ve glutaraldehid gibi kimyasal dezenfektanlara da direnç göstermektedir. Biyofilmdeki persiste hücre subpopulasyonu geniş antibiyotik direncinden sorumlu tutulmaktadır. Persiste hücre populasyonu oldukça korunmuş spor benzeri bir yapı özelliği göstermektedir. Uzun süreli antibiyotik tedavisi sonrasında biyofilmdeki bakteri populasyonun büyük bir kısmı ölmesine rağmen küçük bir bakteri populasyonu etkilenmeden kalmaktadır. Çok ince biyofilmlerde bile bakterilerin antibiyotiklere düşük duyarlılık geliştirmeleri persiste hücreler ile açıklanmaktadır (Stewart 2002).

Biyofilm içindeki *P. aeruginosa*'nın ofloksasin ve siprofloksasin gibi fluorokinolon antibiyotikler ile doza bağımlı öldürülmesine yönelik yapılan bir çalışmada planktonik hücreleri öldüren dozların biyofilmdeki hücrelerin çoğunluğunu öldürdüğünü, ancak bakteri sayısındaki 3-4 logaritmiklik ilk azalmadan sonra antibiyotik konsantrasyonundaki artışın öldürme oranını değiştirmedini göstermiştir. Bu çalışma fluorokinolonların uygulanmasından sonra bile küçük bir persiste hücre fraksiyonunun kaldığını göstermiştir (Melchior ve ark 2006). Persiste hücrelerin bakteriyel populasyonun canlılığını devam ettirmesinden sorumlu olduğu kabul edilmektedir ve persiste hücrelerdeki fizyolojik değişikliklerin biyofilmlerin canlılıklarını sürdürmesinde anahtar rol oynadığına inanılmaktadır. Genel olarak, biyofilmden uzaklaştırılan bakteriler aynı türün primer planktonik hücreleri kadar duyarlıdır (Ceri ve ark 1999)

2.10.9. Biyofilm ve mastitis

S. aureus'un meme bezi epiteline adhezyonu mastitisin patogeneziinde kritik bir adım olarak kabul edilmektedir. Mastitise neden olan *S. aureus* suşlarının çoğunluğu meme bezi epiteline etkenin adhezyon ve kolonizasyonuna yardımcı olan bir

slime tabakası ile çevrilidir (Vasudevan ve ark 2003). *S. aureus*'un neden olduğu akut ve kronik mastitis infeksiyonlarının mikroskopik incelenmesi bakterilerin epitelyum hücresi, meme alveolleri ve laktiferöz kanallar içinde kümeler halinde lokalize olduğunu ve interstisyel dokuyu invaze ettiğini göstermiştir. Bu bakteriyel kümeler patojen ile maruziyetten 24 saat sonra görülmektedir (Melchior ve ark 2006).

Sığır mastitislerinden izole edilen *S. aureus* suşlarında *ica* lokusunun varlığı ve yaygınlığı ortaya konulmuştur. Ancak, *ica* lokusuna sahip tüm izolatların spesifik kültür koşullarına bağlı olarak *in vitro* yöntemlerle (Congo Red Agar, Mikropleyt Yöntemi ve Standart Tüp Yöntemi) slime oluşturmadığı belirlenmiştir (Vasudevan ve ark 2003).

Epidemiyolojik çalışmalar *S. aureus* izolatlarının *in vitro* antimikrobiyal duyarlılıkları ve antimikrobiyal tedavi sonrası iyileşme oranları arasında düşük bir korelasyon olduğunu göstermiştir (Sol ve ark 2000). *S. aureus* mastitislerinin tedavisinde direncin biyofilm formasyonu ile açıklamaya yönelik farklı hipotezler ortaya konulmuş, biyofilm içinde çoğalan bakterilerin serbest halde bulunan aynı orijinli bakterilere göre antimikrobiyal ajanlara 10-1000 kat daha dirençli olduğu gösterilmiştir (Olsen ve ark 2002, Amorena ve ark 1999, Ceri ve ark 1999). İnek mastitislerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarından biyofilm formasyonu ile ilişkili *ica* lokusunun yüksek sıklıkla bulunması (Vasudevan ve ark. 2003), biyofilm formasyonunun *S. aureus* mastitislerinin tedaviye direnç göstermesinin nedeni olabileceği hipotezine neden olmuştur (Melchior ve ark 2006).

Meme bezindeki fizyolojik değişiklikler bakteriyel gen ekspresyonunda değişikliklere ve virulans genlerinin ekspresyonuna, patojenlerin üreme fazına geçmesine ve yayılmasına da neden olmaktadır. Bu durum yangıya ve hastalığın klinik belirtilerinin ortaya çıkması ile sonuçlanmaktadır. Faz varyasyonuna neden olan

mekanizmaların ve biyofilm oluşumunun tam olarak ortaya konulması, ileride tedaviye yönelik yeni konseptlerin ortaya çıkmasına neden olacak ve terapötik yaklaşımların etkinliğini artıracaktır (Melchior ve ark 2006).

Bu çalışmada, 127 *S. aureus* ve 65 KNS suşunun biyofilm oluşturma yeteneğinin üç farklı yöntem kullanılarak araştırılması, biyofilm pozitif ve negatif stafilokokların farklı antibiyotiklere karşı olan dirençliliklerinin değerlendirilmesi amaçlandı.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Bakteri Suşları

Çalışmada subklinik inek mastitislerinden izole edilen 127'si *Staphylococcus aureus* ve 65'i KNS olmak üzere toplam 192 stafilokok suşu kullanıldı.

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

Blood Agar (Merck, 1.10886.0500)

Nutrient Substrate	20 g
Agar	15 g
NaCl	5 g

Blood Agar besiyerinden 40 g tartılıp 1 L distile suda eritildikten sonra otoklavda 121 °C'de 15 dk sterilize edildi. Daha sonra besiyeri yaklaşık 50 °C'ye kadar soğutuldu ve % 7 oranında defibrine koyun kanı ilave edilip karıştırıldıktan sonra steril petrilere döküldü.

