

**GIDA ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN
STAPHYLOCOCCUS’LARDA BİYOFİLM OLUŞUMU
VE ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Özlem ATAOL

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HAZİRAN 2011

ANKARA

Özlem ATAOL tarafından hazırlanan GIDA ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN *STAPHYLOCOCCUS*'LARDA BİYOFİLM OLUŞUMU VE ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Doç.Dr.Neslihan GÜNDOĞAN
Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

.....

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç.Dr. Sumru ÇITAK
Biyoloji Anabilim Dalı, G.Ü.

.....

Doç.Dr.Neslihan GÜNDOĞAN
Biyoloji Anabilim Dalı, G.Ü.

.....

Doç. Dr. Demet Çetin
Fen Bilgisi Eğitimi Anabilim Dalı, G.Ü.

.....

Tarih: 23/06/2011

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Prof.Dr.Bilal TOKLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

.....

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Özlem ATAOL

GIDA ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN
***STAPHYLOCOCCUS*'LARDA BİYOFİLM OLUŞUMU**
VE ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI
(Yüksek Lisans Tezi)

Özlem ATAOL

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2011

ÖZET

Bu çalışmada, Ankara'daki çeşitli süpermarketlerden toplanan 56 dana kıyma, 56 tavuk but, 56 beyaz peynir örneği, süt fabrikasından temin edilen 56 çiğ süt örneği ve çeşitli semtlerdeki pastanelerden temin edilen 56 dondurma örneği materyal olarak kullanılmıştır. Çalışılan 280 gıda örneğinden izole edilen 209 Stafilokok suşunun tanımlamaları yapılarak, mikrotitre plak ve kongo kırmızılı agar yöntemleriyle biyofilm oluşumu ve Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine göre çeşitli antibiyotik dirençlilikleri araştırılmıştır.

Tanımlanan Stafilokok suşlarının; %16,3'ü koagülaz pozitif Stafilokok, %83,7'si koagülaz negatif Stafilokok olarak tespit edilmiştir. Koagülaz pozitif Stafilokok suşlarının; %8,1'i *S.aureus*, %1,9'u *S.hyicus* ve %6,2'si *S.intermedius*, koagülaz negatif Stafilokok suşlarının; %22'si *S.cohnii*, %16,3'ü *S.hominis*, %17,2'si *S.xylosus*, %9,5'i *S.simülans*, %6,2'si *S.capitis*, %4,3'ü

S.haemolyticus, %3,3'ü *S.epidermidis*, %2,8'i *S.auricularis*, %1,4'ü *S.warneri* ve %0,5'i *S.saprophyticus* olarak tespit edilmiştir. Suşların %77,5'inin mikrotitreplak yöntemiyle, %40,2'sinin kongo kırmızılı agar yöntemiyle biyofilm oluşumları pozitif olarak saptanmıştır. Suşların; %32,1 i ampisilin'e, %29,2'si tetrasiklin'e, %21,1'i eritromisin'e, %19,1'i metisilin'e, %7,7'si amikasin'e, %7,7'si kloromfenikol'e, %6,7'si gentamisin'e ve %4,8'i klindamisin'e dirençli bulunmuştur. Çalışılan suşlarda vankomisin'e direnç tespit edilmemiştir.

Çalışmamızda kullanılan çeşitli gıda örneklerinde birden fazla Stafilokok türünün tespit edilmesi, gıda hazırlanmasında gerekli hijyenik kurallara uyulmadığının bir göstergesidir. Çalışma sonuçlarımızda birden fazla antibiyotiğe direnç ile karşılaşılması halk sağlığı açısından önemli bir risk taşımaktadır. Sonuçlarımız antibiyotiklere yüksek oranda direnç göstermesede biyofilm üreten suşlardai üretmeyen suşlara oranla azda olsa daha yüksek dirence rastlanmıştır.

Bilim Kodu :203.1.010

Anahtar Kelimeler: Stafilokok, İzolasyon, İdentifikasyon, biyofilm oluşumu

Sayfa Adedi :146

Tez Yöneticisi : Doç.Dr. Neslihan GÜNDOĞAN

**THE BIOFILM PRODUCTION OF STAPHYLOCOCCUS
ISOLATED FROM FOOD SAMPLES AND
THE RESEARCH FOR THEIR ANTIBIOTIC RESISTANCES
(M.Sc Thesis)**

Özlem ATAOL

**GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCES**

June 2011

ABSTRACT

In this study, 112 meat samples (minced meat and chicken drumstick) from various supermarkets in Ankara, 56 soft white cheese samples, 56 raw milk samples from milk facilities and 56 icecream samples from bakeries at different localities are collected and are examined as materials. The 209 *Staphylococcus* isolates are identified from 280 food samples, and the biofilm production of them studied by Congo red agar methods and microtiter plate, and the antibiotic resistances are examined by Kirby-bauer diffusion method.

The 16.3% of identified *Staphylococcus* strains are determined as coagulase positive, 83.7% of are determined as coagulase negative. The distribution of coagulase positive *Staphylococcus* strains in species are assigned as 8.1% *S.aureus*, 1.9% *S.hyicus* and 6.2% *S.intermedius*. On the other hand, the

distribution of coagulase negative *Staphylococcus* strains in species are assigned as 22% for *S.cohnii*, 16.3% for *S.hominis*, 17.2% for *S.xylosus*, 9.5% for *S.simulans*, 6.2% for *S.capitis*, 4.3% for *S.haemolyticus*, 3.3% for *S.epidermidis*, 2.8% for *S.auricularis*, 1.4% for *S.warneri* and 0.5% for *S.saprophyticus* . In this study, 77.5% and 40.2% of the strains are determined as positive by microtiter plate methods and congo red agar methods, respectively. According to the result of tested antibiotics, the 32.1% of isolates are resistant to ampicillin, the 29.2% of isolates are resistant to tetracycline, 21.1% of isolates are resistant to erythromycin, 19.1% isolates are resistant to methicillin, 7.7% of isolates are resistant to amikacin, 7.7% of isolates are resistant to chloramphenicol, 6.7% of isolates are resistant to gentamycin and 4.8% of isolates are resistant to clindamycin. Among studied strains there is no strain results; any is determined as resistant to vancomycin.

The detection of more than one strain of *Staphylococcus* in examined food samples demonstrates that the required hygiene practices in food preparations are not obeyed. The recorded resistance in examined samples for more than one antibiotic indicates that it poses an important risk for public health. Although the results of study do not give resistance to antibiotics in high levels, the resistance observed in biofilm producing strains is in higher degrees relative to non-producing strains.

Science code :203.1.010

Keywords : *Staphylococcus*, Isolation, Identification, biofilm production

Page number : 146

Adviser : Assoc. Prof. Dr Neslihan GÜNDOĞAN

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarını, maddi ve manevi her türlü desteğini benden esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Neslihan GÜNDOĞAN ‘a, yine çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen sayın hocalarım Prof. Dr.Nihal YÜCEL’e ve Doç.Dr. Sumru ÇITAK’a, laboratuvarıda başta asistan hocamız Dr. Ebru YILMAZ olmak üzere büyük bir uyum içinde çalıştığım ve her türlü maddi ve manevi desteklerini gördüğüm sevgili arkadaşlarıma ve her zaman yanımda olan aileme tüm katkılarından dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
2.KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1.Stafilokok Sınıflandırması ve Tarihçesi	3
2.2.Stafilokokların genel özellikleri.....	4
2.3.Stafilokokların virülans faktörleri.....	7
2.3.1.Koagülaz	7
2.3.2.Mannitol fermentasyonu	8
2.3.3. Glukoz fermentasyon.....	8
2.3.4. Clumping faktör	8
2.3.5. Hemoliz	8
2.3.6. Pigmentasyon	8
2.3.7. Dnase	9
2.3.8. TNase	9
2.3.9. Üreaz.....	10
2.3.10. Stafilokinaz	10
2.3.11. Lipaz.....	10
2.3.12. Protein A testi.....	10
2.4.Stafilokokların antibiyotik direnci	11
2.4.1.Beta-laktam antibiyotiklere direnç	14
2.4.2.Non- beta-laktam antibiyotiklere direnç	17

