



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİK-YL-2014-0001

**SİĞİR MASTİTİSLERİNDEN İZOLE EDİLEN
STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUŞLARINDA BİOFİLM
OLUŞUMU VE ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇLİLİĞİNİN
BELİRLENMESİ**

Vet. Hek. Emre TANRIBUYURDU

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Osman KAYA**

AYDIN - 2014

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİK-YL-2014-0001**

**SIĞIR MASTİTİSLERİNDEN İZOLE EDİLEN
STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUŞLARINDA BİOFİLM
OLUŞUMU VE ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇLİLİĞİNİN
BELİRLENMESİ**

Vet. Hek. Emre TANRIBUYURDU

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Osman KAYA**

AYDIN - 2014

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Vet. Hek. Emre TANRIBUYURDU tarafından hazırlanan “Sığır Mastitislerinden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarında Biofilm Oluşumu ve Antibiyotiklere Dirençliliğinin Belirlenmesi” başlıklı tez, 16/01/2014 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı ve Soyadı :

Üniversitesi :

İmzası:

1- Prof. Dr. Osman KAYA

Adnan Menderes Ün.

2- Prof. Dr. K. Serdar DİKER

Ankara Ün.

3- Doç. Dr. Serap SAVAŞAN

Adnan Menderes Ün.

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi Enstitü Yönetim Kurulunun..... Sayılı kararıylatarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Sacide KARAKAŞ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Hayvan sağlığını ve refahını olumsuz yönde etkileyen mastitis, süt veriminde azalma, artan tedavi giderleri, yüksek kesime sevk edilme oranı ve hatta ölümler nedeniyle süt sığırı yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Stafilocokların sahip oldukları ekzotoksinler ve yüzey proteinleri yanında, biyofilm üretiminin de artan oranda önemli bir virulens faktörü olduğu vurgulanmaktadır. Biyofilm meme bezi epitelyumuna stafilocokların aderansını ve kolonizasyonunu kolaylaştırdığı gibi, immun sistemin savunma mekanizmalarından stafilocokların kurtulmasına ve sıklıkla da kalıcı infeksiyonlar oluşturmasına yardımcı olmaktadır. Çalışmamızda da sığır mastitislerinden izole edilen *S. aureus* suşlarının biyofilm üretme özelliğinin saptanması, biyofilm oluşumunun Stafilocokal mastitis infeksiyonlarında önemli bir virulans faktörü olup olmadığının belirlenmesi ve biyofilm oluşturan stafilocok suşlarının neden olduğu mastitis vakalarının tedavisinde doğru ve etkili antibiyotik seçeneklerinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

Araştırmamız, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından VTF-13042 kodlu proje olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|-----|
| KABUL VE ONAY SAYFASI | i |
| ÖNSÖZ | ii |
| İÇİNDEKİLER | iii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | v |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | vi |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 1.1. Etiyoloji | 2 |
| 1.2. Epidemiyoloji | 3 |
| 1.3. Stafilokok Mastitislerinin Patogenezi | 4 |
| 1.4. Stafilokokların Virulans Faktörleri | 5 |
| 1.4.1. Hücre Duvarı | 5 |
| 1.4.2. Ekzotoksinler | 6 |
| 1.4.3. Enzimler | 7 |
| 1.5. Klinik Belirtiler | 8 |
| 1.6. Tanı | 9 |
| 1.7. Stafilokokkal Mastitislerin Tedavisi, Korunma ve Kontrol | 10 |
| 1.8. Stafilokoklarda Antibiyotik Direnci | 11 |
| 1.9. Biyofilm | 12 |
| 1.9.1. Biyofilm Formasyonu | 13 |
| 1.9.2. ica Operon | 14 |
| 1.9.3. ica Operonun Ekspresyonu ve Biyofilm Formasyonunun Regülasyonu | 14 |
| 1.9.4. Hastalık Patogenezisinde Biyofilm Formasyonunun Önemi | 15 |
| 1.9.5. Stafilokoklarda Hücrelerarası İletişim (Quorum-Sensing) Sistemi | 16 |
| 1.9.6. Biyofilm Oluşumunda agr Sisteminin Rolü | 17 |
| 1.9.7. Biyofilme Karşı Konak İmmun Sistemin Yanıtı | 18 |
| 1.9.8. Antimikrobiyal Ajanlara Biyofilm Direnci | 19 |
| 1.9.9. Biyofilm ve Mastitis | 21 |
| 2. GEREÇ VE YÖNTEM | 23 |
| 2.1. Gereç | 23 |
| 2.1.1. İzolasyon Örnekleri | 23 |

| | |
|--|----|
| 2.1.2. Besiyerleri, Ayıraçlar, Solusyonlar ve Antibiyotik Diskleri | 23 |
| 2.1.2.1. Besiyerleri | 23 |
| 2.1.2.1.1. Blood Agar (Merck 1. 10886) | 23 |
| 2.1.2.1.2. Mannitol Salt Phenol Red Agar (MSA) (Merck 1.05404) | 23 |
| 2.1.2.1.3. Mueller-Hinton Agar (MHA) (Oxoid CM 129) | 24 |
| 2.1.2.1.4. Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (% 20 Gliserinli) (Oxoid CM 0225) | 24 |
| 2.1.2.1.5. Trypton Soya Broth (TSB) (% 7,5 Tuzlu) (Oxoid CM 129) | 24 |
| 2.1.2.1.7. DNase Test Agar (Merck 1.10449) | 24 |
| 2.1.2.2. Çözeltiler | 25 |
| 2.1.2.2.1. Antimikrobiyel Madde Stok Çözeltileri | 25 |
| 2.2. Yöntem | 28 |
| 2.2.1. Örneklerin Alınması | 28 |
| 2.2.2. <i>S. aureus</i> İzolasyonu | 28 |
| 2.2.2.1. Fenotipik İdentifikasyon | 28 |
| 2.2.2.1.1. Katalaz Testi | 28 |
| 2.2.2.1.2. Basitrasin Duyarlılık Testi | 28 |
| 2.2.2.1.3. Koagulaz Testi | 29 |
| 2.2.2.1.4. Mannitol Fermentasyonu | 29 |
| 2.2.2.1.5. Glukoz Fermentasyonu | 29 |
| 2.2.1.6. DNase Testi | 29 |
| 2.2.3. Biyofilm Üretiminin Standart Tüp Yöntemi ile Belirlenmesi | 30 |
| 2.2.4. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri | 30 |
| 3. BULGULAR | 31 |
| 3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları | 31 |
| 3.2. Antimikrobiyal Duyarlılık Test Sonuçları | 32 |
| 4. TARTIŞMA | 34 |
| 5. SONUÇ | 38 |
| ÖZET | 39 |
| SUMMARY | 40 |
| KAYNAKLAR | 41 |
| ÖZGEÇMİŞ | 46 |
| TEŞEKKÜR | 47 |

ÇİZELGELER

| | | |
|--------------|---|----|
| Çizelge 3.1. | <i>S. aureus</i> izolatlarının biyofilm üretme yetenekleri | 32 |
| Çizelge 3.2. | <i>S. aureus</i> izolatları için antimikrobiyal duyarlılık test sonuçları | 33 |

ŞEKİLLER

Şekil 3.1.

Biyofilm oluşturma yeteneğinin belirlenmesi

31

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 immün 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 sağımçıların 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 etiolojisinde *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).

1.1. 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 sakkaroza tolerans gösterebilmektedir (Akan 2006).

Stafilokoklar insanlarda ve hayvanlarda çeşitli hastalıklara neden olmaktadır. *S. aureus*'un insanlarda, nazokomiyal infeksiyonlara, 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 (Gillespe ve ark 1999).

1.2. 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 sağımçıların elleri, sağım ekipmanları, ahırda kullanılan malzemeler ve sağım hijyenine dikkat edilmemesi önemli rol oynamaktadır (Gillespe ve ark1999, Roberson ve ark1998, Baştan 2002).

Mastitis dünyada ve Türkiye'de süt inekçiliği yönünden önemli bir enfeksiyondur. Multifaktöriyel bir etiyojiye sahip olan mastitisin eradikasyonu mümkün olmamakla

birlikte, geliştirilen kontrol programları ile ancak insidensi düşük seviyelere çekilebilmiştir (Erganiş ve ark 2001). Türkiye’de mastitislerin yaygınlığını ve mastitislere neden olan mikroorganizmaların belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda farklı Stafilokok izolasyon oranları bulunmuştur. Türütoğlu ve arkadaşları (1995), Marmara bölgesinde % 28.1 *S. aureus* ve % 23.1 *S. epidermidis*, Kuyucuoğlu ve Uçar (2001) Afyon bölgesinde % 40.1 *S. aureus*, Ergün ve arkadaşları (2004), % 42.4 KNS ve % 25.1 *S. aureus*, Gürtürk ve arkadaşları (1998) Van ve yöresinde % 41 oranında Stafilokok türü izole etmişlerdir.