Mueller Hinton Agar (Merck, 1.10293.0500)

Meat infusion	2,0 g
Casein hydrolysate	17,5 g
Starch	1,5 g
Agar	13,0 g

Mueller Hinton Agar'dan 34 g tartılıp 1 L distile suda eritildikten sonra otoklavda 121 °C'de 15 dakika tutularak sterilize edildi. Yaklaşık 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere 4-5 mm kalınlıkta olacak şekilde döküldü.

Tryptic Soy Broth (TSA) (Merck, 1.05459)

Peptone from casein	17 g
Pepton from soymeal	15 g
K ₂ HPO ₄	2.5 g
Glucose	2.5 g
NaCl	5 g

Tryptic Soy Broth'dan 30 g tartılıp 1 L distile suda eritildikten sonra tüplere 10 ml taksim edildikten sonra otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi.

Brain Hearth Infusion Broth (BHIB) (Merck, 1.10493)

Calf brain infusion solids	12.5 g
Beef heart infusion solids	5 g
Proteose peptone	10 g
Glucose	2 g
Sodium chloride	5 g
Di-sodium phosphate	2.5 g

Congo Red Agar (CRA)'ın hazırlanmasında kullanıldı.

Congo Red Agar (CRA)

Brain Heart Infusion Broth	37 g
Sucrose	50 g
Congo Red	0,8 g
Agar	10 g

Freeman ve ark (1989) tarafından bildirilen metoda göre hazırlandı. Congo Red konsantre solusyon olarak hazırlandıktan sonra 121 °C'de 15 dakika ayrı olarak otoklavda sterilize edildi. Besiyeri 55 °C'ye kadar soğutulduktan sonra Congo Red ilave edildi ve iyice karıştırıldıktan sonra steril plastik petrilere döküldü.

Antibiyotik Diskleri

Çalışmada, penisilin G (Oxoid, 10 mcg), amoksisilin/klavulanik asid (Oxoid, 30 mcg/20 mcg), eritromisin (Oxoid, 15 mcg), tetrasiklin (Oxoid, 30 mcg), gentamisin (Oxoid, 10 mcg), ampisilin (Oxoid, 10 mcg), enrofloksasin (Oxoid, 5 mcg), vankomisin (Oxoid, 30 mcg) ve teikoplanin (Oxoid, 30 mcg) antibiyotik diskleri kullanıldı.

Fosfat Tamponlu Su (PBS)

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	1.41 g

Maddeler su içinde eritildikten sonra pH 7.2-7.4'e ayarlandı ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika tutularak sterilize edildi.

% 1'lik Safranin Solusyonu

Safranin	1 g
Distile su	100 ml

Safranin distile suda iyice eritilip 1 gün bekletildikten sonra filitre kâğıdından süzülerek koyu renkli şişelerde saklandı.

Hucker Crystal Violete

Crystal violete	2 g
Ammonium oxalat	0,8 g
Ethanol (% 95)	20 ml
Distile su	80 ml

Ammonium oxalat 20 ml distile suda ve crystal violete ethanol içinde ayrı ayrı eritildikten sonra karıştırılarak distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Oda ısısında bir gün bekledikten sonra filtre kâğıdından süzülerek koyun renkli şişede saklandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Biyofilm Üretiminin Fenotipik Olarak Belirlenmesi

İzolatların slime üretme yetenekleri üç farklı yöntem ile araştırıldı.

3.2.1.1. Congo Red Agar (CRA) Yöntemi İle Biyofilm Üretiminin Saptanması

Bakteri suşları CRA'a ekim yapıldıktan sonra 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda kuru kristalize siyah koloniler oluşturan suşlar biyofilm pozitif, kırmızı veya pembe renkli koloni oluşturan suşlar ise slime negatif olarak değerlendirildi.

3.2.1.2. Mikropleyt (MP) Yöntemi İle Biyofilm Üretiminin Saptanması

Stafilokok suşlarının kantitatif olarak slime üretimlerinin belirlenmesi Christensen ve ark (1985) tarafından tanımlanan spektrofotometrik yöntem ile yapıldı. TSB'da 37 °C'de 18 saat süreyle üretilen stafilokok suşları % 2 oranında glukoz içeren TSB ile 1/100 oranında sulandırıldıktan sonra steril düz tabanlı mikropleytin her bir gözüne 0.2 ml konularak 37 °C'de 18 saat aerobik olarak inkübe edildi. Sürenin sonunda mikropleytin her bir gözündeki sıvı aspire edilerek PBS ile dört kez yıkandı ve her bir göze 200 µl Hucker crystal violete boyası ilave edilerek oda sıcaklığında 45 dakika süre ile boyandı. Daha sonra kuyucuklar 3 kez distile su ile yıkandı ve mikropleyt kurutma kağıdı üzerinde ters çevrilerek kurutuldu. Mikropleyt kurutulduktan sonra 570 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda (VersaMax ELISA Reader, Amerika) optik dansiteleri belirlendi. Her suş için üç kez yapılarak okunan optik dansite değerlerinin aritmetik ortalamaları alındı. Steril TSB negatif kontrol olarak kullanıldı. Optik dansite değeri 0.240'tan büyük olan suşlar kuvvetli adheran, 0.120-0.240 olan suşlar adheran, 0.120 ve altında olan suşlar ise aderans negatif olarak değerlendirildi.

3.2.1.3. Standard Tüp (ST) Yöntemi İle Biyofilm Üretiminin Saptanması

Standard Tüp yöntemi Christensen ve ark (1985) tarafından bildirilen yöntemine göre yapıldı. Bu amaçla test edilecek stafilokok suşlarının kanlı agar'da üreyen saf kültüründen tek bir koloni alınarak içinde 5 ml % 0.25 glukoz içeren TSB besiyerine inokule edilerek 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tüp içerikleri boşaltılarak % 1'lik safranin solüsyonu ile oda ısısında 30 dakika bekletildi. Boya dökülerek tüpler steril PBS ile iki defa yıkandı ve ters çevrilerek kurutma kağıdı

üzerinde kurumaya bırakıldı. Ertesi gün tüpün iç yüzeyinde renkli bir film tabakasının oluşumu ve yoğunluğuna göre (+), (++) , (+++) veya (-) olarak değerlendirildi.