Sayfa

2.5.Stafilokoklarda antibiyotik direnci	18
2.6.Biyofilm ve antibiyotik direnci	21
2.7. Biyofilm.....	23
2.7.1.Biyofilmin tarihçesi.....	23
2.7.2. Biyofilm ve önemi	24
2.7.3. Bakteriler neden biyofilm oluşturur?.....	26
2.7.4. Biyofilm yapısı ve genel özellikleri	27
2.7.5. Biyofilm oluşum mekanizması	29
2.7.6. Quorum sensing.....	33
2.7.7. Biyofilm oluşumunun klinik olarak önemi.....	37
2.7.8. Biyofilm oluşumunun gıda endüstrisi açısından önemi.....	43
3.MATERYAL VE METOT	47
3.1. Örnek alma ve örneklerin analize hazırlanması	47
3.2. Stafilokokların izole edilmesi.....	48
3.3. Stafilokok izolatının tanımlanması	51
3.4. Stafilokok suşlarının Kirby Bauer Disk Difüzyon Yöntemiyle Antibiyotik Duyarlılıklarının Test edilmesi	60
3.5. Stafilokok suşlarının Biyofilm üretiminin saptanması	62
4.BULGULAR	66
4.1. Gıdalardan izole edilen Stafilokokların dağılımı	66
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	110
KAYNAKLAR.....	130
ÖZGEÇMİŞ.....	148

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 1.1. Stafilocokların biyokimyasal özellikleri.....	6
Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan antibiyotik çeşitleri	52
Çizelge 4.1. Gıda örneklerinden izole edilen Stafilocokların örnek türüne göre dağılımı	57
Çizelge 4.2. Gıda örneklerinden izole edilen KPS ve KNS sayıları.....	58
Çizelge 4.3. Gıda örneklerinden izole edilen KPS'lerin örnek türüne göre dağılımı.....	59
Çizelge 4.4. Gıda örneklerinden izole edilen KNS'lerin örnek türüne göre dağılımı.....	60
Çizelge 4.5. Dana kıyma örneklerinden İzole edilen Stafilocokların tür bazında dağılımları.....	61
Çizelge 4.6. Tavuk but örneklerinden izole edilen Stafilocokların tür bazında dağılımları.....	61
Çizelge 4.7. Çiğ süt örneklerinden izole edilen Stafilocokların tür bazında dağılımı	62
Çizelge 4.8. Dondurma örneklerinden izole edilen Stafilocokların tür bazında dağılımı.....	62
Çizelge 4.9. Peynir örneklerinden izole edilen Stafilocokların tür bazında dağılımı.....	63
Çizelge 4.10. Toplam 209 Stafilocok suşunun mikrotitreplak yöntemiyle biyofilm oluşumu test sonuçları.....	64
Çizelge 4.11. Dana kıyma örneklerinden izole edilen Stafilocoklarda yapılan biyofilm çalışması sonuçları (mikrotitreplak yöntemi).....	64

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.12. Tavuk but örneklerinden izole edilen Stafilocoklarda yapılan biyofilm çalışması sonuçları (mikrotitreplak yöntemi)	67
Çizelge 4.13. Çiğ süt örneklerinden izole edilen Stafilocoklarda yapılan biyofilm çalışması sonuçları (mikrotitreplak yöntemi).....	69
Çizelge 4.14. Dondurma örneklerinden izole edilen Stafilocoklarda yapılan biyofilm çalışması sonuçları (mikrotitreplak yöntemi).....	71
Çizelge 4.15. Peynir örneklerinden izole edilen Stafilocoklarda yapılan biyofilm çalışması sonuçları (mikrotitreplak yöntemi)	72
Çizelge 4.16. Stafilocok türlerinin mikrotitreplak yöntemiyle biyofilm oluşumlarının düşük-orta ve yüksek değerde oluşumu	74
Çizelge 4.17.Toplam 209 Stafilocok suşunun Kongo kırmızılı agar (CRA) yöntemi ile biyofilm oluşumları	75
Çizelge 4.18. Gıda örneklerinden izole edilen CRA yöntemi biyofilm oluşumu	75
Çizelge 4.19. Kıyma örneklerinden izole edilen Stafilocok türlerinin CRA test sonucu.....	76
Çizelge 4.20. Tavuk but örneklerinden izole edilen Stafilocok türlerinin CRA test sonucu.....	77
Çizelge 4.21. Çiğ süt örneklerinden izole edilen Stafilocok türlerinin CRA test sonucu.....	78
Çizelge 4.22. Dondurma örneklerinden izole edilen Stafilocok türlerinin CRA test sonucu.....	79
Çizelge 4.23. Peynir örneklerinden izole edilen Stafilocok türlerinin CRA test sonucu.....	80
Çizelge 4.24. Toplam 209 Stafilocok suşunun Kongo kırmızılı agar ve mikrotitreplak yöntemi ile biyofilm üretimleri.....	81

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.25. Dana kıyma örneklerinden izole edilen Stafilocok türlerinin biyofilm test sonuçları.....	81
Çizelge 4.26. Tavuk but örneklerinden izole edilen Stafilocok türlerinin biyofilm test sonuçları.....	82
Çizelge 4.27. Çiğ süt örneklerinden izole edilen Stafilocok türlerinin biyofilm test sonuçları.....	83
Çizelge 4.28. Dondurma örneklerinden izole edilen Stafilocok türlerinin biyofilm test sonuçları.....	83
Çizelge 4.29. Peynir örneklerinden izole edilen Stafilocok türlerinin biyofilm test sonuçları.....	84
Çizelge 4.30. Stafilocok türlerinin mikrotitreplak yöntemi (MP) ve CRA yöntemleriyle biyofilm oluşumlarının karşılaştırılması.....	85
Çizelge 4.31. Gıdalardan izole edilen Stafilocok türlerinin MP ve CRA yöntemleri ile biyofilm oluşumları.....	85
Çizelge 4.32. Dana kıyma örneklerinden izole edilen Stafilocok türlerindeki antibiyotik dirençliliği.....	87
Çizelge 4.33. Tavuk but örneklerinden izole edilen Stafilocok türlerindeki antibiyotik dirençliliği.....	88
Çizelge 4.34. Çiğ süt örneklerinden izole edilen Stafilocok türlerindeki antibiyotik dirençliliği.....	89
Çizelge 4.35. Dondurma örneklerinden izole edilen Stafilocok türlerindeki antibiyotik dirençliliği.....	90
Çizelge 4.36. Peynir örneklerinden izole edilen Stafilocok türlerindeki antibiyotik dirençliliği.....	91
Çizelge 4.37. Gıda örneklerinden izole edilen Stafilocok türlerinin antibiyotik dirençliliği.....	92

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.38. Dana kıyma örneklerinden izole edilen biyofilm (+) ve (-)	
Stafilokokların çeşitli antibiyotiklere dirençlilikleri	93
Çizelge 4.39. Tavuk but örneklerinden izole edilen biyofilm (+) ve (-)	
Stafilokokların çeşitli antibiyotiklere dirençlilikleri.....	94
Çizelge 4.40.Çiğ süt örneklerinden izole edilen biyofilm (+) ve (-)	
Stafilokokların çeşitli antibiyotiklere dirençlilikleri.....	95
Çizelge 4.41. Dondurma örneklerinden izole edilen biyofilm (+) ve (-)	
Stafilokokların çeşitli antibiyotiklere dirençlilikleri.....	96
Çizelge 4.42.Peynir örneklerinden izole edilen biyofilm (+) ve (-)	
Stafilokokların çeşitli antibiyotiklere dirençlilikleri.....	97

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 1.1. Biyofilm oluşum aşamaları	27
Resim 3.1. Katalaz testi pozitif ve negatif sonuçları.....	45
Resim 3.2. VP testi pozitif ve negatif sonuçları	47
Resim 3.3. Üreaz testi pozitif ve negatif test sonuçları	49
Resim 3.4. Karbonhidrat testi pozitif ve negatif test sonuçları	51
Resim 4.5. Antibiyotik direnç test sonucu	53
Resim 4.6. Stafilokok izolatlarını miktoplate içerisinde 37 °C’de 24 saatlik İnkübasyonu.....	55
Resim 4.7. Kristal viyole ile yapılan boyama	55
Resim 4.8. Kongo kırmızılı agarda biyofilm oluşumu.....	56

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
Cfu	Colony forming unit
°	Derece
gr	Gram
H₂O₂	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik asit
Kd	Kilodalton
Log	Logaritma
Lt	Litre
μ	Mikron
ml	Mililitre
N	Normal
C	Santigrat
NaCl	Sodyum klorür

Kısaltmalar	Açıklama
BHIA	Brain heart infusion agar
BHIB	Brain heart infusion agar
CF	Clumping factor
CRF	Koagülaz reaction factor
IgG	İmmünoglobilin G
IgM	İmmünoglobilin M
KNS	Koagülaz negatif <i>Staphylococcus</i>
MSA	Mannitol salt agar
MRSA	Metisilin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MRKNS	Metisilin dirençli koagülaz negatif <i>Staphylococcus</i>
MHA	Müller hinton agar
PBP	Penisilin bağlayan protein
SEM	Scanning electron mikroskop
S.aureus	<i>Staphylococcus aureus</i>
TSA	Trypticase soy agar

1.GİRİŞ

Stafilokoklar, doğada çok yaygın olarak bulunan bakterilerdir. Bir çok enfeksiyonda primer ve sekonder etken olarak bulunurlar. Bu nedenle, patojen ve potansiyel patojen olanların, hastalık yapmayanlardan ayrılması gerekir.