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

1.3. Stafilokok Mastitislerinin Patogenezi

Stafilokokların 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 infeksiyon başlatmasına ve invazyonuna yardımcı olurlar. 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 (Karahana 2005).

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. Yangınsal 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 (Karahan 2005).

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 ark 1989).

1.4. Stafilokokların Virulans Faktörleri

1.4.1. Hücre Duvarı

Peptidoglikan, teikoik asit ve protein A stafilokokların hücre duvarında bulunan üç önemli antijenik yapıdır. 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).

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 hücrelere 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).

1.4.2. 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 agarda *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. 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 (Karahana 2005).

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 (Karahana 2005).

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 ark 2004). Klinik semptom oluşturan doz çok düşük olup, maymunlarda emetik dozun 5-20 µg/maymun olduğu bildirilmiştir (Balaban ark 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).

Stafilokokkal gıda zehirlenmelerinin % 95'inden SEA-SEE, % 5'inden ise yeni belirlenen SE tiplerinin sorumlu olduğu rapor edilmiştir (Cremonesi ve ark 2005).

1.4.3. 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 oluşturmalarına 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 paraçalayarak 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). Stafilokokların dışında Gram negatif bakterilerde de tespit edilen beta-laktamazlar molekül ağırlıklarına ve etki tarzlarına göre 4 sınıfa (A, B, C, D) ayrılmıştır. Stafilokokların sentezlediği betalaktamazlar A sınıfında yer almaktadır (Özmen 2001).

1.5. 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 peraküt, akut, subakut ve kronik

mastitis olarak da sınıflandırılmaktadır. Perakut formun prognozu çoğunlukla olumsuz olmasına rağmen, kroniksubklinik form en önemli ekonomik kayıpların görüldüğü formdur (Baştan 2002).

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 ağrılıdır. Meme ucunda başlayan morarma daha sonra meme loplarnı da kapsayabilir. Etkilenmeyen meme loplarnı da genellikle şişmiştir. Tokseminin hızlı geliştiği vakalar ölümle sonuçlanır (Akay ve ark 1984, Baştan 2002).

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 sütn 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).

1.6. 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. 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 ark 2002). Stafilocokların laboratuvarlarda hızlı identifikasyonuna yönelik ticari StaphTrac, Minitek Gram-Positive Set ve Api-STAPH gibi kitler geliştirilmiştir (Goh ve ark 1992).

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).

1.7. 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).

1.8. 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 arkadaşları (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'inin gentamisine dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Güler ve arkadaşları (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 ampisiline % 63.3, oksitetrasikline % 27.9 ve trimetoprim-sulfametaksazola % 1.8 oranında direnç saptamışlardır. Ergün ve arkadaşları (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 % 5.2; 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 arkadaşları ise (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, sulfametaksazoltrimetoprimine % 23.5'inin ve penisiline de % 88.23'ünün dirençli olduğunu saptamışlardır.

1.9. 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 prosesdir. 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).

1.9.1. 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 substrat akımına ve/veya biyofilm içindeki diğer bakteriler ile besin alışverişine bağımlıdır (Clutterback ve ark 1999).

Biyofilmleri hidrofilik yapan temel komponent sudur. Biyofilmlerin içinde yer alan 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 hücelere 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. Bu aşamadan sonra bakteriler biyofilmden ayrılmak üzere serbest kalırlar ve diğer yüzeylere kolonize olurlar (Melchior ve ark 2006).

1.9.2. 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 adhezin) 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). icaADB 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-asetilglukozamintransferaz 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).

1.9.3. ica Operonun Ekspresyonu ve Biyofilm Formasyonunun Regülasyonu

ica operon ekspresyonunun regülasyonu ve biyofilm gelişimi ica operon regulator (IcaR), teicoplanin-associated locus regulator (TcaR), çevresel faktörler (glukoz, etanol, yüksek ozmolarite ve sıcaklık), anaerobiosis, tetrasiklin veya quinupristin-dalfopristin'in sub-inhibitör konsantrasyonlarından olumsuz yönde etkilenir (Fitzpatrick ve ark 2005). *S. epidermidis*'te alternatif sigma faktör (σ B) icaR ekspresyonunu negatif yönde regüle ederek

ica operonunun ekspresyonunu pozitif yönde etkiler. 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 operonunun regülasyonu ve biyofilm gelişiminde türler arasında önemli bir farklılığı vurgulamaktadır (Fitzpatrick ve ark 2005, Mack ve ark 2004).

Staphylococcal accessory regulator (SarA)'de meydana gelen mutasyonlar hem *S. aureus* ve *S. epidermidis*'te 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 tanımlanmış ve bu genlerin büyük bir kısmının SarA regülatör basamaklarına dahil olduğu ve bu nedenle de biyofilm formasyonu üzerine bir etkisi olabileceği bildirilmiştir. SarA'nın staphylococcal accessory gene regulator (Agr) sistemi de dahil 100'den fazla genin ekspresyonunu etkilediği düşünüldüğünde, antibakteriyel ajanlar için önemli bir hedef olabilir. Çünkü, SarA'nın 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).

1.9.4. Hastalık Patogeneziinde 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 antikolar biyofilmden ayrılan planktonik hücreleri elimine etmesine rağmen biyofilm içindeki bakterilere ulaşmamakta 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 tıkararak sağlık problemlerine de neden olmaktadır. Ayrıca iyileşmeyen infekte yaralarla ilişkili olarak biyofilm klinik olarak önemli role sahiptir (Clutterback ve ark 2007).

1.9.5. Stafilokoklarda Hücrelerarası İletişim (Quorum-Sensing) Sistemi

Bir infeksiyonu oluşturmak için bakteriler patojenitelerini belirleyen virulans faktörlerinin ekspresyonunu iyi organize etmek zorundadır. Tür spesifik virulans faktörlerinin koordinasyonu patojenin yaşaması ve konağa invazyonu için oldukça önemlidir. Bu nedenle patojenler, infeksiyon sırasında değişen çevresel koşullara virulans genlerinin ekspresyonunu adapte etmek için kompleks regülatör sistemler geliştirmişlerdir (Kong ve ark 2006). Türler arası veya türler içi iletişim olarak tanımlanan quorum sensing (QS), virulans, intrasellüler 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. 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).

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*'te de gösterilmiş ve bu genin *S. epidermidis* için 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. Ancak, agr sisteminin etki mekanizmasının aksine luxS biyofilm formasyonunu ica gen lokusunun transkripsiyonel regülasyonu ile sağlamaktadır (Kong ve ark. 2006).

1.9.6. Biyofilm Oluşumunda agr Sisteminin Rolü

Biyofilm oluşumu tutunma, hücre-hücre adhezyonu ve proliferasyon, olgunlaşma ve ayrılma gibi farklı aşamaları içermektedir (Otto 2004). Stafilokoklarda 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 stafilokokların tutunmasını sağlar. Bu durum muhtemelen adhezyon moleküllerinin olumlu yönde regülasyonu ve biyofilmden ayrılmayı sağlayan moleküllerin negatif regülasyonu ile sağlanmaktadır (Vuong ve ark. 2000).

Bakteri bir kez tutunduktan sonra, bakteriler slime içinde çoğalmaya başlar ve çok tabakalı hücre yapısı oluşturur. Hücrelerin birbirine adhezyonu bu fazın belirleyici faktörü olarak kabul edilmektedir. Stafilokoklarda 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).

1.9.7. Biyofilme Karşı Konak İmmun 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 immün 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 immün 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 stimülasyonu bakteri bir biyofilm içinde bulunduğu 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 immün 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 süspanse 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 sesil 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).

1.9.8. Antimikrobiyal Ajanlara Biyofilm Direnci

Biyofilm içinde çoğalan bakterilerin aynı suşa ait planktonik bakterilerle karşılaştırıldığında antimikrobiyal ajanların çok yüksek konsantrasyonlarda duyarlı olduğu gösterilmiştir (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 (Stewart 2002). Bu mekanizmalardan ilki antibiyotiklerin biyofilme penetre olamamasıdır. Ekzopolisakkarit matriksin üretimi biyofilmlerin ayırıcı karakterlerinden biridir. Bu matriks antibiyotiklerin biyofilm içindeki bakterilere diffüzyonunu engeller. Antibiyotiklerin matriks ile reaksiyonu veya biyofilm matriks komponentleri tarafından adsorpsiyonu biyofilm içine antibakteriyel ajanın transportunu sınırlandırabilir (Stewart 2002). Anderl ve arkadaşları (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. pneumoniae* 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).