3.2.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi

Agar disk difüzyon testi Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2006) tarafından belirtilen kriterlere göre yapıldı ve değerlendirildi. Bu amaçla, test edilecek bakteri suşunun fizyolojik tuzlu su içinde Mac Farland 0.5 yoğunluğunda süspansiyonu yapıldı. Bakteri süspansiyonundan eküvyon yardımıyla Mueller-Hinton Agara ekim yapılarak antibiyotik diskleri steril bir şekilde yerleştirilerek 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Antibiyotik disklerin çevresindeki inhibisyon zonları milimetrik cetvel yardımıyla ölçülerek değerlendirildi.

3.2.3. İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen değerlerin istatistiksel analizleri SPSS 10.0 (Statistical Package for the Social Sciences) programı kullanıldı. Slime pozitif ve negatif suşların antibiyotiklere olan dirençlilikleri ile slime üretme yeteneklerini belirlemede kullanılan yöntemler arasındaki farklılıkların önem derecesini belirlemede Ki kare (χ^2) testi kullanıldı. Çalışmada bulunan $P < 0,05$ olasılık değerleri istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

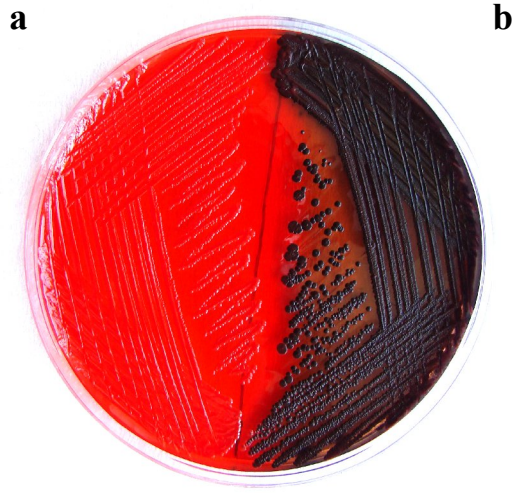
4. BULGULAR

4.1. Biyofilm Üretimi

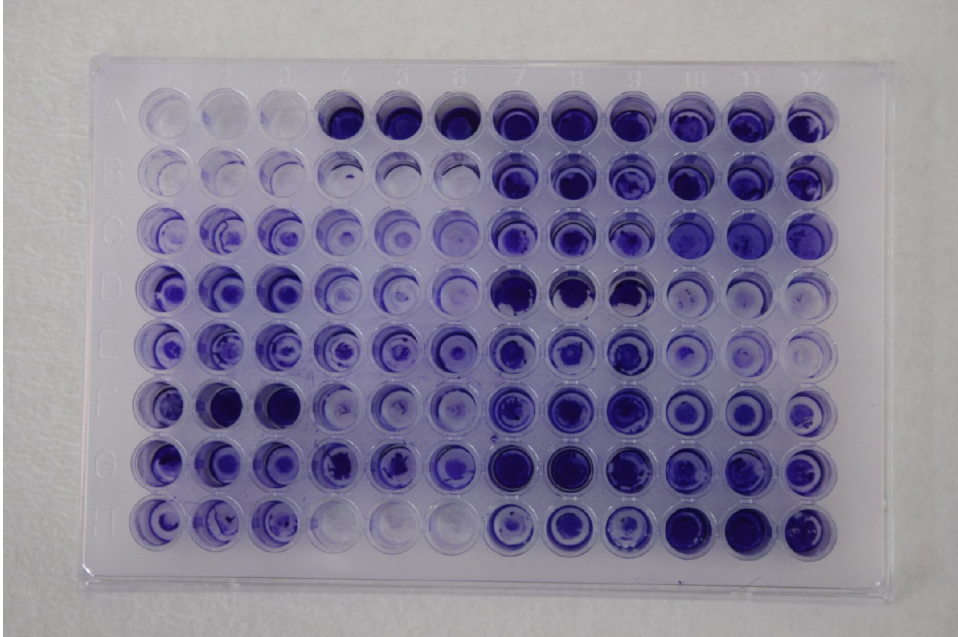
Stafilokok suşlarının CRA, MP ve ST yöntemleri ile biyofilm üretme yetenekleri Tablo 1’de sunulmuştur. İncelenen 127 *S.aureus* suşunun CRA, MP ve ST testleri ile sırasıyla %72.4’ü (92), %67,7’si (86) ve %62.9’u (80) 65 KNS suşunun ise %81.5’u (53), %73.3’ü (49) ve %72.3’ü (47) biyofilm üretimi yönünden pozitif bulundu (Resim 5, 6, 7). Suşların biyofilm üretimini belirlemede kullanılan üç yöntem arasında fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$).