Staphylococcus aureus antibiyotiklerin henüz keşfedilmediği dönemlerde çok ağır seyreden, tedavisi güç, ölümcül enfeksiyonlara neden olmaktadır. Günümüzde nozokomiyal patojenler arasında önemi giderek artmaktadır [Kutlu, 2006].

Gıda zehirlenme etkenlerinden biri olan *S. aureus*; et, et ürünleri, süt ve süt ürünlerinde önemli bir risk kaynağıdır. Son 10 yıl içinde bütün dünyada önemli bir artış gösteren gıda enfeksiyon ve intoksikasyonları arasında tavuk etlerinden kaynaklananlar önemli bir yer tutmaktadır. Örneğin, ABD, Kanada, İngiltere, Galler ve İskoçya'da nedeni belirlenen gıda enfeksiyonlarının %9,8-54 oranlarında tavuk ürünlerinden olduğu bildirilmiştir[Genigeorges, 1986; Tood, 1987; Reilly ve ark.,1988].

Et ve et ürünlerinin mikrobiyolojik kalitesi, üretim sırasında alınacak hijyenik önlemlere, paketleme tipine ve saklama koşullarına bağlıdır. Kıyma ve benzeri et ürünleri çekim öncesi etteki bakteri florasının genellikle değişmeksizin yine bulunması ve bileşimi ve yapısı itibarıyla mikroorganizmaların yaşamları ve gelişmeleri için uygun şartları taşımaları nedeniyle sağlık açısından risk taşımaktadır [Alişarlı ve Gökmen, 2003; Yapar, 2006].

Tavuk etlerinin gıda enfeksiyon etkenleri ile yüksek düzeyde kontamine oluşu bu konuda çalışanların dikkatini kanatlı kesimhanelerdeki işlemler üzerine çekmiştir. Bir çok ülkede yapılan epidemiyolojik çalışmalar kanatlı kesimhanelerindeki çeşitli işlemlerin gıda enfeksiyon ve intoksikasyon etkenlerinin yayılmasına neden olduğunu ve gıda enfeksiyon ve zehirlenmelerinin ortaya çıkışında üretim, işleme ve hazırlama

aşamalarında oluşan sekonder kontaminasyonların, primer kontaminasyonlarından daha büyük rol oynadığını ortaya koymuştur [Kutlu, 2006].

Tavuk etlerinde ileri gelen Stafilokokal gıda zehirlenmeleri gerek üretim, gerekse muhafaza sırasında etlerin çevresel kaynaklardan *S. aureus* ile kontamine olması ve hijyenik olmayan muhafaza ve hazırlama koşullarına bağlı olarak etkenin hızla üreyerek enterotoksinleri oluşturması sonucu meydana gelmektedir [Bergdoll, 1990]. Bakteriler, birçok canlı ve cansız yüzeye yapışır ve biyofilm oluşturarak, endüstriyel ve tıbbi birçok soruna neden olurlar [Kierek-Pearson ve Karatan, 2005]. Biyofilmler ile ilgili çalışmalar 1970'lerin sonlarından beri yapılmaktadır. Biyofilm içindeki bakteriler, yüksek hücre yoğunluğu ve sınırlı besin nedeniyle yavaş gelişir [Moller ve ark., 1996]. Bunun gibi birtakım çevresel faktörlerin etkisi ile genetik modülasyon sonucu ortaya çıkan ve “quorum sensing” olarak bilinen hücreler arası sinyal hipotezi, biyofilm fizyolojisi ve gelişiminde önemlidir [Davies ve ark.,1998; Zhu ve Mekalanos,2003].

Biyofilm oluşturan bakteriler başta antibiyotiklere olmak üzere vücudun savunma sistemine de direnç gösterirler.

Bu çalışmada, çeşitli gıdalardan (kıyma, tavuk, süt ve süt ürünleri) izole edilen Stafilokok türlerinin biyofilm oluşumlarının ve çeşitli antibiyotiklere olan dirençliliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Stafilocok Sınıflandırması ve Tarihçesi

Stafilokoklar ilk tanımlanan patojenik mikroorganizmalardan biridir. İnsan cerahatinde (irin) stafilokokları ilk olarak Robert Koch 1878 yılında tarif etmiştir.

Pasteur ise 1880 yılında bu mikroorganizmayı sıvı besiyerinde üretmiştir [Akan, 1993].

Stafilokok terimi, mikroskop altındaki karakteristik görünümüleri nedeni ile eski Yunanca'da üzüm salkımı anlamına gelen “staphyle” sözcüğünden üretilmiş ve ilk olarak 1881 yılında İskoçyalı cerrah Alexander Ogston tarafından kullanılmıştır [Waldvogel, 2000; Lowy, 1998].

Stafilokoklar 1884 yılında Rosenbach tarafından irinli yaralardan izole edilmiş ve karakteristik özellikleri laboratuvarında incelenmiştir [Schleifer, 1986]. Rosenbach katı besiyerinde beyaz ve sarı koloniler oluşturan iki farklı stafilokok tesbit etmiştir. Sarı koloni oluşturan mikroorganizmalara *Staphylococcus (pyogenes) aureus*, beyaz koloni oluşturan mikroorganizmalara ise *Staphylococcus (pyogenes) albus* adını vermiştir [Akan, 1993; Kloss,1990].

Passet (1885), çalışmalarında üçüncü bir tür izole etmiş ve buna *S. pyogenes citreus* adını vermiştir [Cameron, 1963]. Giorre ve Bumm (1885) ve Bochart (1887), araştırmalarında bu kokların insan enfeksiyonlarıyla olan ilişkilerini araştırmışlardır.

Migula (1895), bu gruba *Micrococcus* adını vermiş ve 1900 yılında da bunları *Micrococcus aureus*, *Micrococcus albus* ve *Micrococcus citreus* olarak üçe ayırmıştır [Güzel,1998]. Andrews ve Cordon, 1905-1906 yıllarında, 300 Stafilocokus kültürü üzerinde yaptıkları bir çalışmada *S. pyogenes albus*'un sarı pigment oluşturan formun pigmentsiz türünü ve *S. pyogenes citreus*'un intermedier bir varyetesi

olduğunu beyan etmiştir. Aynı araştırmacılar insanlarda *S. pyogenes*, *S. epidermidis* *albus*, *S. salivarius* ve deride hastalık yapan Stafilocokuslar olmak üzere dört değişik tür Stafilocokus tanımlamışlardır [Güzel, 1998].

Winshow ve Rogers (1909), sarı ve beyaz pigment oluşturan suşlar için *Aurococcus* ve *Albococcus* genus isimlerini kullanmışlardır. Buchanan (1911), bu grup için genus ismi olarak *Micrococcus*'u tercih etmiştir. Buchanan (1917), kokları Stafilocokus genusuna koymuştur [Güzel, 1998].

Winslow ve arkadaşları, 1920 yılında Staphylococcus cinsini *Micrococcaceae* familyasına dahil etmişlerdir. 1957 yılında Evans yaptığı araştırmalar sonucunda Stafilocokların anaerobik üremeleri ve glikozu fermente etmelerinden dolayı fizyolojik olarak mikrokoklardan farklı olduklarını göstermiştir. Baird-Parker ise 1974'te üç tür Stafilocoku (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*) tanımlamıştır. Sonraki yıllarda da immünokimyasal ve biyokimyasal özellikler temel alınarak DNA homoloji çalışmaları ile 28 tür daha tanımlanmıştır [Kloss, 1990; Noble, 1990].