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 popülasyonunun büyük bir kısmı ölmesine rağmen küçük bir bakteri popülasyonu etkilenmeden kalmaktadır. Çok ince biyofilmlerde bile bakterilerin antibiyotiklere düşük duyarlılık geliştirmeleri persiste hücreler ile açıklanmaktadır. 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 (Stewart 2002).

Persiste hücrelerin bakteriyel popülasyonun 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).

1.9.9. Biyofilm ve Mastitis

S. aureus'un meme bezi epiteline adhezyonu mastitisin patogenezisinde 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. *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 bakteriyal 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, 100 adet subklinik mastitis şikayeti olan hayvandan alınan sütlerden izole edilecek *S. aureus* suşlarının biyofilm oluşturma yeteneğinin araştırılması, izole edilen suşların farklı antibiyotiklere karşı olan duyarlılıklarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. İzolasyon Örnekleri

Araştırma için 2012 Eylül-Aralık tarihleri arasında, Aydın ili ve çevresinde bulunan, bulunan işletmelerde laktasyon döneminde olan 100 ineğin her birinden süt örnekleri tekniğine uygun olarak alınıp Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına soğuk zincirde getirilmiştir.

2.1.2. Besiyerleri, Ayıraçlar, Solusyonlar ve Antibiyotik Diskleri

2.1.2.1. Besiyerleri

2.1.2.1.1. Blood Agar (Merck 1. 10886)

| | |
|-----------------|---------|
| Blood Agar..... | 40 g |
| Distile su..... | 1000 ml |

Karışımın pH'sı 7,2–7,4'e ayarlanmış, onbeş dakika otoklav edildikten sonra, 50°C'ye kadar soğutulup, içine % 7 oranında steril insan kanı ilave edildi.

2.1.2.1.2. Mannitol Salt Phenol Red Agar (MSA) (Merck 1.05404)

MSA ayırt edici ve seçici bir besi yeridir. Stafilokokların saf olarak elde edilmesi ve laboratuvarında tanımlanabilmesi açısından önemli olan mannitol fermantasyonunun gözlenebilmesi için MSA kullanıldı.

| | |
|------------------------------------|---------|
| Mannitol Salt Phenol Red Agar..... | 108 g |
| Distile su..... | 1000 ml |

Karışımın pH'sı 7,2–7,4'e ayarlanıp, onbeş dakika otoklavda sterilize edildikten sonra, 50°C'ye kadar soğutulup petrilere döküldü.

2.1.2.1.3. Mueller-Hinton Agar (MHA) (Oxoid CM 129)

| | |
|--------------------------|---------|
| Mueller-Hinton Agar..... | 38 g |
| Distile su..... | 1000 ml |
| pH: 7,3±0,2 | |

Besiyeri 38 g olacak şekilde distile su içinde kaynatılarak eritilip 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. 45–50°C'a soğutulup steril petri kutularına 12,5 ml döküldü.

2.1.2.1.4. Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (% 20 Gliserinli) (Oxoid CM 0225)

| | |
|-----------------|-------|
| BHIB | 8 g |
| Gliserin | 20 ml |
| Distile su..... | 80 ml |

Karışımın pH'sı 7,2–7,4'e ayarlanıp, 0,5 ml miktarda ependorf tüplere dağıtıldıktan sonra 121°C'de onbeş dakika otoklavda sterilize edildi.

2.1.2.1.5. Trypton Soya Broth (TSB) (% 7,5 Tuzlu) (Oxoid CM 129)

| | |
|-----------------|---------|
| TSB..... | 8 g |
| NaCl..... | 75 g |
| Distile su..... | 1000 ml |

Karışımın pH'sı 7,2–7,4'e ayarlandı. 5 ml miktarda tüplere dağıtıldı. 121°C'de onbeş dakika otoklavda sterilize edildi.

2.1.2.1.7. DNase Test Agar (Merck 1.10449)

| | |
|-----------------------------|---------|
| Triptoz..... | 20 g |
| NaCl..... | 75 g |
| Deoksiribonükleik asit..... | 2 g |
| Agar agar..... | 15 g |
| Distile su..... | 1000 ml |

Karışımın pH'sı 7,2–7,4'e ayarlandı. 121°C'de onbeş dakika otoklavda sterilize edildi. 12,5'er ml miktarda steril petrilere döküldü.

2.1.2.2. Çözeltiler

% 1.75 BaCl₂.2H₂O çözeltisi: 1.75 g BaCl₂ 2H₂O 50 ml distile su içinde çözdürüldü ve çözelti distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

H₂SO₄ (% 1): 99 ml distile su 1 ml H₂SO₄ ile 100 ml'ye tamamlandı.

Etil Alkol (% 95): 95 ml etil alkol 5 ml distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

0.1 M NaOH: 4 g NaOH, steril distile su içinde çözdürülüp 1000 ml'ye tamamlandı.

0.1 M Fosfat ile Tamponlanmış Tuzlu su (PBS) pH 6.0 ve pH 8.0: 17.8 g Na₂HPO₄.2H₂O distile su içinde çözdürüldü ve 1 litreye tamamlandı. 13.6 g KH₂PO₄ distile su içinde çözdürüldü ve 1 litreye tamamlandı. 1 litrelik behere 8.76 g NaCl koyularak üzerine Na₂HPO₄.2H₂O ve KH₂PO₄ çözeltilerinden 250'şer ml ilave edildi ve pH metre ile ölçüldü. pH 6.0 olacak şekilde çözeltilerden ilaveler yapılarak 1 litreye tamamlandı. Aynı işlem pH 8.0 için de uygulandı.

Mc Farland 0.5 çözeltisi: 0.5 ml % 1.75 BaCl₂ 2H₂O çözeltisiyle 99.5 ml %1'lik H₂SO₄ solusyonunun karıştırılması ile elde edildi. Çözeltinin optik yoğunluğu 550 nm'de spektrofotometrik olarak 0,126 olarak belirlendi (Winn ve ark 2006, Baron ve Finegold 1990).

Fizyolojik Tuzlu Su (FTS): 8.76 g NaCl distile su içinde çözdürülüp 1 lt'ye tamamlandı.

2.1.2.2.1. Antimikrobiyel Madde Stok Çözeltileri

Antimikrobiyal madde stok çözeltileri 5120 µg/ml olacak şekilde yaklaşık 10 ml olarak hazırlandı. Çözelti hazırlanırken, tartılacak antimikrobiyal maddenin miktarı veya sulandırma hacmi, antimikrobiyal maddenin test potansiyeli dikkate alınarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Baron ve Finegold 1990, CLSI 2007). Antimikrobiyal maddelerin test potansiyeli (1 mg antimikrobiyal toz içindeki antimikrobiyal maddenin

mikrogram miktarı) için üretici firmanın önerdiği veya daha önce bildirilen miktarlar esas alındı.

Tartılacak antimikrobiyal madde miktarı = sulandırma hacmi (10 ml) x yoğunluk (5120 µg/ml) / test potansiyeli (µg / mg)

Penisilin G için bildirilen 1477 U/mg antimikrobiyal madde x 0.6 µg/U = 886.2 µg/mg olarak hesaplanan test potansiyeline göre 57.77 mg Penisilin G Sodyum Salt 10 ml distile su içinde çözdürüldü. Sulandırma işlemleri de distile su ile yapıldı (CLSI 2007).

Ampisilin için bildirilen 845 µg/mg test potansiyeline göre 60.59 mg Ampicillin Sodyum Salt 1ml 0.1 M PBS (pH 8.0) içinde çözdürüldü ve karışım aynı çözelti ile 10 ml'ye tamamlandı. Sulandırma işlemleri de 0.1 M PBS (pH 6.0) ile yapıldı (CLSI 2007).

Amoksisilin için bildirilen 900 µg/mg test potansiyeline göre 56.88 mg Amoxicillin önce oda ısısında doyurulmuş NaHCO₃ çözeltisinden 1 ml kullanılarak çözdürüldü ve karışım distile su ile 10 ml'ye tamamlandı. Sulandırma işlemleri de distile su ile yapıldı (Andrews 2001).