Çizelge3.1. Stafilokok suşlarının farklı fenotipik yöntemlerle saptanan biyofilm üretme yetenekleri

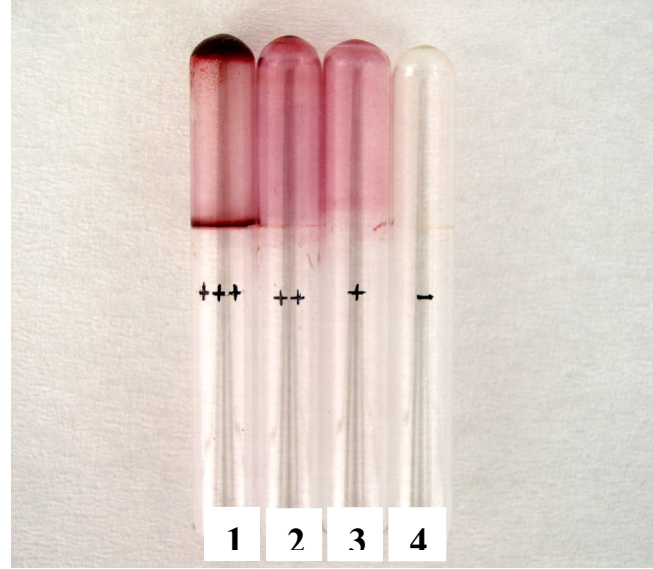
Test	<i>S. aureus</i> (=127)				KNS (=65)			
	Biyofilm Pozitif		Biyofilm Negatif		Biyofilm Pozitif		Biyofilm Negatif	
	N	%	N	%	n	%	n	%
CRA	92	72.4	35	27.6	53	81.5	12	18.5
MP	86	67.7	41	32.3	49	75.4	16	24.6
ST	80	63.0	47	37.0	47	72.3	18	27.7



Şekil 4.1. Biyofilm üretiminin Congo Red Agar yöntemi ile değerlendirilmesi
(a-biyofilm negatif, b-biyofilm pozitif)



Şekil 4.2. Biyofilm üretiminin mikroyeylet yöntemi ile değerlendirilmesi



Şekil 4.3. Biyofilm üretiminin standart tüp yöntemi ile değerlendirilmesi

1-Kuvvetli pozitif (+++), 2-Pozitif (++), 3-Pozitif (+), 4-Negatif (-)

MP yöntemi ile *S. aureus* suşlarının 39'u (%30.7) negatif, 48'i (%37.8) orta derecede aderans ve 40'ı (%31.5) kuvvetli aderans, KNS suşlarının ise 13'ü (%20) negatif, 44'ü (%67.7) orta derecede aderans ve 8'i (%12.3) kuvvetli aderans bulundu (Tablo 2).

Çizelge3.2. Mikropleyt yöntemi saptanan optik dansitelerine göre aderans değerleri

	Negatif		Orta Derecede Aderans		Kuvvetli Aderans	
	n	%	N	%	n	%
<i>S. aureus</i> (n: 127)	39	30.7	48	37.8	40	31.5
KNS (n: 65)	13	20	44	67.7	8	12.3
Toplam (n: 192)	52	27.1	92	47.9	48	25

4.2. Antibiyotik duyarlılıkları ve biyofilm oluşumu ile ilişkisi

Biyofilm pozitif (BP) ve negatif (BN) stafilokok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları Tablo 3'de sunulmuştur. SP ve SN stafilokok suşlarının tamamı vankomisin ve teikoplanine duyarlı bulundu. SP 145 stafilokok suşunun 107'si (%73.8) penisiline, 101'i (%69.7) ampisiline, 9'u (%6.2) amoksisilin-klavulanik aside, 30'u (%20.7) tetrasikline, 31'i (%21.4) eritromisine, 2'si (%1.4) gentamisine ve 1'i (%0.7) de enrofloksasine dirençli bulundu. SN 47 stafilokok suşunun ise 20'si (%42.6) penisiline, 11'i (%23.4) ampisiline, 2'si (%4.3) amoksisilin-klavulanik aside, 7'si (%14.9) tetrasikline ve 9'u (%19.1) eritromisine dirençli bulunurken, tamamı gentamisin ve enrofloksasine duyarlı bulundu. SP suşlarda penisilin, ampisilin ve eritromisine karşı saptanan direnç oranları SN suşlara göre yüksek bulunmuştur. Bu oranlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

Tablo 3. BP ve BN stafilokok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları

Antibiyotik	Biyofilm Pozitif		Biyofilm Negatif		Toplam Dirençli İzolat Sayısı		P
	<i>S. aureus</i> (=92)	KNS (=53)	<i>S. aureus</i> (=35)	KNS (=12)	BP (=145)	BN (=47)	
Penisilin	61 (%66.3)	43 (%81.1)	16 (%45.7)	4 (%33.3)	107 (% 73.8)	20 (%42.6)	0.03<
Ampisilin	57 (%61.9)	44 (%83.0)	8 (%22.9)	3 (%25.0)	101 (%69.7)	11 (%23.4)	0.001<
Amok-Klav. Asid	9 (%9.8)	0 (%0.0)	2 (%55.7)	0 (%0.0)	9 (%6.2)	2 (%4.3)	>0.05
Tetrasiklin	17 (%18.5)	13 (%24.5)	5 (%14.3)	2 (%16.7)	30 (%20.7)	7 (%14.9)	>0.05
Eritromisin	18 (%19.6)	13 (%24.5)	7 (%17.2)	2 (%16.7)	31 (%21.4)	9 (%19.1)	0.035<
Gentamisin	1 (%1.1)	1 (%1.9)	0 (%0.0)	0 (%0.0)	2 (%1.4)	0 (%0.0)	>0.05
Enrofloksasin	1 (%1.1)	0 (%0.0)	0 (%0.0)	0 (%0.0)	1 (%0.7)	0 (%0.0)	>0.05
Vankomisin	0 (%0.0)	0 (%0.0)	0 (%0.0)	0 (%0.0)	0 (%0.0)	0 (%0.0)	>0.05
Teikoplanin	0 (%0.0)	0 (%0.0)	0 (%0.0)	0 (%0.0)	0 (%0.0)	0 (%0.0)	>0.05

5. TARTIŞMA

Hayvan sağlığını ve refahını olumsuz yönde etkileyen mastitis, süt veriminde azalma, artan tedavi giderleri, yüksek kesime sevk edilme oranı ve hatta ölümler nedeniyle süt sığıru yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Barkema ve ark 2006).