Stafilocok cinsi içerisinde yer alan türler, patojenite kriteri olarak kabul edilen koagulaz enzimi sentezleme yeteneklerine göre koagulaz pozitif stafilocoklar (KPS) ve koagulaz negatif stafilocoklar (KNS) olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. KPS'lar *S. aureus*, *S. intermedius* ve *S. hyicus* türlerini içine almaktadır [Akan, 2006]. KNS'ler; *S. arlettae*, *S. auricularis*, *S. capitis*, *S. caprae*, *S. caseolyticus*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. equorum*, *S. gallinarum*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. koossii*, *S. lentis*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. simulans*, *S. warneri* ve *S. xylosus*'tur [Koneman, 1992; Schleifer, 1984].

2.2. Stafilokokların genel özellikleri

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 ısı 37 °C’dir. Sporsuz olmasına rağmen dış etkilere ve dezenfektanlara karşı oldukça dayanıklıdır. Kùltürlerde +4 °C’de 2-3 ay, -20 °C ‘de 3-6 ay canlılıklarını koruyabilirler. Stafilokoklar 60 °C’lik ısıya 30 dk dayanabilirler. Fenolde (%2) 15 dakikada inaktive olurken, %9’luk NaCl ve sakkarozaya tolerans gösterebilmektedir [Akan, 2006].

Stafilokoklar insanlarda ve hayvanlarda çeşitli hastalıklara neden olmaktadır. *S. aureus*’un insanlarda, nazokomiyal enfeksiyonlara, toksinlere bağılı 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 bağılı 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, 1993].

İnsanlardan en sık izole edilen türler *S. aureus*, *S. saprophyticus* ve *S. epidermidis*’dir. Bunlardan *S. aureus* öncelikli patojendir, diğeri ikisi ise fırsatçı patojendirler.

Çizelge 2.1 Stafilokokların biyokimyasal özellikleri

Özellikler	<i>S.aureus</i>	Koagülaz Negatif Stafilokok
Pigment	(+)z	(-)
Aerob üreme	(+)	(+)
Anaerob üreme	(+)	(+)
%10 NaCl'de üreme	(+)	Z
%15 NaCl'de üreme	Z	D
Acetoin oluşturma	(+)	(+)
Sükroz	(+)	(+)
Maltoz	(+)	(+)
D-mannitol	(+)	D
D-mannoz	(+)	(+)
D-trehaloz	(+)	(-)
Alfa toksin	(+)	-
Hiyalüronidaz	(+)	(+)
Üreaz	(+)z	(+)
Koagülaz	(+)	(-)
Hemoliz	(+)	(-)z
Dnase	(+)	(-)z
Isıya dirençli nükleaz	(+)	(-)z
Novobiocin'e direnç	(-)	(-)
Koloni morfolojisi	Kabarık,ışık geçirici, pigmentli, hemolizli	Kabarık ya da basık , ılık geçirici ya da opak,hafif pigmentli, hafif hemolizli

*(Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1986'dan alınmıştır.)

+ : %90 olumlu

- : %90 olumsuz

z: zayıf tepkime

d: değişken

2.3. Stafilocokların Virölans Faktörleri

İnsan ve hayvanların üst solunum yolları ve derileri üzerinde normal florayı oluşturan ve doğada çok yaygın olarak bulunan Stafilocokuslar, potansiyel patojen bakteriler olup sporadik veya salgın şeklinde görülebilen Stafilocokus enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Bulundukları ortamda çeşitli toksin ve enzimler sentezleyerek insan ve hayvanlarda enfeksiyonlara neden olan patojen Stafilocokusların ayırımı için çeşitli testlerden yararlanılmaktadır [İstanbuluoğlu ve Diker, 1983].

2.3.1. Koagölaz

Patojen stafilocokların çoğu bulundukları ortama çeşitli toksin ve enzim sentezlerler. Bunlar arasında en önemlisi koagölaz enzimidir. Koagölaz ısıya dirençli, filtrelerden geçebilen bir enzimdir. Patojen stafilocokların çoğu, oksalatlı ve sitratlı insan yada çoğu hayvan plazmasını koagüle edebilme yeteneğine sahiptir. Bu stafilocoklar girdikleri organizmada sentezledikleri koagölaz enzimi sayesinde bir fibrin tabakasıyla kaplanarak fagositozdan korundukları gibi normal serumun bakterisid etkisini de engelleyerek patojenite kazanmış olurlar. Bu nedenle koagölaz pozitif izolatlar patojen olarak kabul edilirler. Koagölaz plazmadaki antistafilotoksik faktörü de hidrolize edebilirler [Adessiyum, 1985].

Koagölaz oluşumu patojenite ile paralellik gösteren bir özelliktir. Serbest hücreye bağlı olarak iki şekilde bulunabilir. Serbest koagölazda enzimin etkisini gösterebilmesi için trombine benzeyen ve bütün hayvanların plazmasında bulunmayan bir faktöre, CRF'ye (Coagulase Reaction Factor) ihtiyaç vardır. Bu plazma faktörü ile birleştiğinde aktif hale geçen koagölaz, fibrinojenin trombinle katalize edilip fibrin oluşmasına benzeyen bir mekanizma ile plazmayı pıhtılaştırır. Diğer taraftan bağlı koagölaz olarak bilinen 'Clumping Factor' (CF) Stafilocokların hücre yüzeyinde meydana gelir ve serbest bırakmaz. Bunun için CRF'ye ihtiyacı yoktur. Fibrinojenin direkt olarak fibrine dönüşümü ile hücre yüzeyinde fibrin

presipitasyonu meydana gelir ve bunun sonucu olarak da Stafilocoklar aglütinasyon ve kümeleşme oluşturur [Akan, 1986; Koneman;1988].

2.3.2. Mannitol fermantasyonu

Çoğu Stafilocok türü, mannitol'ü aerobik olarak hidrolize ettiği halde anaerobik olarak fermente etmezler. *S. aureus* 'un büyük bir çoğunluğu mannitol'ü hem aerop hem de anaerop olarak fermente eder. Özellikle, mannitol'ün anaerobik fermantasyonu *S.aureus*'u diğer türlerden ayırt etmekte sıklıkla kullanılmaktadır [Minor, 1971; Halpin, 1988].

2.3.3. Glukoz fermantasyon

Micrococcaceae familyasındaki Mikrokokus genusu oksidatif, Stafilocokus genusu fermantatif etki verir.

2.3.4. Clumping faktör

Plazma ile *S. aureus* kolonileri karıştırıldığı zaman, bakterinin hücre yüzey bileşenleri ve fibrinojen arasındaki etkileşim nedeniyle pıhtılaşma olur. Bu reseptör *S. aureus*'un fibrinojen ve fibrine bağlanmasından da sorumludur. Genetik veriler koagülaz ve clumping faktörün *S. aureus*'un farklı özellikleri olduğunu göstermektedir [Devid, 1992].

2.3.5. Hemoliz

Stafilocokuslar kanlı agarda beta (β), alfa (α) ve gama (γ) hemolizin oluştururlar. Bu hemolizirlere bağılı olarak şekillenen hemoliz tipleri tavşan ve sığır kanlı agarda tespit edilir [Kusch, 1974]. Toksik özellikleri ekstrasellüler proteinlerden hemolizinleri sentezleyen suşların koagülaz pozitif olması gerektiğini savunan

araştırmacıların yanı sıra, koagülaz negatif Stafilokokusların da hemolizin aktivitesine sahip oldukları çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur [Gammel, 1966].

2.3.6. Pigmentasyon

S. aureus'un katı ortamda yeni gelişen kolonileri başlangıçta renksizdir. Koloniler geliştikçe Stafilokoklar sarı renkli, bazen de beyaz pigment oluştururlar. Yani koloniler eskidikçe lipokrom yapıda pigment oluştururlar. Alkol, eter, kloroform ve benbolde eriyen bu pigment, lipochrome olarak gruplandırılmaktadır. Oluşan pigment kolonide toplanır, besiyerine yayılmaz. Böylece koloniye renk verir. Pigment oluşumu koagulaz pozitif diğer türler (*S. hyicus* ve *S. intermedius*) ile *S. aureus*'un ayrılmasında önemli bir kriterdir [Arda, 1982].

2.3.7. DNase

İnsanlardan ve hayvanlardan izole edilen Stafilokokuslar in vitro ve in vivo üretildiklerinde bulundukları ortama, enzim karakterlerinde ekstrasellüler maddeler yani metabolitler salgırlar. Konakçı üzerine çok kuvvetli etkileri olan bu maddelerin patojenite ile çok yakın ilgileri olduğu uzun zamandan beri bilinmektedir. Deoksiribonukleaz da bu enzimlerden biridir [Baker ve ark., 1985]. Patojenik ve apatojenik Stafilokokus suşlarının ayrımı için DNase testinden de yararlanılmaktadır [Gibbs ve ark., 1978].