Potasyum klavulanat için bildirilen (CLSI 2007) 755 µg/mg test potansiyeline göre 67.81 mg Potassium Clavulanat, önce 1 ml 0.1 M PBS (pH 6.0) içinde çözdürüldü ve karışım aynı tampon çözelti ile 10 ml'ye tamamlandı. Sulandırma işlemleri de aynı tampon çözelti ile yapıldı (CLSI 2007).

Sefalotin sodyum tuzu için bildirilen 985 µg/mg test potansiyeline göre 51.97 mg Cephalothine Sodyum Salt, 1 ml 0.1 M PBS (pH 6.0) içinde çözdürüldü ve karışım aynı tampon çözelti ile 10 ml'ye tamamlandı. Sulandırma işlemleri de distile su ile yapıldı (CLSI 2007).

Sefotaksim sodyum tuzu için bildirilen 940 µg/mg test potansiyeline göre 54.46 mg Cefotaxime Sodium Salt, önce 1 ml distile su içinde çözdürüldü ve karışım distile su ile 10 ml'ye tamamlandı. Sulandırma işlemleri de distile su ile yapıldı (CLSI 2007).

Sefuroksim sodyum salt için bildirilen (CLSI 2007) 875 µg/mg test potansiyeline göre 58.51 mg Cefuroxime Sodium Salt, önce 1 ml 0.1 M PBS (pH 6.0) içinde çözdürüldü ve karışım aynı tampon çözelti ile 10 ml'ye tamamlandı. Sulandırma işlemleri de aynı tampon çözelti ile yapıldı (CLSI 2007).

Tetrasiklin hidroklorit için belirlenen 950 µg/mg test potansiyeline göre 53.89 mg Tetrasiklin Hydrochloride, önce 1 ml distile su içinde çözdürüldü ve karışım distile su ile 10 ml'ye tamamlandı. Sulandırma işlemleri de distile su ile yapıldı (CLSI 2007).

Eritromisin için belirlenen 850 µg/mg test potansiyeline göre 60.23 mg Erythromycin, önce 1 ml %95'lik etil alkol içinde çözdürüldü ve karışım distile su ile 10 ml'ye tamamlandı. Sulandırma işlemleri de distile su ile yapıldı (CLSI 2007).

Enrofloksasin için bildirilen 980 µg/mg test potansiyeline göre 52.24 mg Enrofloxacin, kinolonlar için önerildiği gibi önce 5 ml distile su içinde karışıma damla damla 0.1 M NaOH katılarak çözdürüldü ve karışım distile su ile 10 ml'ye tamamlandı. Sulandırma işlemleri de distile su ile yapıldı (CLSI 2007).

Novobiosin için bildirilen 968 µg/mg test potansiyeline göre 52.89 mg Novobiocin Sodium Salt, önce 1 ml distile su içinde çözdürüldü ve karışım distile su ile 10 ml'ye tamamlandı. Sulandırma işlemleri de distile su ile yapıldı (Lightbown ve ark 1966).

Oksasilin için bildirilen 950 µg/mg test potansiyeline göre 53.89 mg Oxacillin Sodium Salt, önce 1 ml distile su içinde çözdürüldü ve karışım distile su ile 10 ml'ye tamamlandı. Sulandırma işlemleri de distile su ile yapıldı (CLSI 2007).

2.2. Yöntem

2.2.1. Örneklerin Alınması

Her süt örneği alınırken, meme başları su ve sünger yardımı ile temizlenip kurulandı ve % 70'lik alkol ile silindi. Eller sabunla yıkandıktan sonra eldiven giyilip meme başındaki saprofit bakterileri uzaklaştırmak için ilk birkaç ml süt atıldı. Steril enjektörler içine 5 ml miktarda alındı.

2.2.2. *S. aureus* İzolasyonu

Laboratuvara getirilen örneklerden Stafilokoklar'ın saf olarak elde edilmesi amaçlandı. Bunun için, süt örnekleri MSA'a ekildi. MSA'da 24-48 saatlik inkübasyon sonunda üreyen Stafilokok suşları, fenotipik özelliklerinin incelenebilmesi için kanlı agara pasajlandı. Stafilokok suşlarının morfolojik ve biyokimyasal özellikleri standart laboratuvar işlemleri uygulanarak gerçekleştirildi (Murray ve Patrick 2003).

2.2.2.1. Fenotipik İdentifikasyon

İzolatların fenotipik identifikasyonlarında kullanılan katalaz, basitrasin duyarlılık, tüp koagülaz testleri aşağıdaki anlatıldığı şekilde yapılarak gerçekleştirildi.

2.2.2.1.1. Katalaz Testi

Bu test için besiyerinde üreyen kolonilerden steril öze ile alınıp temiz bir lam üzerine aktarıldıktan sonra üzerine 1-2 damla % 3'lük hidrojen peroksit damlatıldı. Katalaz enzimi oluşturan bakteriler hidrojen peroksiti su ve oksijene ayrıştırdığı için ortamdaki oksijen çıkışı kabarcık oluşumu ile belirlendi. Bu nedenle test sonucu kabarcıklar meydana geldiğinde katalaz pozitif, kabarcıklar oluşmadığında ise katalaz negatif olarak değerlendirildi. *Streptococcus spp.* katalaz negatif, *Micrococcaceae* familyasındaki *Micrococcus spp.* ve *Staphylococcus spp.* ise pozitifdir (Murray ve Patrick 2003).

2.2.2.1.2. Basitrasin Duyarlılık Testi

Katalaz pozitif mikroskobik olarak Gram pozitif kok görünümündeki mikroorganizmalar *Micrococcaceae* grubunda kabul edildi. Bu suşlardan tek bir koloni

TSB'da üretildikten sonra MHA'a ekim yapılmış ve ekim bölgesinin üzerine basitrasın diski yerleştirildi. 37°C'de 18–24 saat inkübe edildikten sonra basitrasine dirençli suşlar *Staphylococcus spp.* olarak ayrıldı (Koneman ve ark 1997).

2.2.2.1.3. Koagulaz Testi

Çalışmada, kullanılan bakterilerin koagulaz testleri tüpte gerçekleştirildi. Bunun için incelenecek koloni, içerisinde 0,8 ml serum fizyolojik ve 0,2 ml EDTA'lı tavşan plazması (Bactident Coagulase, 1.13306.0001 Merck) bulunan bir tüpe ekildi. 37°C'deki benmaride bırakılarak 1, 2, 4, 8 ve 24. saatlerde pıhtının oluşması gözlemlendi. Koagulaz enzimine sahip türlerin kan plazmasını koagüle etmesi sonucunda test tüpünde katılaşma meydana gelirse, test sonucu pozitif, katılaşma meydana gelmiyorsa negatif olarak değerlendirildi. Elde edilen tüm koagulaz pozitif suşlar daha sonra kullanılmak üzere, % 20 gliserinli BHIB içerisinde -80°C'de saklandı.

2.2.2.1.4. Mannitol Fermentasyonu

Katalaz ve koagulaz testi pozitif olan suşlar bakterilerin mannitol salt agara ekimleri yapıldı. 37 ° C'de 24 saatlik inkubasyondan sonra izole edilen *S. aureus* kolonileri, çevresinde mannitolden asit oluşumunu gösteren sarı bir zon varlığı ile saptandı.

2.2.2.1.5. Glukoz Fermentasyonu

Yarıkatı glukoz besiyerine *S. aureus* kolonilerinden ekimler yapıldı. 37 °C'de 24 saatlik inkubasyondan sonra besiyerinin sarı renge dönüşmesi ile *S. aureus* identifikasyonu doğrulandı.

2.2.1.6. DNase Testi

DNA'lı besiyerine *S. aureus* kültüründen çizgi ekimi yapıлып 35°C'de 24 saat bekletildi, daha sonra agar yüzeyine 1 N HCl damlatıldı. Ekim çizgisinin çevresinde saydam bir zon oluşması ile *S. aureus* identifikasyonu doğrulandı.

2.2.3. Biyofilm Üretiminin Standart Tüp Yöntemi ile Belirlenmesi

Standard Tüp yöntemi Christensen ve arkadaşları (1985) tarafından bildirilen yönteme göre yapıldı. Bu amaçla test edilecek stafilokok suşlarının kanlı agarda 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.