Stafilokokların sahip oldukları ekzotoksinler ve yüzey proteinleri yanında, biyofilm üretiminin de artan oranda önemli bir virulens faktörü olduğu vurgulanmaktadır (Melchior ve ark 2006, Kavaoli ve ark 2005, Fox ve ark 2005, Vasudevan ve ark 2003, Cucarella ve ark 2002). Biyofilm meme bezi epitelyumuna stafilokokların aderansını ve kolonizasyonunu kolaylaştırdığı gibi, immün sistemin savunma mekanizmalarından stafilokokların kurtulmasına ve sıklıkla da kalıcı infeksiyonlar oluşturmasına yardımcı olmaktadır (Cucarella ve ark 2001, Baselga ve ark 1993).

Oliveira ve ark.(2006) subklinik inek mastitislerinden izole ettikleri 16 *S. aureus* suşunun CRA yöntemi ile 6 (%37.5)'sını, MP yöntemi ile 3 (%18.75)'ünü, 16 *S. epidermidis* suşunun 6 (%37.5)'sını ise hem CRA hem de MP yöntemi ile biyofilm oluşturma yetenekleri yönünden pozitif bulmuşlardır. Türkyılmaz ve ark. (2006), çeşitli hayvansal klinik örneklerden izole edilen 180 stafilokok (90 KPS ve 90 KNS) suşunun biyofilm oluşturma yeteneklerini CRA, MP ve ST yöntemleri ile araştırmışlar ve sırasıyla KPS'lerde %77.7, %74.4 ve %66.6, KNS'lerde ise %44.4, %36.6 ve % 34.4 oranında pozitiflik saptamışlardır. Vasudevan ve ark. (2003) mastitisli inek sütlerinden izole edilen 35 *S. aureus* suşunun CRA yöntemi ile 32 (%91.4)'sini ve MP yöntemi ile 24 (%68.6)'ünü biyofilm üretimi yönünden pozitif bulmuşlardır. Fox ve ark. (2005) 117'si inek sütünden, 70'i meme kanalı derisinden ve 34'ü sağım makinelerinden olmak üzere toplam 221 *S. aureus* izolatının biyofilm oluşturma yeteneğini MP yöntemi ile araştırmışlardır. Araştırmacılar, süt örneklerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının %41.4'ünü, meme başı derisinden izole edilen izolatların

%24.7'ünü ve süt sağım makinelerinden izole edilen izolatların ise %14.7'ni biyofilm üretimi yönünden pozitif bulmuşlardır. Bu çalışmada CRA, MP ve ST yöntemleri ile *S. aureus* suşlarında saptanan %72.4, %67.7 ve %63.0 oranındaki biyofilm pozitifliği Türkyılmaz ve ark (2006) ile Vasudevan ve ark. (2003) tarafından bildirilen bildirimlerden düşük, diğer araştırmacıların bildirimlerinden yüksek, KNS suşlarında saptanan %81.5, % 754 ve %72.3 oranındaki biyofilm pozitifliği ise yukarıdaki bildirimlerden yüksek bulunmuştur.

Stafilokoklarda biyofilm üretiminin tespit edilmesinde CRA yönteminin çok daha spesifik olduğu bildirilmiştir. Vasudevan ve ark (2003), *icaA* ve *icaD* genleri yönünden pozitif olan 35 *S. aureus* suşunun 32'inde CRA yöntemi ile pozitiflik saptarken MP yöntemi 24'ünde pozitiflik saptamışlardır. Oliveira ve ark (2006) 16 *S. aureus* suşunu biyofilm üretimi yönünden CRA, ST ve FISH (fluorescent *in situ* hybridization) yöntemleri ile araştırmışlar ve MP ile %18.75'ini, %37.5'ini ise hem CRA yöntemi hem de FISH yöntemi ile pozitif sonuç verdiğini saptamışlardır. Araştırmacılar FISH ve CRA yöntemleri arasında yüksek uyum olduğunu (Kappa=1) belirtmişlerdir. Bu çalışmada CRA yöntemi ile *S. aureus* suşlarının biyofilm oluşturma yetenekleri %72.4 (92) ve KNS suşlarının ise %81.5 (53) olarak bulundu. Ancak, stafilokokların biyofilm oluşturma yeteneklerini belirlemede kullanılan metodlar arasında istatistiksel olarak önemli farklılık bulunmadı ($p>0.05$).

Çalışmamızda MP ve CRA yöntemleri ile karşılaştırıldığında ST yöntemi ile düşük pozitiflik saptandı. Bu durum, zayıf biyofilm üreten suşların ST ile değerlendirilmesinin zor olmasına ve bu tekniğe aşına olmayan araştırmacılar tarafından sonuçlarının yorumlanmasındaki güçlüğü bağlanabilir (Christensen ve ark 1985).

Biyofilm formasyonunun fenotipik ekspresyonu *in vitro* koşullara oldukça duyarlıdır (Oliveira ve ark 2006, Christensen ve ark 1987, Baselga ve ark 1983). Vasudevan ve ark (2003), CRA veya MP yönteminde biyofilm formasyonunun *in vitro* koşullara duyarlı olabileceğini, farklı fenotipik yöntemlerin ve genotipik metodların birlikte kullanılması

gerekliliğini vurgulamışlardır. Bu nedenle, araştırmacılar biyofilm formasyonu yönünden genotipik pozitif fakat fenotipik negatif suşların doğru bir şekilde tespit edilmesi için farklı metodların birlikte kullanılmasını önermişlerdir (Arciola ve ark 2006, Fox ve ark 2005, Vasudevan ve ark 2003).