2.3.8. TNase

Yüksek derecedeki ısıya dayanıklılığı nedeniyle ısı işlemleri uygulanan gıda maddelerinde *S. aureus*'un ekstrasellüler nükleazı 1956 yılından bu yana bilinmektedir. TNase testi *S. aureus*'un ısıya dayanıklı deoksiribonükleazını ortaya çıkarmak suretiyle onu diğer mikroorganizmalardan ayırt etmekte kullanılan bir testtir [Bilgehan, 2002].

2.3.9. Üreaz

Üreaz, üre siklusunda ve aminoasit metabolizmasında rol oynayarak üre yıkımı sonucunda CO₂ ve NH₃ oluşturmaktadır. NH₃ dokular için toksiktir. Aşırı amonyum bakteriler içinde toksik olabilir. Bu kimyasaldan çeşitli enzimler ve kombine detoksifikasyon mekanizmalarıyla korunabilirler. Biyofilmdeki bakteri hücreleri metabolizma sonucu oluşan laktik asit ve formik asit üretimi nedeni ile düşen pH'dan kendilerini üreaz genlerinin up-regülasyonu ile korurlar. Üreaz aktivitesinin biyofilm oluşumunun sürdürülmesinde önemli olduğu bildirilmektedir [Resch ve ark., 2005].

2.3.10. Stafilokinaz

Fibrinolitik etki yapar. Plazminojen veya profibrinolizin isimli maddeyi aktive ederek plazmin (fibrinolizin) oluşturur [Howart ve ark., 1987].

2.3.11. Lipaz

Lipitleri hidrolize eder. Stafilokokların deri ve deri altı yerleşiminde yağ dokusu üzerindeki etkileri ile önemli rol oynar (Bilgehan, 2000; Howart ve ark., 1987).

2.3.12. Protein A

Protein-A'nın belirlenmesi taksonomik olarak önem taşır ve kural olarak KNS'lerde bulunmaz. Çoğunlukla *S. aureus* ayrıca *S. epidermidis* ve *S. intermedius* suslarının hücre duvarında antijenik spesifikiteye sahip, Protein A (Sp-A) olarak adlandırılan, protein yapısında komponentler yer alır [Movitz, 1976]. Sp-A'nın enfeksiyonlara karşı korunmayı sağlayan immünoglobülinlerin rolünü sınırlayıcı veya bloke edici özelliği ile fagositosiza engel olduğu, komplemanı inaktive edici özelliğinden dolayı ise Stafilokokların enfeksiyon oluşturmada rol oynadığı bilinmektedir. Nitekim, Sp-A'ya fazla miktarda sahip olan *S. aureus* suslarının bu maddeyi az veya hiç içermeyen suşlara oranla fagositoza daha dirençli olduğu tespit edilmiştir [Forsgren

ve Sjoquist, 1966]. Ayrıca Sp-A, serum komplemanını inaktive eder, antifagositik, kemotaktik, mitojenik etkilerine sahiptir ve son yıllarda kanser tedavisinde de kullanılmaktadır [Dood ve ark., 1987].

2.4. Antibiyotik Direnci

Antibiyotikler çeşitli mikroorganizma türleri (bakteriler, mantarlar, aktinomiçesler) tarafından sentezlenen ve diğer mikroorganizmaların gelişmesini engelleyen veya onları öldüren doğal maddelerdir. Eskiden, genellikle sentez yoluyla elde edilen kemoterapötiklerden ayrı bir ilaç grubu olarak kabul gören antibiyotiklerin bir kısmının, diğer kemoterapötikler gibi sentetik olarak yapılmaya başlanmasıyla aradaki kaynağa ilişkin fark büyük ölçüde kaybolmuştur. Bu nedenle antibakteriyal etkinliği olan biyolojik kaynaklı veya sentetik ilaçların tümü için antibiyotik terimi kullanılacaktır.

Direnç, bir bakterinin antimikrobiyal ajanın öldürücü ve üremeyi durdurucu etkisine karşı koyabilme yeteneğidir. 1940'lı yıllarda antibiyotiklerin kullanılmadığı bazı adalarda toprak ve dışkı örneklerinde tetrasiklin ve streptomisine dirençli bakteriler bulunduğu; antibiyotik direncinin yalnızca yaygın antibiyotik kullanımının sonucu değil, bakterilerin olumsuz çevre koşullarında yaşamını sürdürmek kullandığı savunma sürecinin bir parçası da olduğu da belirtilmektedir. Ancak antibiyotiklerin yoğun şekilde kullanıma girmesi ile birlikte yıllar içinde çoğul dirençli mikroorganizmalar ortaya çıkmış ve bunlarla oluşan enfeksiyonların sağaltımında büyük sorunlar yaşanmaya başlamıştır. Günümüzde tüm dünyada bir yandan hızla yeni ilaçlar geliştirilmekte iken, öte yandan bunlara süratle direnç kazanan mikroorganizmalarla oluşan enfeksiyonlar bildirilmekte ve sorunun boyutları giderek büyümektedir [Kayser, 1995].

Direnç (tolerans) bir bakterinin β -laktam grubu veya hücre duvarı sentezini inhibe eden diğer antibiyotiklerin öldürücü, çoğu zaman litik etkisine karşı ölüm oranlarının azalması olarak

açıklanmıştır. Klinik materyallerden izole edilen Stafilokokus suşlarının % 85-90'ı ve toplumdan izole edilenlerin yaklaşık o kadarı oluşturdukları beta laktamaz nedeniyle penisiline direnç kazanmışlardır. Bunların yanında metisilin, oksasilin, nafsilin gibi beta laktamaza dirençli penisilinlere karşı da gittikçe artan oranda direnç kazanmaktadırlar. Stafilokokuslarda esas sorun son yıllarda giderek artan oranlarda görülen metisilin direncidir [Akalin, 1994].

Antibiyotik direnci intrinsek ve kazanılmış direnç olarak iki kısımda incelenebilir:

İntrinsik direnç : Hemen hemen bütün Gram negatif bakteriler vankomisine, enterokoklar da sefalosporinlere dirençlidir. Bunun nedeni mikroorganizmaların doğal yapısı nedeniyle, bu bakterilerde antibiyotiklerin etkili olabilecek hedeflerinin olmamasıdır.

Kazanılmış direnç : Ya kromozom, transpozon veya plazmid DNA'sındaki mutasyonlarla, yada direnç geni taşıyan DNA dizilerinin başka bakterilerden transformasyon, transdüksiyon veya konjugasyon yoluyla alınması sonucu ortaya çıkan dirençtir.

Kromozomal direnç : Kromozomda spontan mutasyonlar sonucu gelişir. Mutasyonlar sonucunda bakteride bazı değişiklikler ortaya çıkabilir ve hücrelerin ilaca permeabilitesi azalabilir yada ilacın hedefinde değişiklikler olabilir. Yanlış ve gereksiz antibiyotik kullanımı mutasyona yol açmaz. Ancak bu şekilde antibiyotik kullanılması durumunda dirençsiz bakteriler ölürlerken, mutasyonlar ile direnç kazanan az sayıdaki bakteri seleksiyona uğrar ve yaşamaya devam eder.

Plazmidlere bağlı direnç : Plazmidler, bakteri kromozomundan bağımsız olarak replike olan, kromozom dışı genetik elemanlardır. Bakterilerde en sık görülen antibiyotik direnci plazmid kaynaklıdır. R (direnç) plazmidleri üzerinde bakterilerin antibiyotik direncini kontrol eden genler bulunur ve bu plazmidler başka bakterilere de aktarılarak direncin yayılmasına neden olur.

Transpozonlara bağlı direnç : Bir bakterinin kromozomundan plazmidine veya plazmidinden kromozomuna veya başka bakterinin kromozom ya da plazmidlerine yer değiştirebilen genetik elemanlardır. Plazmidlerden farkı, kendi kendilerine replike olamamalarıdır. Üzerlerinde taşıdıkları birçok direnç genini diğer bakterilere aktarabilirler.

Antibakteriyel spektrum bir antibiyotiğin etkili olduğu mikroorganizma grubunu tanımlar. Geniş spektrumlu antibiyotikler, çok sayıda gram negatif ve pozitif mikroorganizmaya etkilidir. Dar spektrumlu antibiyotiklerin ise etkili olduğu sınırlı sayıda mikroorganizma vardır.