2.2.4. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

Antimikrobiyal maddelerin MİK değerlerinin belirlenmesi için, 37°C'de 18-24 saat süreyle bekletilmiş taze bakteri kültürlerinden bir öze dolusu bakteri kolonisi steril FTS içinde süspanse edildi ve bakteri süspanسیونlarının yoğunluğu McFarland 0.5'e ayarlandı. Hazırlanan bakteri süspanسیونları steril FTS ile 1:10 oranında sulandırıldıktan sonra agar besiyerlerine otomatik pipet (0.5-10 µl) yardımı ile 2'şer µl nokta şekilde uygulandı. Her bir agar besiyerinde en fazla 32 bakteri kültürü test edildi. Daha sonra agar besiyerleri, 35°C'de, *S. aureus* için 16-18 saat süreyle inkübe edildi ve bu süre sonunda antimikrobiyal madde içeren besiyerlerinde bakteri üremeleri kontrol edildi. Her bir bakteri suşuna ait kolonilerin görülmediği en düşük antimikrobiyal madde konsantrasyonu o antimikrobiyal maddenin MİK değeri olarak kabul edildi. İncelenen bakteri suşlarının % 50'sinde üremeyi önleyen antimikrobiyal madde konsantrasyonu o antimikrobiyal madde için MİK₅₀, % 90'ında üremeyi önleyen antimikrobiyal madde konsantrasyonu da MİK₉₀ olarak tanımlandı. Testte kontrol olarak, *Staphylococcus aureus* için *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 suşu kullanıldı (CLSI 2007).

3. BULGULAR

Araştırma için 2012 Eylül-Aralık tarihleri arasında, Aydın ili ve çevresinde bulunan işletmelerde laktasyon döneminde olan 100 ineğin her birinden süt örnekleri tekniğine uygun olarak alınıp Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına soğuk zincirde getirilmiştir. İzole edilen etkenlerin tür düzeyinde identifikasyonları fenotipik özellikleri incelenerek gerçekleştirildi.

3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

İncelenen 100 örneğin toplam 27'sinde (% 27) *S. aureus* izolasyonu gerçekleştirilmiştir. 100 adet hayvandan elde edilen süt kökenli *S. aureus* izolatlarının ST yöntemleri ile biyofilm üretme yetenekleri Çizelge 3.1.'de sunulmuştur. İncelenen 27 *S. aureus* suşunun ST testleri ile 18 (% 66.6)'i biyofilm üretimi yönünden pozitif bulunmuştur. Standart tüp yöntemi ile belirlenen biyofilm sonuçları Şekil 3.1.'de gösterilmektedir.



Şekil 3.1. Biyofilm oluşturma yeteneğinin belirlenmesi

Çizelge 3.1. *S. aureus* izolatlarının biyofilm üretme yetenekleri

| TEST | <i>S. aureus</i> (n:27) | | | |
|--------------|-------------------------|------|------------------|------|
| | Biyofilm pozitif | | Biyofilm negatif | |
| | n | % | n | % |
| Standart Tüp | 18 | 66.6 | 9 | 33.4 |

3.2. Antimikrobiyal Duyarlılık Test Sonuçları

Agar dilüsyon yöntemi ile incelenen 27 adet *Staphylococcus aureus* suşunun tamamı, sefotaksim, sefuroksim, sefalotin, enrofloksasin ve novobiosine duyarlı bulundu. İzole edilen suşlarda penisilin G için % 74, ampisilin için % 66, tetrasiklin için % 81 oranında direnç oluşumu tespit edilmiştir. Ayrıca eritromisin için % 4, oksasilin için % 7 ve amoksisilin+klavulonik asit için % 4 gibi düşük direnç gelişimleri de tespit edilmiştir.

Agar dilüsyon yöntemi ile incelenen *Staphylococcus aureus* suşlarına yönelik MİK50 ve MİK90 değerleri; penisilin G için 0,125-0,5 µg/ml, ampisilin için 0,125-1,0 µg/ml, eritromisin için 32-128 µg/ml, tetrasiklin için 2,0-32 µg/ml, oksasilin için 8-32 µg/ml, ve sefotaksim ve sefalotin için 128-256 µg/ml, amoksisilin+klavulanik asit için 16-32 µg/ml, enrofloksasin için 8-16 µg/ml, sefuroksim ve novobiosin için 64-128 µg/ml olarak tespit edildi (Çizelge 3.2.).

İncelenen *Staphylococcus aureus* suşlarının değerlendirilmesinde kontrol olarak *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 suşu kullanıldı. Kalite kontrol suşlarının antimikrobiyal maddeler için tespit edilen MİK değerleri, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (2007) verilerinde belirtilen aralıklarda bulundu.

Çizelge 3.2. *S. aureus* izolatları için antimikrobiyal duyarlılık test sonuçları

| Antimikrobiyal Madde | MİK aralığı (µg/ml) | MİK50 (µg /ml) | MİK90 (µg /ml) | MİK Breakpoint | Direnç % |
|------------------------------|---------------------|----------------|----------------|----------------|----------|
| Penisilin G | 0,03-2 | 0,125 | 0,5 | ≥ 0,25 | 74 |
| Ampisilin | 0,06-4 | 0,125 | 1 | ≥ 0,5 | 66 |
| Eritromisin | 4-128 | 32 | 128 | ≥ 8 | 4 |
| Tetrasiklin | 0,25-64 | 2 | 32 | ≥ 16 | 81 |
| Oksasilin | 2-128 | 8 | 32 | ≥ 4 | 7 |
| Amoksisilin+ Klavulanik Asit | 2-64 | 16 | 32 | ≥ 8/4 | 4 |
| Sefotaksim | 64-256 | 128 | 256 | ≥ 64 | 0 |
| Sefuroksim | 32-256 | 64 | 128 | ≥ 32 | 0 |
| Sefalotin | 32-256 | 128 | 256 | ≥ 32 | 0 |
| Enrofloksasin | 2-64 | 8 | 16 | ≥ 2 | 0 |
| Novobiosin | 32-256 | 64 | 128 | ≥ 32 | 0 |

4. TARTIŞMA

Mastitis, süt veriminde azalma, artan tedavi giderleri, yüksek oranda kesime sevk edilme ve ölümler nedeniyle süt sğırı yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olan meme dokusu hastalığıdır. Sığır mastitislerinden en sık izole edilen etkenlerin başında *Staphylococcus aureus* gelmektedir (Quinn ve ark 2004, Tel ve ark 2009). Bu çalışmada, sığırlarda mastitis olgularından izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının biyofilm oluşturma özellikleri ve antibiyotiklere direnç oranları araştırılmıştır.

S. aureus doğal dokularda ve medikal alet, implant gibi yabancı materyallerde biyofilm oluşumuna neden olarak tedavisi g infeksiyonlara yol açmaktadır. Biyofilm oluşumu en az üç basamakta gerçekleşmektedir. Başlangıç aşamasında mikroorganizmanın normal doku ve yabancı materyal yüzeyine adezyonu, ikinci aşamada yüzeylerde hücre proliferasyonu ve ekzopolisakkarit madde sentezi, üçüncü ve son aşamada içerisinde beslenme ve atıkların uzaklaştırılmasını sağlayan kanalların bulunduğu üç boyutlu bir yapı oluşmaktadır (Götz 2002).

Biofilm oluşturan Stafilokokların mastitis vakalarında görüldüğü durumlarda, hastalığın Şiddeti azalmakta, fakat etkenin meme dokusunda kolonize olma özelliğinde de artış gözlenmektedir. Bu nedenden dolayı biofilm formasyonunun, ilgili suşlarda meme dokusunda persistens olarak üreme açısından selektif avantaj sağladığı ortaya çıkmaktadır (Cucarella ve ark 2004).

Baselga ve arkadaşlarının (1993) yaptığı çalışma sonucu biyofilm üretme yeteneğine sahip olan *S. aureus* suşlarının, biyofilm oluşturmayan suşlara göre meme içi mukozal yüzeylere daha iyi bir Şekilde bağlandıkları ortaya konulmuştur. Götz ve arkadaşları ise (2002), intrasellüler adheziv polisakkarit üretme yeteneğinde olmayan suşların, saha suşlarına göre virulansının daha az olduğunu ortaya koymuşlardır. Böylelikle, meme içi dokulara daha iyi tutunan suşların, persistent infeksiyonlara daha sık yol açtığı belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada süt toplama ünitelerinden izole edilen suşların çoğunun biyofilm oluşturma özelliğinin olmadığı belirtilmiştir. Periyodik sanitasyon ve

hijyenik önlemlerin düzenli olarak alındığı işletmelerde Stafilokokal kolonizasyonun daha az oranda ortaya çıktığı bildirilmiştir.