Biyofilm içinde üreyen bakterilerin *in vitro* antimikrobiyal ajanlara aynı suşun planktonik formlarına göre daha dirençli olduğu gösterilmiştir (Şahin 2007, Melchior ve ark 2006, Olson ve ark 2002, Amorena ve ark 1999, Ceri ve ark 1999). Bilinen direnç mekanizmalarının dışındaki mekanizmalarla gerçekleşen bu tarz direnç, antibiyotiklerin biyofilm içine difüzyonunun azalması, biyofilm içinde bakterilerin yavaş üreme hızları ve biofilm içindeki değişen çevresel koşullara bağlı olarak gerçekleşmektedir. Bu durum tedavi sonrası tekrarlayan infeksiyonların görülmesine ve etkenin vücut içinde yayılmasına neden olmaktadır. Türkyılmaz ve Eskiizmirli (2006), inceledikleri stafilokok suşlarında en yüksek direnç oranını penisilin (BP: %49, BN: %42.6), metisilin (BP: %24.5, BN: %15.7) ampisilin (BP: %23.6, BN: %14.2) ve gentamisine (BP: %13.6, BN: %12.9) karşı saptarken tüm izolatları vankomisine duyarlı bulmuşlardır. Araştırmacılar çalışmada kullanılan antibiyotiklere SP suşların daha yüksek direnç gösterdiğini saptamışlardır. Şahin (2007), güçlü biyofilm oluşturan 8 klinik *S. aureus* suşu ile 5 kontrol suşunun vankomisin, linezolid, dalfopristin, quinopristin ve dalfopristin-quinopristine olan minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri ve biyofilm oluşturmuş suşlar üzerine etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar biyofilm bakterilerinin planktonik bakterilere oranla 8-1280 kat daha fazla dirençli olduğunu, biyofilm oluşturmuş bakterilerin inhibisyon ve eradikasyonunun güç olduğunu ve antibiyotiklerin MİK değerlerinin çok daha üstünde dozlarda kullanılması gerekliliğini vurgulamışlardır. Yıldırım (2003), çeşitli klinik materyallerden izole ettiği 90 KNS suşunun antibiyotiklere karşı dirençlilik oranını BP suşlarda, BN suşlara göre istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte yüksek bulmuştur. Bu çalışmada da BP suşlarda daha yüksek

antibiyotik direnci saptandı. BP suşlarda penisilin, ampisilin ve eritromisine karşı saptanan direnç oranı BN suşlarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$).

6. SONUÇ

Sonuç olarak subklinik inek mastitislerinden izole edilen stafilocok suşlarının yüksek oranda biyofilm ürettiği, biyofilm oluşumunun stafilocok infeksiyonlarında önemli bir virulans faktörü olduğu, CRA yönteminin biyofilm oluşturan stafilocok suşlarını saptamada pratik ve güvenilir olduğu ve biyofilm oluşturan stafilocok suşlarının neden olduğu mastitis vakalarının tedavisinde alternatif antibiyotik seçeneklerinin kullanılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. **Akan M (2006)**, *Staphylococcus infeksiyonları*. Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). Ed. Nejat Aydın, Jale Paracıoğlu. İlke Emek Yayınları, Ankara.
2. **Akay Ö ve Aydın N (1984)**, *Stafilokokal Mastitisler*. I. Mastitis Semineri, Ankara.
3. **Amorena B, Gracia E, Monzon M, Leiva J, Oteiza C, Perez M, Alabart JL, Hernandez-Yago J (1999)**: *Antibiotic susceptibility assay for Staphylococcus aureus in biofilms developed in vitro*. J Antimicrob Chemother, 44, 43-55.
4. **Anderl JN, Franklin MJ, Stewart PS (2000)**: *Role of antibiotic penetration limitation in Klebsiella pneumoniae biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin*. Antimicrob Agents Chemotherapy, 44, 1251-1256.
5. **Arda H, Minbay A, Leloğlu N, Aydın N, Kahraman M, Akay Ö, Ilgaz A, İzgür M, Diker KS (1997)**, Özel Mikrobiyoloji 4.Baskı, Ankara: Medisan Yayın Serisi No:26, 1997; s. 31-44
6. **Arda M (2000)**, Temel Mikrobiyoloji. 2. Baskı, Medisan Yayın Seri No: 46, Ankara.
7. **Arciola C.R, Baldassarri L, Montanaro L (2001)**, Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. J Clin Microbiol, 39, 2151-2156.
8. **Balaban N and Rasooly A (2000)**, *Staphylococcal enterotoxins*. Int J Food Microbiol, 61, 1-10.
9. **Barkema HW, Schukken YH, Zadoks RN (2006)**, *Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine Staphylococcus aureus mastitis*. J Dairy Sci, 89, 1877-1895.
10. **Baştan A. İneklerde meme hastalıkları**. 1. Baskı, Hatiboğlu Yayınevi, Ankara, (2002).
11. **Bilgehan H**. Klinik Mikrobiyoloji. Özel. Bakteriyoloji ve Bakteri İnfeksiyonları. 8. Basım, Fakülteler Kitabevi, İzmir, Eylül, 1993, s.186-210
12. **Blood DC ve Radostis OM (1989)**, *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs and horses*. Bailliere Tindall, London.
13. **Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A (1999)**, *The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms*. J Clin Microbiol, 37, 1771-1776.