Bakteriyostatik etki mikroorganizmaların üreme ve gelişmelerinin durdurulmasıdır. Minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) ile ifade edilir. MİK; bir bakterinin üreme ve gelişmesini durduran en küçük antibiyotik konsantrasyonudur.

Bakterisidal etki ise mikroorganizmanın öldürülmesidir. Minimal bakterisidal konsantrasyon(MBK) ile ifade edilir. MBK; bir bakteriyi öldürebilen en düşük antibiyotik konsantrasyonudur.

MBK, her zaman MİK'den daha büyüktür. İyi bir bakteriyosidal antibiyotiğin MBK/MİK oranının çok yüksek olmaması beklenir. Bu oranın 32 ve üzerine çıktığı durumlarda, bakterinin o antibiyotiğe toleran olduğu söylenir.

Stafilokokuslarda esas sorun son yıllarda giderek artan oranlarda görülen metisilin direncidir. 1990 yılında ABD'de, nozokomiyal enfeksiyonlardan izole edilen susların %15'inin metisiline dirençli olduğu belirtilmiştir. Diğer gelişmiş ölkelerde de bu oran yakındır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise bu oran %16-52 arasında değişmektedir [Gibbs ve ark., 1978]. *S. aureus*'larda antibiyotiklere direnç kazanma yeteneği, antibiyotiklerin kullanılmasından hemen sonra gözlenmiştir [Gibbs ve ark., 1978]

S.aureus'larda direnç olayı iki ana başlıkta toplanmaktadır.

1. Beta-laktam antibiyotiklere direnç
2. Non-beta-laktam antibiyotiklere direnç

2.4.1. Beta-laktam antibiyotiklere direnç

Beta-laktam antibiyotikler, hücre duvarının ana yapısını oluşturan peptidoglikan sentezi sırasında rol alan transpeptidaz enzimine bağlanarak etkilerini gösterirler. Hücre membranının dış yüzünde bulunan transpeptidaz enzimi peptid yan zincirleri ile glikan zincirleri arasında çapraz bağlanmayı sağlar [(Dood ve ark., 1987); (Devriese ve ark, 1972); (Genigeorges ve Sadler, 1966)]. Beta-laktam antibiyotikler Dalanin- D-alanin analogu olduklarından transpeptidaz ile geridönüşsüz olarak bağlanır ve onu engeller [Gibbs ve ark., 1978; Forgren ve Sjoquist, 1978]. Bu yolla bakterisit etki gösterir. Burada transpeptidazdan başka karboksipeptidaz ve endopeptidaz enzimleri de vardır. Bunlarda beta-laktam antibiyotikleri bağlarlar ve hücre duvarı sentezinin son aşamalarında etkili olurlar [Gibbs ve ark., 1978; Dood ve ark., 1987]. Penisilin bağlayan proteinler (PBP) olarak da adlandırılan bu proteinler Stafilokokusların farklı türlerinde farklı sayı ve şekilde bulunurlar. Duyarlı bir *S.aureus*'ta 1,2,3,3',4 olmak üzere 5 adet PBP olduğu bilinmektedir [Forsgren ve Sjoquist, 1966].

Beta-laktam antibiyotiklerin hücre duvarı sentezine olan bu etkilerinin yanında, hücre lizisini sağlayan otolizinlerin inhibisyonunda rol alan kontrol mekanizmalarını baskılayarak bakterinin ölümüne yol açmaktadır [Gibbs ve ark., 1978].

Beta-laktam antibiyotiklere direnç üç ayrı şekilde gerçekleşmektedir.

- a. Beta-laktamazlar ile olan enzimatik yolu direnç
- b. Düşük afiniteli proteinlerle olan intrinsik direnç
- c. Tolerans

Beta-laktamazlar ile olan enzimatik yollu direnç

Esas olarak penisilinlere dirence neden olan beta-laktamazlar, ilk kez 1940 yılında saptanmıştır. A, B, C ve D olmak üzere dört tip Stafilokokal beta-laktamaz tanımlanmıştır [Halphin ve Marth, 1989]. Bunlar hücre dışı enzimlerdir. A ve C türleri çok aktiftir ve özellikle hastane kaynaklı *S.aureus* suşlarında (faj grup I ve III) görülür.

Ortamda beta-laktam antibiyotiklerin bulunması, beta-laktamaz üretimini hızlandırır. Plazmid üzerindeki beta-laktamaz genine çok yakın lokuslarda bulunan diğer pek çok antibiyotiğe (eritromisin, tetrasiklin, gentamisin, fusidik asit) ve ağır metallere (civa, kadmiyum gibi) direnci kodlayan genlerin de, fajlarla aktarılması sonucu bir suş aynı anda pek çok antibiyotiğe dirençli hale gelebilir [Halphin ve Marth, 1989].

Beta-laktamazlara bağlı metisilin direnci, Stafilokokal beta-laktamazların aşırı salınımı ile olur. Bu direnç ‘Borderline’ direnç, düşük seviyeli direnç olarak da bilinen dirençten sorumlu mekanizmalardan biridir. Borderline dirençli *S. aureus*’lar, PBP 2a oluşturmazlar, dolayısıyla mec A geni içermezler. Bu *S. aureus*’lar, MRSA (metisilin dirençli *S. aureus*)’dan genetik ve biyokimyasal olarak farklıdır. Bu suşlar beta-laktam antibiyotiklere duyarlıdır ve tedavide beta-laktam antibiyotikler kullanılabilir. Burada sorun borderline dirençli suşların gerçek MRSA’dan ayrılmasıdır. Çünkü tedavide vankomisin kullanımı gereksiz, pahalı ve toksiktir [Genigeorges ve Sdale, 1966].

İntrinsik direnç

Metisilin direnci eksentrik bir enzimatik aktivite ile değil, kromozomal genlerin kodladığı, penisilinlere düşük afinite ile bağlanan ve penisilin bağlayan protein (PBP) 2a veya PBP 2' diye isimlendirilen değişmiş proteinlerin aracılığı ile yani ‘intrinsik’ yolla olur [Reilly ve ark., 1988; Gibbs ve ark, 1978; Genigeorgez ve Sadler, 1966].

Beta-laktam antibiyotikler bakteri hücre duvarı membranında bulunan PBP'lere ulaşırlar, ancak bu proteinler düşük afiniteli olduğu için yeterince bağlanamazlar ve bakteri duvarı peptidoglikan sentezi yavaş da olsa devam eder [Forsgren ve Sjoquist, 1966; Altuğ ve ark., 1995; Demm ve Hadju, 1997]. Böylece metisiline rezistan Stafilokokus, metisiline duyarlı Stafilokokuslara oranla daha yavaş ürerler ve floraya hakim olabilmek açısından büyük dezavantaja sahiptirler [Kloos, 1986].

Homojen direnç

Bakteri kolonisini oluşturan tüm bakteriler mec A genini taşırlar. Tümünde bu gen ekprese olmuş, fonksiyoneldir. Yüksek düzeyde dirence neden olur. Direncin tespiti ortamın pH'sı, sıcaklık, tuz konsantrasyonu, inkübasyon süresi gibi çevresel faktörlerle ilişkili değildir. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında izole edilen Stafilokokusların az bir kısmında metisilin direnci bu şekildedir [Faller ve Schleifer, 1981].

Heterojen direnç

Ortamın pH'sı, sıcaklık, tuz konsantrasyonu, inkübasyon süresi gibi çevresel koşullardan etkilenmesi nedeni ile tespiti güç olan, problem oluşturan direnç ancak 106-108 bakteride bir tespit edilir. Bunun fem A veya faktör X gibi kontrol genlerin fonksiyonu ile oluştuğu düşünülmektedir. Bu tür direnç, duyarlılık testleri %4 NaCl içeren ortamda, düşük sıcaklıkta, 48 saatlik inkübasyon periyodu sonunda daha iyi tespit edilebilmektedir [Genigeorges, 1986; Bergdol, 1990].

Tolerans

Tolerans, bir bakterinin, beta-laktam antibiyotiklere ve hücre duvarı sentezini inhibe eden diğer antibiyotiklerin öldürücü ve çok defa aynı zamanda eritici etkisine karşı ölüm oranının düşük olması, dolayısıyla bakterisid antibiyotiklerin bakteriyeye sadece

bakteriyostatik etki göstermesidir. Toleransın, bir otolitik enzim inhibitörünün çok fazla sentezlenmesi sonucu yol açtığı, artmış otolitik enzimlere bağlı olarak geliştiği düşünülmektedir. Normalde penisilin ve diğer hücre duvarı sentezini engelleyerek bakterisid etki gösteren antibiyotikler doğal otolizin inhibitörlerini bloke ederek, otolizin aktiviteyi arttırmırlar. Bunun sonunda otolizinler, hücre duvarında peptidoglikan tabakadaki çeşitli kovalent bağları açarak hücre lizisine neden olur.