Birçok türde, biyofilm anyonik yapıda olup esansiyel mineraller ve besinlerin etraftan yakalanarak yoğunlaştırılmasını sağlayan bir sistem oluşturmaktadır. Esasta, biyofilm 3 boyutlu çekim gücü oluşturup, bulunduğu bakteriyi çevreleyerek bakterinin aderansını ve korunmasını sağlamaktadır. Primer adezyon olarak adlandırılan, bir çok fizikokimyasal değişkenin rol oynadığı bu bağlanma geri dönüşümlü ve gevşek bir bağlanmadır. Bakteri ve uygun inert yüzeyler arasında oluşmaktadır. Adezyonun oluşması için öncelikle bakteri, inert yüzeye yeteri kadar yaklaşabilmelidir (<1nm). Bundan sonra adezyonun oluşumu her iki yüzeyin çekim ve itme gücüne bağlı olarak gelişmektedir. Burada elektrostatik, hidrofobik ilişki, van der Waals gücü, ısı ve hidrodinamik güç önemlidir. Bakterilerin hemen tümü ve inert yüzeyler negatif şarja sahip olup birbirleri için aslında itme gücü oluşturmaktadır. Primer aderansta en önemli faktörün bakteri ve yüzeyler arası hidrofobik ilişki olduğu bilinmektedir. Sekonder adezyon bakteri yüzeyindeki pili, fimbria veya fibriller gibi ligandların ökaryot hücrelerdeki spesifik ligandlara bağlanması ile oluşan özgül ve geri dönüşümsüz bağlanmadır. Biyofilmin maturasyonu, bakterinin yüzeye geri dönüşümsüz olarak yapışmasından sonra başlamaktadır. Biyofilm geliştikçe bakterinin aderans ve motilite faktörlerinin salınımında da baskılanma olmaktadır (Donlan 2002).

Baselga ve arkadaşları (1993) mastitisli sığırlardan izole edilen 92 *S. aureus* suşunun 11'inde (% 12) ve koyundan izole edilen 52 *S. aureus* suşunun 10'unda (% 19) biyofilm üretimini göstermişlerdir. 20 biyofilm üretmeyen suşun (10 sığır ve 10 koyundan elde edilen izolat) % 2 gukoz içeren TSB içerisinde bir ay süreyle taze besiyeri kullanılarak günlük pasajları sonucunda Kongo kırmızılı agar ve tüp yöntemiyle 3 sığır izolatı ve 4 koyun izolatının biyofilm üreten suşlara dönüştüğünü göstermişlerdir. Bunun tersi olarak biyofilm pozitif suşlarında glukoz içermeyen TSB içerisindeki pasajlarıyla 4 sığır izolatı ve 4 koyun izolatından biyofilm üretmeyen suşlar elde etmişlerdir. Oliveira ve arkadaşları (2006) ise mastitis infeksiyonlu sığırlardan izole edilen 16 *S. aureus* suşunun biyofilm oluşturma kapasitesini Kongo kırmızılı agar ve mikrotitrasyon plağı yöntemiyle değerlendirmişlerdir. Kongo kırmızılı agar besiyerinde 16 izolatın 6'sı (% 37.5) biyofilm

pozitif bulunurken, mikrotitrasyon plağı yöntemiyle 3'ü (% 18.75) pozitif bulmuşlardır. Yalnızca iki izolat her iki yöntemle de pozitif olarak değerlendirmişlerdir.

Stafilokokların sahip oldukları ekzotoksinler ve yüzey proteinleri yanında, biyofilm üretiminin önemli bir virulans faktörü olduğu bildirilmektedir (Vasudevan ve ark 2003). Vasudevan ve arkadaşları (2003), Kongo kırmızılı agar besiyeri kullanarak araştırdığı 35 *S. aureus* suşunun 32'sinde biyofilm pozitif gösterirken, mikrotitrasyon plağı yöntemiyle yalnızca 24'ünde biyofilm pozitif bildirmişlerdir. Mikrotitrasyon plağı yöntemiyle Kongo kırmızılı agar besiyerinde biyofilm negatif bulunan üç izolattan ikisini negatif, diğer suşu ise biyofilm pozitif değerlendirmişlerdir.

Mathur ve arkadaşları (2006) doku kültürü mikrotitrasyon plağı, tüp yöntemi ve Kongo kırmızılı agar besiyerinde 152 klinik *S. aureus* suşunu biyofilm oluşumu yönünden karşılaştırmışlardır. Mikrotitrasyon plağı yönteminde suşların 22'sini (% 14.4) güçlü, 60'ını (% 39.4) orta ve 70'ini de (% 46.0) biyofilm zayıf veya negatif olarak bulmuşlardır. Tüp yönteminde suşların 18'ini (% 11.8) güçlü, 45'ini (% 29.6) orta ve 89'unu (% 58.6) zayıf veya biyofilm oluşturmayan olarak bildirmişlerdir. Kongo kırmızılı agar besiyerinde 152 klinik *S. aureus* suşunu yalnızca 8'ini (% 5.2) biyofilm pozitif olarak göstermişlerdir. Bunların 6'sı orta, 2'si güçlü biyofilm oluşturan suşlar olarak bildirilmiştir.

Çalışmamızda ise 100 adet hayvandan elde edilen süt kökenli *S. aureus* izolatlarının ST yöntemleri ile biyofilm üretme yetenekleri araştırılmıştır. İncelenen 27 *S. aureus* suşunun ST testleri ile 18 (% 66.6)'i biyofilm üretimi yönünden pozitif bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar, daha önce bildirilen çalışmalar ile uyumluluk göstermektedir.

Mastitis patojenlerinin çeşitli antimikrobiyal maddelere in vitro duyarlılıklarının tespitine yönelik sıvı dilüsyon yöntemi kullanarak yaptıkları bir araştırmada; *Staphylococcus aureus* suşlarının tamamının, kloksasilin, eritromisin, seftiofur ve sefapirine duyarlı bulunduğunu, MİK50 ve MİK90 değerlerinin de 0.25-0.5 µg/ml, 0.25-0.5 µg/ml, 1.0-2.0 µg/ml ve 0.125-0.25 µg/ml olarak tespit edildiğini rapor etmektedirler. Araştırmacılar, *Staphylococcus aureus* suşlarının tamamının penisiline dirençli bulunduğunu, penisilin için MİK50 ve MİK90 değerlerinin de ≤0.06-0.125 µg/ml olarak tespit edildiğini bildirmektedirler (Owens ve ark 1997). Araştırmamızda da benzer bir

şekilde sefalosprobinlere karşı duyarlılık ve penisiline karşı gelişen bir direnç ortaya çıkmıştır.

Giannechini ve arkadaşlarının (2002) Uruguay'da bazı mastitis patojenlerinin çeşitli antimikrobiyal maddelere in vitro duyarlılığının tespitine yönelik yaptıkları bir araştırmada, *Staphylococcus aureus* suşlarına yönelik MİK50-MİK90 değerlerini; penisilin için 0.5->8.0 µg/ml, ampisilin için, 0.5-8.0 µg/ml, oksitetrasiklin için 2.0->64 µg/ml olarak rapor etmektedirler. Penisilin, ampisilin ve oksitetrasiklin için rapor edilen MİK değerlerinin, bu araştırmada aynı antimikrobiyal maddeler için tespit edilen MİK değerlerinden daha yüksek olmasına rağmen, sunulan bu araştırmada elde edilen bulgulara benzer şekilde, *Staphylococcus aureus* suşlarının % 47.6'sının penisiline, % 46.7'sinin ampisiline, % 13.4'ünün oksitetrasikline dirençli bulunduğu bildirmektedirler.

Pitkälä ve arkadaşlarının (2004) Finlandiya'da izole edilen bazı mastitis patojenlerinin çeşitli antimikrobiyal maddelere in vitro duyarlıklarının tespitine yönelik yaptıkları diğer bir araştırmada, *Staphylococcus aureus* suşuna yönelik MİK50 ve MİK90 54 değerlerinin; sefalotin için 0.25-0.5 µg/ml, eritromisin için 0.5-0.5 µg/ml ve oksasilin için 1.0-2.0 µg/ml, oksitetrasiklin için 1.0-1.0 µg/ml olarak bulunduğu ve incelenen suşların % 52.1'inin penisiline, % 5.12'inin oksitetrasikline % 1.5'inin eritromisine ve % 4.1'inin de oksasiline dirençli olduğu rapor edilmektedir. Elde edilen bulgular, penisilin, oksasilin ve eritromisin dirençliliği açısından çalışmamızda saptanan veriler ile benzerlik göstermektedir.