14. **Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A (1999):** The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol*, 37, 1771-1776.
15. **Clinical and Laboratory Standards Institute (2006):** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement (M100-S15). Wayne, PA. CLSI.
16. **Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999):** Bakterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284, 1318-1322
17. **Clutterbuck AL, Woods EJ, Knottenbelt DC, Clegg PD, Cochrane CA, Percival SL (2007),** *Biofilms and their relevance to veterinary medicine*. *Vet Microbiol*, 121, 1-17.
18. **Cremonesi P, Luzzana M, Brasca M, Morandi S, Lodi R, Vimercati C, Agnellini D, Caramenti G, Moroni P, Castiglioni B (2005),** *Development of a multiplex PCR assay for the identification of Staphylococcus aureus enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products*. *Mol Cell Probes*, 19, 299-305.
19. **De Graves FJ, Fetrow J (1993),** *Economics of Mastitis Control*. *Vet. Clin. North Am: Food Animal Practice*, 9, 421-434.
20. **Ergün Y, Aslantaş Ö, Cantekin Z, Doğruer G (2004),** *Hatay ilindeki aile tipi süt sığırcılığı işletmelerinde subklinik mastitislerin epidemiyolojisi*. *Vet Bil Derg*, 20, 25-28.
21. **Erganiş O ve Uçan US (2001),** *Veteriner Epidemiyoloji*. 2. Baskı, Mimoza Yayınları, Konya.
22. **Erol İ ve İşeri Ö (2004),** *Stafilokokkal enterotoksinler*. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 51, 239-245.
23. **Fox LK, Zadoks RN, Gaskins CT (2005):** Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Vet Microbiol*, 107, 295-299.
24. **Fitzpatrick F, Humphreys H, O’Gara J.P (2005),** *The genetics of staphylococcal biofilm formation-will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection ?*. *Clin Microbiol Infect*, 11, 967-973.
25. **Fox LK, Gershman M, Hancock DD, Hutton CT (1991),** *Fomites and reservoirs of staphylococcus aureus causing intramammary infections as determined by phage typing; the effect of milking time hygiene practices*, *Cornell Vet*, 81, 183-193.
26. **Fuda CCS, Fisher JF, Mobashery S (2005),** *β -lactam resistance in Staphylococcus aureus: the adaptive resistance of a plastic genome*. *Cell Mol Life Sci*, 62, 2617-2633.
27. **Güler L, Ok U, Gündüz K, Gülcü Y, Hadimli HH (2005),** *Antimicrobial susceptibility and coagulase gene typing of Staphylococcus aureus isolated from bovine clinical mastitis cases in Turkey*. *J Dairy Sci*, 88, 3149-54.

28. Gillespie BE, Owens WE, Nickerson SC, Oliver SP (1999), *Deoxyribonucleic acid fingerprinting of staphylococcus aureus from heifer mammary secretions and from horn flies*. J Dairy Sci, 82, 1581-1585.
29. Grtrk K, Boynukara B, Ekin İE, Glhan T (1998), Van ve yresindeki ineklerde subklinik mastitisin etiyolojisi üzerine bir alışma. Y.Y.Y. Vet Fak Derg, 9, 1-4.
30. Giannechini R, Concha C, Rivero R, Delucci I, Moreno López J (2002) : Occurrence of clinical and sub-clinical mastitis in dairy herds in the West Littoral Region in Uruguay. Acta Vet Scand, 43, 221-230.
31. Goh SH, Byrne SK, Zhang JL, Chow AW (1992), *Molecular typing of Staphylococcus aureus on the basis of coagulase gene polymorphisms*. J Clin Microbiol, 30, 1642-1645.
32. Gilbert P, Das J, Foley I (1997): Biofilm susceptibility to antimicrobials. Adv Dent Res, 11, 160-167.
33. Hadimli HH (2000), *St ineklerinde stafilokokkal mastitisler için aşı alışmaları*. Doktora Tezi Seluk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
34. Harraghy N, Kerdudou S, Herrmann M (2007): Quorum-sensing in staphylococci as therapeutic targets. Anal Bioanal Chem, 387, 437-444).
35. Hadimli HH ve Erganiş O (2001), *Mastitis ve bağışıklık*. Veterinarium, 13(1), 37-42.
37. Herrmann M (2004), *Mechanism of biofilm formation in Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses*. Int J Med Microbiol, 294, 203-212.
38. Heilmann C, Hussain M, Peters G, Gotz F (1997), *Evidence for autolysin-mediated primary attachment of Staphylococcus epidermidis to a polystyrene surface*. Mol Microbiol, 24, 1013-1024.
39. Harraghy N, Kerdudou S, Herrmann M (2007), *Quorum-sensing in staphylococci as therapeutic targets*. Anal Bioanal Chem, 387, 437-444.
40. Hutton CT, Fox LK, Hancock DD (1990), *Mastitis control practices: Differences between herds with high and low milk somatic cell counts*. J Dairy Sci, 73(4), 1135-1143.
41. Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, Nesme X, Etienne J, Vandenesch F (2002), *Relationships between Staphylococcus aureus genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease*. Infect Immun, 70, 631-6.
42. Karahan M (2005), *Mastitisli inek sütlerinden izole edilen streptokok ve stafilokok etkenlerinde genetik polimorfizmin araştırılması*. Doktora Tezi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
43. Kuyucuoğlu Y, Uçar M (2001), *Afyon bölgesi süt ineklerinde subklinik ve klinik mastitislerin görülme oranları ve etkili antibiyotiklerin tespiti*. Vet. Hek. Mikrobiol. Derg. 1,19-24.

44. Koneman, EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC (1997), *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. 5th Ed., Lippincott Williams and Wilkins, Wolters Kluwe Company, Philadelphia, PA, USA.
45. Kireççi E (2004): *Erzurum yöresinde klinik ve subklinik mastitisli inek sütlerinden izole edilen stafilocok türlerinin tanımlanması, patojenite testleri, beta-laktamaz aktiviteleri ve antibiyotik duyarlılıkları*. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzurum.
46. Kong KF, Vuong C, Otto M (2006), *Staphylococcus quorum sensing in biofilm formation and infection*. Int J Medical Microbiol, 296, 133-139).
47. Lasa I, Penadés JR (2006): Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. Mini-review. Res Microbiol, 157, 99-107.
48. Letertre C, Perelle S, Dilasser F, Fach P (2003), *Identification of new putative enterotoxin SEU encoded by agc cluster of Staphylococcus aureus*. J Appl Microbiol, 95, 38-43.
49. Lyon GJ, Novick RP (2004), *Peptid signalling in Staphylococcus aureus and other Gram-positive bacteria*. Peptides, 25, 1389-140.
50. Milner P, Page KL, Hillerton JE (1997), *The Effects of early antibiotic treatment following diagnosis of mastitis detected by a change in the electrical conductivity of milk* J Dairy Sci, 80(5), 859-863.
51. Melchior MB, Fink-Gremmels, Gaastra W (2006), *Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of Staphylococcus aureus isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture*. J Vet Med B, 53, 326-332.
52. Mah TFC, O'Toole GA (2001): Mechanism of biofilm resistance to antimicrobial agents. TRENDS in Microbiology. 9, 34-39.
53. Mack D, Becker P, Chatterjee I, Dobinsky S, Knobloch JKM, Peters G, Rohde H, Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR (2002), *Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics*. Can J Vet Res, 66, 86-92.
54. Otto M, Sussmuth R, Vuong C, Jung G, Gotz F (1999), *Inhibition of virulence factor expression in Staphylococcus aureus by the Staphylococcus epidermidis agr pheromene and derivatives*. FEBS Lett, 450, 257-262.
55. Otto M (2004), *Virulence factors of the coagulase-negative staphylococci*. Front Biosci, 9, 841-863.