Bazı *S. aureus* ve *S. pneumonia* suşlarında, otolitik enzimler azalır ve beta-laktam antibiyotiklerin bu suşların büyümesini durdurduğu, ama lizise neden olmadıkları saptanmıştır. Bu suşlara ‘penisilin tolerans’ suşlar denir. Klinik olarak minimal bakterisidal konsantrasyonun minimal inhibisyon konsantrasyonuna oranı 32’nin üstünde olması ile anlaşılır. Tolerans genotipik tolerans olarak ikiye ayrılır; ancak tolerans denince anlaşılan genetik toleranstır. Genetik tolerans, intrinsik bir olay değildir. Antibiyotik kullanımı ile kazanılmaktadır. Tolerans, transformasyon, muhtemelen transdüksiyon ile laboratuarda bakteriden bakteriye aktarılabilir [Tham, 1997].

2.4.2. . Non-beta-laktam antibiyotiklere direnç

Özellikle MRSA’larda çoklu antibiyotik direncine daha fazla rastlanır ve önem kazanır. Bir çok çalışmada MRSA’ların gentamisin, tobramisin, netilmisin, streptomisin, eritromisin, tetrasiklin, minosiklin, trimetoprim-sulfametaksazol, klindamisin, kloramfenikol, rifampisin, siprofloksasin, fusidik asit, gibi pek çok antibiyotiğe dirençli olduğu vurgulanmıştır [Jasper ve ark, 1985; Özkan ve ark., 1985].

Daha önce de vurgulandığı gibi metisiline dirençli Stafilokokuslar tüm betalaktam antibiyotiklere kesinlikle dirençli olmaları yanında makrolidler, linkozamidler, kinolonlar, tetrasiklin ve aminoglikozidler gibi birçok antibiyotiğe de yüksek oranlarda direnç göstermektedirler. Stafilokokuslardaki metisilin direnç oranları özellikle hastane kökenlerinde çok yüksektir.

Vankomisin, penisilinaz üreten veya üretmeyen, metisiline duyarlı veya dirençli tüm Stafilokok kökenlerine etkilidir. Ancak, daha önce de belirtildiği gibi henüz çok yaygın olmasa da vankomisine dirençli *S. aureus* saptanmaya başlamıştır. 1956 yılında klinik kullanıma giren vankomisinin ilk yıllarda sık görülen yan etkileri daha sonraki yıllarda ilacın saflaştırılmasıyla çok aza indirilmiştir. Gram pozitif bakterilere çok güçlü etkinliği olan vankomisinin aerop veya anaerop gram negatif bakterilere karşı etkinliği yoktur. Bu nedenle vankomisinin majör kullanım alanı metisiline dirençli ciddi Stafilokokus infeksiyonlarıdır.

Teikoplanin, yapısal olarak vankomisine çok benzeyen bir başka glikopeptit antibiyotiktir. Etki alanı vankomisin gibidir. Ancak KNS'lere karşı etkinliği vankomisine göre daha azdır [Zarzour ve Belle ,1978].

2.5. Stafilokoklar da antibiyotik direnci

Alexander Fleming'in 1928'de penisilini bulması ve 1940 yılında Florey ve Chain tarafından penisilinin klinik kullanıma girmesiyle büyük miktarda üretimine başlanmış ve stafilokokkal infeksiyonlarda morbidite ve mortaliteyi çok kısa süre düşürmüştür. Ancak, daha sonraki yıllarda penisilini inaktive eden stafilokok suşları ortaya çıkmıştır.

İlk kez penisilinaz üreten stafilokok suşu 1944'de Kirby tarafından bildirilmiştir. Bu tarihten itibaren stafilokoklarda penisilin direnci giderek artmış ve 1950'li yıllarda penisilinin yanı sıra eritromisin, tetrasiklin, streptomisin gibi o dönemde kullanılan antibiyotiklere de direnç gelişmiştir [Çetinkaya ve Ünal, 1996].

1960 yılında metisilin ve daha sonraki yıllarda oksasilin, kloksasilin ve nafsilin gibi diğer penisilinaza dirençli penisilinlerin klinik kullanıma girmesiyle stafilokokkal infeksiyonların tedavisinde ikinci önemli aşama kaydedilmiştir. Ancak çok kısa bir

zaman içinde Barber tarafından 1961’de stafilokoklarda metisilin direnci bildirilmiştir [Brumfitt, 1989; Willke,1992].

Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) suşları 1970’li yıllardan itibaren yaygın olarak kullanılan birçok antibiyotiğe karşı dirençli hale gelmeye başlamıştır. Böylece MRSA, çoklu antibiyotik direnci göstermesi, buna bağlı olarak da tedavide karşılaşılan güçlükler ve nazakomiyal epidemilere yol açması nedeni ile tüm dünyada ve ülkemizde ciddi bir sağlık sorunu haline gelmiştir [Waldvogel, 2000; Caner, 1998]. Günümüzde, bu infeksiyonların tedavisinde tercih edilecek antibiyotik grubu, glikopeptid antibiyotiklerdir (vankomisin ve teikoplanin). Trimetoprim–sulfametoksazol (TMP-SMZ), makrolitler, klindamisin, kinolonlar, fusidikasit gibi antibiyotikler MRSA suşlarına in vitro etkili görünebilmekle beraber bu antibiyotiklerin ciddi infeksiyonlarda tek başına kullanılmaları uygun değildir. Üstelik MRSA suşları sıklıkla kinolon, makrolid, aminoglikozit gibi antibiyotik gruplarına da direnç gösterebilirler. Son yıllarda, vankomisin duyarlılığı azalmış MRSA suşları da bildirilmiştir [Nicos, 1985; Sieradzki ve ark.,1999].

Stafilokokuslarda metisilin direnci 3 ana başlık altında toplanabilir;

1- İntrinsik Metisilin Direnci

- a- Homojen Direnç
- b- Heterojen Direnç

2- Borderline (Sınırdan) Metisilin Direnci

3- İntermediate Metisilin Direnci

1- İntrinsik metisilin direnci: Direnç mekanizmaları içinde en çok görülenidir. *S. aureus* suşlarındaki metisilin direnci kromozomal (intrinsik) bir dirençtir. PBP-2 veya PBP-2a olarak gösterilen ek bir penisilin bağlayan proteinin (PBP) sentezlenmesi neticesinde ortaya çıkar. Bu protein sadece MRSA’larda bulunur. Metisiline duyarlı stafilokoklarda (MSSA) PBP-2a bulunmaz [Waldvogel, 2000; Ruben ve Norden, 1991]. PBP-2a’nın başlıca özelliği, metisilin ve diğer beta-laktam antibiyotiklerin çoğuna zayıf affinite göstermesi ve bu antibiyotiklerin varlığında

bloke edilen diğer PBP'lerin fonksiyonunu üstlenip hücre duvarı sentezini sürdürmesidir [Lencastre ve ark.,1991].

Mec A geni sadece metisiline dirençli stafilokoklarda bulunur. İntrinsik metisilin direnci gösteren stafilokok izolatları β - laktam antibiyotiklerin yanı sıra diğer birçok antibiyotiğe de direnç gösterirler [Ruben ve Norden, 1991; Nicos, 1985].

a- Homojen direnç: Kolonideki bütün bakteriler mec A genini taşırlar, hepsinde de bu gen fonksiyoneldir. Bu direnç çevresel faktörlerden etkilenmez.

b- Heterojen direnç: Klinik uygulamada çok sık karşılaşılan bir direnç şeklidir. Koloniyi oluşturan mikroorganizmalar mec A genini taşımalarına rağmen direnç ancak, 106-108 bakteriden birinde eksprese olur, inkübasyon süresi, ısı, tuz konsantrasyonu gibi değişik çevresel faktörlerden etkilenmesi sebebiyle tespiti zordur.[NCCLS].

2- Borderline (Sınırdaki) metisilin direnci: Mikroorganizma tarafından yüksek oranda β -laktamaz salgılanması neticesinde gelişir. Metisiline direnci sınırdaki gösterdikleri için bu izolatları Borderline Resistant *S. aureus* (BORSA) denmiştir ve direnç plazmid kontrolündedir [Ünal, 1993; Voss ve ark.,1994].