5. SONUÇ

Araştırmamız için 2012 Eylül-Aralık tarihleri arasında, Aydın ili ve çevresinde bulunan, bulunan işletmelerde laktasyon döneminde olan 100 ineğin her birinden süt örnekleri tekniğine uygun olarak alınıp Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına soğuk zincirde getirilmiştir. İzole edilen etkenlerin tür düzeyinde identifikasyonları fenotipik özellikleri incelenerek gerçekleştirilmiştir.

İncelenen 100 örneğin toplam 27'sinde (% 27) *S. aureus* izolasyonu gerçekleştirilmiştir. 27 adet *S. aureus* suşunun ST testleri ile 18 (% 66.6)'i biyofilm üretimi yönünden pozitif bulunmuştur. Sonuç olarak subklinik inek mastitislerinden izole edilen *S. aureus* suşlarının yüksek oranda biyofilm üretme özelliğinin olduğu, biyofilm oluşumunun Stafilokokal infeksiyonlarda önemli bir virulans faktörü olduğu, standart tüp yönteminin biyofilm oluşturan *S. aureus* suşlarını saptamada pratik olduğu ortaya konulmuştur.

Ayrıca, Stafilokokal patojenlere karşı tedavide kullanılan antimikrobiyal maddelere yönelik elde edilen MİK değerlerinin, ülkemizde bu konuda yapılacak çalışmalar ile veteriner klinik laboratuvar standartlarının oluşturulmasına yönelik yapılacak çalışmalara da katkı sağlayacağı kanısına varılmıştır. Özellikle sahadan izole edilmiş olan *S. aureus* suşlarında tetrasiklin, penisilin ve ampisilin gibi antibiyotiklere karşı oluşan yüksek direnç oranı göz önüne alındığında yetiştiricilerin ve pratisyen Veteriner Hekimlerin uygun antibiyotik kullanımı açısından bilgilendirilmesi gerektiği ortaya çıkmaktadır.

ÖZET

Sığır Mastitislerinden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarında Biofilm Oluşumu ve Antibiyotiklere Dirençliliğinin Belirlenmesi

Bu araştırmada 2012 Eylül-Aralık tarihleri arasında, Aydın ili ve çevresinde bulunan işletmelerde laktasyon döneminde olan 100 ineğin her birinden süt örnekleri tekniğine uygun olarak alınıp Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına soğuk zincirde getirilmiştir. İzole edilen etkenlerin tür düzeyinde identifikasyonları fenotipik özellikleri incelenerek gerçekleştirilmiştir.

İncelenen 100 örneğin toplam 27'sinde (% 27) *S. aureus* izolasyonu gerçekleştirilmiştir. 27 adet *S. aureus* suşunun ST testleri ile 18 (% 66.6)'i biyofilm üretimi yönünden pozitif bulunmuştur.

Agar dilüsyon yöntemi ile incelenen 27 adet *Staphylococcus aureus* suşunun tamamı (% 100) sefuroksim, sefotaksim, sefalotin, enrofloksasin ve novobiosine karşı duyarlı bulunmuştur. İzole edilen suşlarda penisilin G için % 74, ampisilin için % 66, tetrasiklin için % 81 oranında direnç oluşumu tespit edilmiştir. Ayrıca eritromisin için % 4, oksasilin için % 7 ve amoksisilin+klavulonik asit için % 4 gibi düşük direnç gelişimleri de tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Mastitis, *Staphylococcus aureus*, biyofilm, antibiyotik duyarlılığı

SUMMARY

Determination of Biofilm Formation and Antibiotic Resistancy of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated From Cattle Mastitis

In this study, milk samples were collected from 100 lactating cows by adequate technique from various milking stations which are found around Aydın region and the milk samples were brought to Adnan Menderes University Faculty Of Veterinary Medicine Department of Microbiology in cold chain. The species identification of the isolated bacteria was performed by investigation of their phenotypical properties.

As a result of investigated 100 milk samples, a total of 27 (27 %) *S. aureus* strains were isolated. 18 (66.6 %) of the isolated *S. aureus* strains were found biofilm formation positive by Standard Tube (ST) test.

All of 27 (100 %) *S. aureus* strains, which were investigated by agar dilution method, were susceptible to cefuroxime, cefataxime, cefalothin, enrofloxacin and novobiosin. The isolated strains formed resistancy against penicillin G in the ratio of 74 %, against ampicillin in the ratio of 66 % and against tetracyclin in the ratio of 81 %. Beyond, low resistancy formations against erythromycin in the ratio of 4 %, against oxacillin in the ratio of 7 % and against amoxycillin-clavulonic acid in the ratio of 4% were determined.

Keywords: Mastitis, *Staphylococcus aureus*, biofilm, antibiotic susceptibility

KAYNAKLAR

- Akan M. *Staphylococcus* infeksiyonları. Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). Ed. Nejat Aydın, Jale Paracıkoğlu. İlke Emek Yayınları, Ankara 2006.
- Akay Ö ve Aydın N. Stafilokokal Mastitisler. I. Mastitis Semineri, Ankara, 1984
- Anderl JN, Franklin MJ, Stewart PS. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemotherapy* 2000; 44, 1251-1256.
- Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2001; 48, 5-16.
- Arciola C.R, Baldassarri L, Montanaro L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of *Staphylococcal* strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol* 2001; 39, 2151-2156.
- Arda H, Minbay A, Leloğlu N, Aydın N, Kahraman M, Akay Ö, Ilgaz A, İzgür M, Diker KS. Özel Mikrobiyoloji 4.Baskı, Ankara: Medisan Yayın Serisi No:26 1997; s. 31-44
- Balaban N and Rasooly A. *Staphylococcal* enterotoxins. *Int J Food Microbiol* 2000; 61, 1-10.
- Baron EJ and Finegold SM. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*, 8th Ed., The C.V. Mosby Company, St Louis, Baltimore, Philadelphia, Toronto 1990.
- Baselga R, Albizu I, Cruz MDL, Cacho ED, Barberan M, Amorena B. Phase Variation of Slime Production in *Staphylococcus aureus*: Implications in Colonization and Virulence. *Infection and Immunity* 1993; 61: 4857-4862.
- Baştan A. İneklerde meme hastalıkları. 1. Baskı, Hatiboğlu Yayınevi, Ankara 2002.
- Bilgehan H. Klinik Mikrobiyoloji. Özel. Bakteriyoloji ve Bakteri İnfeksiyonları. 8. Basım, Fakülteler Kitabevi, İzmir, Eylül, 1993; s.186-210
- Blood DC ve Radostis OM. *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs and horses*. Bailliere Tindall, London, 1989.
- Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 1999; 37, 1771-1776.
- Clinical and Laboratory Standarts Institute. Antimikrobik Duyarlılık Testleri için Uygulama Standartları, Onyedinci Bilgi Eki, Editör, D Gür, M100-S17, cilt 27, Sayı 1, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara 2007.
- Clutterbuck AL, Woods EJ, Knottenbelt DC, Clegg PD, Cochrane CA, Percival SL. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet Microbiol* 2007; 121, 1-17.

- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284, 1318-1322
- Cremonesi P, Luzzana M, Brasca M, Morandi S, Lodi R, Vimercati C, Agnellini D, Caramenti G, Moroni P, Castiglioni B. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. *Mol Cell Probes* 2005; 19, 299-305.
- Cucarella C, Tormo MA, U ´ beda C, Trotonda MP, Monzo ´ n M, Peris C, Amorena B, Lasa I, Penade ´ s JR. Role of biofilm-associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Inf. Imm* 2004; 72, 2177–2185.
- De Graves FJ, Fetrow J. Economics of Mastitis Control. *Vet. Clin. North Am: Food Animal Practice* 1993; 9, 421-434.
- Donlan RM. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 881-890.
- Gillespie BE, Owens WE, Nickerson SC, Oliver S. Deoxyribonucleic acid fingerprinting of *Staphylococcus aureus* from heifer mammary secretions and from horn flies. *J Dairy Sci* 1999; 82, 1581-1585.
- Erganiş O ve Uçan US. *Veteriner Epidemiyoloji*. 2. Baskı, Mimoza Yayınları, Konya 2001
- Ergün Y, Aslantaş Ö, Cantekin Z, Doğruer G. Hatay ilindeki aile tipi süt sığırcılığı işletmelerinde subklinik mastitislerin epidemiyolojisi. *Vet Bil Derg* 2004; 20, 25-28.
- Fitzpatrick F, Humphreys H, O’Gara JP. The genetics of staphylococcal biofilm formation-will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection?. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11, 967-973.
- Giannechini R, Concha C, Rivero R, Delucci I, Moreno López J (2002) : Occurrence of clinical and subclinical mastitis in dairy herds in the West Littoral Region in Uruguay. *Acta Vet Scand*, 43, 221-230.
- Goh SH, Byrne SK, Zhang JL, Chow AW. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. *J Clin Microbiol* 1992; 30, 1642-1645.
- Götz F. *S. aureus* and Biofilms. *Mol Microbiol* 2002; 43: 1367-1378.
- 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. *J Dairy Sci* 2005; 88, 3149-54.
- Gürtürk K, Boynukara B, Ekin İE, Gülhan T. Van ve yöresindeki ineklerde subklinik mastitisin etiyolojisi üzerine bir çalışma. *Y.Y.Y. Vet Fak Derg* 1998; 9, 1-4.
- Hadimli HH ve Erganiş O. Mastitis ve bağışıklık. *Veterinarium* 2001; 13(1), 37-42.
- Harraghy N, Kerdudou S, Herrmann M. Quorum-sensing in Staphylococci as therapeutic targets. *Anal Bioanal Chem* 2007; 387, 437-444).
- Heilmann C, Hussain M, Peters G, Gotz F. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol Microbiol* 1997; 24, 1013-1024.

Hutton CT, Fox LK, Hancock DD. Mastitis control practices: Differences between herds with high and low milk somatic cell counts. J Dairy Sci 1990; 73(4), 1135-1143.

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

Kireççi E. Erzurum yöresinde klinik ve subklinik mastitisli inek sütlerinden izole edilen stafilokok türlerinin tanımlanması, patojenite testleri, beta-laktamaz aktiviteleri ve antibiyotik duyarlılıkları. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzurum 2004.

Koneman, EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 5th Ed., Lippincott Williams and Wilkins, Wolters Kluwe Company, Philadelphia, PA, USA 1997.

Kong KF, Vuong C, Otto M. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. Int J Medical Microbiol 2006; 296, 133-139).

Kuyucuoğlu Y, Uçar M. Afyon bölgesi süt ineklerinde subklinik ve klinik mastitislerin görülme oranları ve etkili antibiyotiklerin tespiti. Vet. Hek. Mikrobiol. Derg. 2001; 1,19-24.

Lasa I, Penadés JR. Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. Mini-review. Res Microbiol 2006; 157, 99-107.

Lightbown JW, Kogut M and Grab B. The international standart for novobiocin, Bull. Wld Hlth Org. 1966; 34, 285-292.

Lyon GJ, Novick RP. Peptid signalling in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. Peptides 2004; 25, 1389-140.

Mack D, Becker P, Chatterjee I, Dobinsky S, Knobloch JKM, Peters G, Rohde H, Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. Can J Vet Res 2002; 66, 86-92.

Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay DJ, Fatma T, Rattan A. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: An evaluation of three different screening methods. Indian J Med Microbiol 2006; 24: 25-29.

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

Milner P, Page KL, Hillerton JE. The Effects of early antibiotic treatment following diagnosis of mastitis detected by a change in the electrical conductivity of milk J Dairy Sci 1996; 80(5), 859-863.

Murray PR, Patrick R. Manuel of clinical microbiology, 8th ed. Clinic Microbiology, Bölüm 1. Washington DC: ASM Press 2003.

Oliveira M, Bexiga R, Nunes SF, Carneiro C, Cavaco LM, Bernardo F, Vilela CL. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet Microbiol* 2006; 118: 133-140.

Owens WE, Watts JL, Greene BB and Ray CH. Minimum inhibitory concentrations and disk diffusion zone diameter for selected antibiotics against streptococci isolated from bovine intramammary infections, *J. Dairy Sci.* 1990; 73, 1225-1231.

Özmen Ö. Mastitislerde etiyopatogenez. Süt inekçiliğinde Mastitis Sempozyumu, Akdeniz Üniv Vet Fak Yayın Ünitesi Yayın No: 2, 04-05 Mayıs, Burdur, 2001; 21-29.

Piepers S, De Meulemeester L, de Kruif A, Opsomer G, Barkema HW, De Vliegher S. Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. *J Dairy Res* 2007; 74, 478-483.

Pitkälä A, Haveri M, Pyörälä S, Myllys V, Honkanen-Buzalski T. Bovine mastitis in Finland 2001-prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *J Dairy Sci* 2004; 87, 2433-41.

Quinn PJ, Carter ME, McKey B, Carter GR. *Clinical Veterinary Microbiology*. Spain, Wolfe Pub 1994.

Riffon R, Sayasith K, Khalil H, Dubreuil P, Drolet M, Lagace J. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39, 2584-2589.

Roberson JR, Fox LK, Hancock DD, Gay CC, Beser TE. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. *J Dairy Sci* 1994; 77, 3354-3364.

Schleifer KH. Gram Positive Cocci. "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 1". Ed. PHA Sneath, NS Mair, ME Sharpe, JG Holt. Williams and Wilkins, Baltimore 1986.

Stewart PS. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol* 2002; 292, 107-113.

Şanlı Y. Mastitis sağıtımında kemoterapötik ilaç seçenekleri ve meme içi farmakokinetik. I. Mastitis Semineri, Ankara 1984.

Şahin R. *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 2007.

Tel OY, Keskin O, Zonturlu AK, Arserim Kaya N. Şanlıurfa yöresinde subklinik mastitislerin görülme oranı aerobik bakteri izolasyonu ve duyarlı antibiyotiklerin belirlenmesi. *F Ü Sağ Bil Vet Derg* 2009; 23, 101 - 106.

Tenhagen BA, Köster G, Wallmann J, Heuwieser W. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J Dairy Sci* 2006; 89, 2542-2541.

Türütoğlu H, Ateşoğlu A, Salihlioğlu H, Öztürk M. Marmara bölgesi süt ineklerinde mastitise neden olan etkenler. Pendik Vet Mikrobiyol Derg 1995; 26, 125-137.

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

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

Vuong C, Saenz HL, Gotz F, Otto M. Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis 2000; 182, 1688-1693.

Workineh S, Bayleyegn M, Mekonnen H, Potgieter LN. Prevalence and aetiology of mastitis in cows from two major Ethiopian dairies. Trop Anim Health Prod 2002; 34, 19-25.

Wilson DJ, Gonzalez. RN, Sears PM. 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 1995; 78(9), 2083-2085.

Winn WC, Koneman EW, Allen SD, Procop GW, Schreckenberger PC, Janda WM and Woods GL. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th ed, Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia 2006.

Yavuz MK, Esenal ÖM. Mastitisli inek sütlerinden izole edilen Stafilokokların tür düzeyinde identifikasyonu ve bazı özelliklerinin belirlenmesi. Etlik Vet. Mikrobiyal Derg 2002; 13, 19-27.

Yancey RJ. Recent Advances in Bovine Vaccine Technology. J Dairy Sci 1993; 76(8), 2418-2436.

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Mersin’de doğdum.Namık Kemal İlkokulunu (1994), Pirireis Ortaokulunu (1997),Tevfik Sırrı Gür Süper Lisesini (2001), Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesini (2008), Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Dış Ticaret Programını (2012) bitirdim. 2012 yılında Anadolu Üniversitesi İktisat Fakültesi Uluslararası İlişkiler bölümünü, 2013 yılında Atatürk Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Adalet Programını kaydoldum. Askerliğimi 2009 yılında Kırklareli 55.Mknz.Piyade Tugayı’nda Gıda Kontrol ve Hijyen Denetim Subayı olarak yaptım. 2010 yılından beri Karpuzlu Gıda Tarım ve Hayvancılık İlçe Müdürlüğü Gölcük Köyünde Tarım Danışmanı Veteriner Hekim olarak görev yapmaktayım.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez konusunun seçimi ve çalışmaların yürütülmesinde gerek deneyimi ve gerekse yönlendirmeleri ile çalışmalarımın doğru yürümesini sağlayan danışmanım Prof. Dr. Osman KAYA'ya, çalışmalarımda desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Şükrü KIRKAN'a, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri değerli hocalarım ile Araştırma Görevlisi Dr. Uğur PARIN'a, çalışmalarımda desteklerini gördüğüm Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı Başkanı Yrd. Doç. Dr. E. Sedat ARSLAN'a ve çalışmalarımda manevi destek veren değerli anne ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.