56. **Özmen Ö.** Mastitislerde etiyopatogenez. Süt inekçiliğinde Mastitis Sempozyumu, Akdeniz Üniv Vet Fak Yayın Ünitesi Yayın No: 2, 04-05 Mayıs, Burdur, 2001; 21-29.
57. **Pyörola S.** Staphylococcal and streptococcal mastitis. In Sandholm M, Honkannen T., Kaartinen L, Pyörola S. eds. The bovine udder and mastitis. University of Helsinki, Faculty of Vet Med, 1995; 143-147.
58. **Piepers S, De Meulemeester L, de Kruif A, Opsomer G, Barkema HW, De Vlieghe S (2007):** Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. J Dairy Res, 74, 478-483.
59. **Pitkälä A, Haveri M, Pyörälä S, Myllys V, Honkanen-Buzalski T (2004) :** Bovine mastitis in Finland 2001-prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. J Dairy Sci, 2004, 87, 2433-41.
60. **Roberson JR, Fox LK, Hancock DD, Gay CC, Beser TE (1998),** *Sources of intramammary infections from staphylococcus aureus in dairy heifers at first parturition.* J Dairy Sci, 81, 687-693.
61. **Roberson JR, Fox LK, Hancock DD, Gay CC, Beser TE (1994),** *Ecology of Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. J Dairy Sci, 77, 3354-3364.
62. **Riffon R, Sayasith K, Khalil H, Dubreuil P, Drolet M, Lagace J (2001),** *Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR.* J Clin Microbiol, 39, 2584-2589.
63. **Stewart PS (2002):** Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. Int J Med Microbiol, 292, 107-113.
64. **Schleifer KH (1986),** *Gram Positive Cocci.* "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 1". Ed. PHA Sneath, NS Mair, ME Sharpe, JG Holt. Williams and Wilkins, Baltimore.
65. SPSS 10.0 (Statistical Package for the Social Sciences) Bilgisayar programı.
66. **Şahin R (2007),** *Staphylococcus aureus suşlarında biofilm üretimi, biyofilm pozitif ve negatif suşların genotipik ve fenotipik karakterlerinin karşılaştırılması.* Uzmanlık Tezi. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli.
67. **Şanlı Y (1984),** *Mastitis sağıtımında kemoterapötik ilaç seçenekleri ve meme içi farmakokinetik.* I. Mastitis Semineri, Ankara.
68. **Şahin M, Çolak A, Otlu S, Aydın F, Genç O, Güler MA, Oral H (1998),** *Kars yöresi ithal simental ineklerinde subklinik ve klinik mastitislerin görülme oranı ve etkili antibiyotiklerin belirlenmesi.* Kafkas Üniv Vet Fak Derg, 3, 49-55.

69. **Tenhagen BA, Köster G, Wallmann J, Heuwieser W (2006)**: Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J Dairy Sci*, 89, 2542-2541.
70. **Türütoğlu H, Ateşoğlu A, Salihlioğlu H, Öztürk M (1995)**, *Marmara bölgesi süt ineklerinde mastitise neden olan etkenler*. *Pendik Vet Mikrobiyol Derg*, 26, 125-137.
71. **Turutoğlu H, Mudul S, Pehlivanoglu F (2002)**, *Antibiotic susceptibility and β lactamase prevalence for staphylococci isolated from bovine mastitic milk samples*. *Acta Veterinaria (Beograd)*, 52, 337-344.
72. **Vuong C, Saenz HL, Gotz F, Otto M (2000)**, *Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*, 182, 1688-1693.
73. **Vasudevan P, Nair MKM, Annamalai T, Venkitanaraynan KS (2003)**, *Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of Staphylococcus aureus for biofilm formation*. *Vet Microbiol*, 92, 179-185.
74. **Vancraeynest D, Hermans K, Haesebrouck F (2004)**: Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits for biofilm formation and MSCRAMMs. *Vet Microbiol*, 103, 241-247.
75. **Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR (1994)**, *Clinical Veterinary Microbiology*. Blackwell Science Ltd, Oxford.
76. **Wilson DJ, Gonzalez. RN, Sears PM (1995)**, *Segregation or use of separate milking units for cows infected with staphylococcus aureus: effects on prevalence of infection and bulk tank somatic cell count*. *J Dairy Sci*, 78(9), 2083-2085.
77. **Workineh S, Bayleyegn M, Mekonnen H, Potgieter LN (2002)** : Prevalence and aetiology of mastitis in cows from two major Ethiopian dairies. *Trop Anim Health Prod*. 34, 19-25.
78. **Yavuz MK, Esendal ÖM. (2002)**. *Mastitisli inek sütlerinden izole edilen stafilocokların tür düzeyinde identifikasyonu ve bazı özelliklerinin belirlenmesi*. *Etlik Vet. Mikrobiyal Derg*, 13, 19-27.
79. **Yancey RJ (1993)**, *Recent Advances in Bovine Vaccine Technology*. *J Dairy Sci*, 76(8), 2418-2436.

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Adıyaman Merkez’de doğdu. 2001 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve 2005 yılında mezun oldu. 2006 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisansa başladı. 2008 yılında Yüksek Lisansını bitirdi. Halen Mustafa Kemal Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi PCR Laboratuvarı’nda çalışmaktadır.