3- Intermediate metisilin direnci: Son yıllarda β -laktamaz negatif ve mec A geni taşımayan *S. aureus* izolatları elde edilmiştir. Bu mikroorganizmalarda diğer iki direnç mekanizmasının dışında yeni bir direnç mekanizması olduğu düşünülmektedir. Bu mekanizma ise, stafilokoklarda modifiye PBP'lere bağlı duyarlılık azalması şeklindedir. Bu şekildeki dirençli izolatları Modified Resistant *S. aureus* (MODSA) denir. Bu izolatlarıdaki direnç mekanizması pnömokoklardaki penisilin direncine benzemektedir [Ruben ve Norden, 1991; Arslan, 1995].

Marples ve arkadaşları tarafından 1986 yılında İngiltere'de MRSA suşlarına bağlı hastane infeksiyonlarının ortaya çıktığı ve infeksiyon nedeniyle ölümlerin olduğu rapor edilmiştir. MRSA suşlarının kolonizasyon ve infeksiyonlarının endemik,

epidemik ve sporadik olarak ortaya çıktığı bildirilmiştir [Marpler ve Cook, 1888]. MRSA suşları epidemiyolojik farklılıklar göstermesine rağmen bütün ülkelerde dirençlilik özellikleri bakımından benzerlik göstermektedir [Marpler ve Cook, 1888].

2.6. Biyofilm ve antibiyotik direnci

Biyofilm içindeki bakteriler antibiyotiklere planktonik üreyenlere kıyasla yaklaşık 1000 kat daha dirençlidirler [Hoyle ve Consterton, 1991]. Antibiyotik direncinin effluks pompası, enzim modifikasyonu ve hedef mutasyonu gibi bilinen mekanizmaları biyofilmdeki bakterinin korunmasında rol oynamaz. Hatta genetik olarak dirençli olmadığı bilinen bakteriler bile biyofilm formunda bulunduklarında azalmış duyarlılık gösterirler. Bakteriler biyofilmden ayrıldıkları zaman sıklıkla antibiyotiklere duyarlı hale gelirler [Anvar ve ark., 1989; William ve ark., 1997], bu da biyofilmdeki bakterilerin mutasyon veya taşınabilir genetik parçalar yoluyla direnç kazanmadığını düşündürür.

Bakteriyel biyofilmlerin antibiyotik direncinde ilk hipotez, antibiyotiklerin biyofilm içine yavaşlamış ya da yetersiz geçişidir [Steavart ve Consterton, 2001]. Biyofilm matriksi antibiyotiklerin biyofilm boyunca difüzyonunu sınırlayan, moleküllerin biyofilme öldürmek için yetersiz birikimi ile sonuçlanan fiziksel bir bariyer rolü oynayabilir. Ancak antibiyotikler gibi küçük moleküller için, matriks difüzyon sınırlaması göstermez [Steawrt, 1998] ve gerçekte birçok antibiyotik biyofilm serbestçe geçebilir [Vrany ve ark., 2003; Walters ve ark., 2003]. Diğer yandan negatif yüklü olan biyofilm matriksi, pozitif yük taşıyan aminoglikozidler gibi bazı antibiyotiklerin geçişini geciktirir.

Bir çalışmada, ampisilinin, β -laktamaz mutant *K. pneumoniae* tarafından yapılan biyofilmden difüze olurken, β -laktamaz üreten suşlara ait biyofilmden difüze olmamasının, antibiyotiğin enzim ile azaltılmasının biyofilme difüzyonundan daha hızlı olduğunu düşündürmüştür [Anderly ve ark., 2003]. Biyofilmin fiziksel bariyer oluşturma özelliğinin, özellikle vankomisin ve teikoplanin gibi glikopeptidlerin

geçişinin engellenmesi ve vankomisin, gentamisin ile olan sinerjistik etkisinin bozulmasında en önemli mekanizma olduğu gösterilmiştir [Farber ve ark., 1990].

İkinci hipotez biofilm içindeki değişmiş kimyasal mikroçevreye dayanır. Bu hipotez, besin ve oksijen kısıtlılığı sonucunda biyofilmde yavaş büyüme ve düşük metabolik aktivitenin antibiyotik toleransına yol açtığını öne sürer. Mikroelektrod ile yapılan çalışmalar göstermiştir ki, oksijen biofilmin yüzey tabakalarında tamamen tüketilir ve bu durum biofilmin derin tabakalarında anaerobik ortam oluşumuna yol açar. Böylece derin katlardaki biyofilm anaerob bir çevrede yaşar [Walters ve ark., 2003]. Anaerob koşullar hem aminoglikozidlerin hem de florokinolonların etkinliğini azaltır [Tack ve Sbaht, 1985; Zabinski ve ark., 1995] ki bu da oksijen kısıtlılığının antibiyotik toleransını kolaylaştırabileceğine işaret eder. Ek olarak, asidik ortam ürünlerin lokal birikimi esas sıvı ile biofilmin içi arasında 1’den fazla pH farklılığına yol açar ve direkt olarak antibiyotik etkisini antagonize eder. Bundan başka, biofilm içindeki osmotik çevre değiştirilebilir ve böylece osmotik stres yanıtı indüklenir [Prigent-Combaret ve ark., 1999].

Antimikrobiyal ajanlara karşı biofilm direncini açıklayan üçüncü hipotez, biofilm ilişkili hücrelerin planktonik hücrelerden anlamlı olarak daha yavaş büyüdüğü ve sonuç olarak antimikrobiyal ajanı daha yavaş tuttuğu şeklindedir. Bir substratın yokluğu ya da inhibitör bir ortam ürününün birikmesi bazı bakterilerin gelişiminin durmasına ve öldürülmekten korunmasına yol açar. Örnek olarak; hücre duvarı sentezini hedefleyen penisilin antibiyotikler yalnızca büyümekte olan bakterileri öldürebilirler [Stewart ve Consterton, 2001]. DuGuid ve arkadaşları *S. epidermidis* biyofilm büyüme hızlarının antibiyotik duyarlılığını kuvvetle etkilediğini; hücre büyüme hızı ne kadar yüksekse, siprofloksasinle inaktivasyon hızının o kadar yüksek olduğunu göstermişlerdir [DuGuid ve ark., 1992]

2.7. Biyofilm

2.7.1. Biyofilmin Tarihçesi

Mikroorganizmalar bir süre öncesine kadar, hızlı çoğalan ve tek başlarına hareket ederek serbestçe dolaşan canlılar olarak görülmekteydi. Araştırmacılar bu yüzden bu güne kadar, planktonik olarak da adlandırılan ve diğer bakterilerden bağımsız olarak, tek başlarına dolaşan mikrobiyal hücrelerin davranışlarını incelemiş ve araştırmalarını bu yönde geliştirmişlerdir. Bununla beraber, bakterilerin planktonik formdan çok, bir yüzeye tutunarak ve biyofilm adı verilen bir yapı oluşturarak hayatlarını devam ettirdiğine dair kanıtların ortaya konduğu bir çok çalışma gerçekleştirilmiştir [Rijnarts ve ark.,1993; Donlan, 2002].

Biyofilm kavramı, ilk 17. Yüzyılda Van Leeuwenhoek'un kendi dişlerindeki plaklarda, mikroskopla saptanabilen varlıkları tespit etmesi ile ortaya çıkmıştır. Uzun yıllar konu üzerinde herhangi bir çalışma yapılmamasına karşın, biyofilmler ve özellikleri ile ilgili genel teori 1978'den sonra artarak bildirilmeye başlanmıştır [Costerton ve ark., 1978]. O zamandan beri biyofilm yapısı, oluşum nedeni ve mekanizması ile ilgili çalışmalar hızla ilerlemiş olup biyofilimlerin varlığı derin yeraltı suları ve okyanusun derinleri dışında tüm doğal ekosistemlerde saptanmıştır [Costerton ve ark., 1995].

Marshall 1976 yılında çok ince ekstrasellüler polimer fibrillerin bakteri yüzeyine sabitlendiğini bildirmiştir [Marshall, 1976]. Costertan ve arkadaşları su sistemlerindeki bakteri topluluklarının, doğal olarak polisakkarid içinde bulunurken, yapışmış bakteri topluluklarının glikokaliks matriks içinde bulunduğunu ve bu matriks yapısının adhezyona aracılık ettiğini gözlemlemiş , 1987'de biyofilmin daha çok aniyonik eksopolimer matriksden oluşan oldukça hidrate yapı içinde sesil hücreler ve mikrokolonilerden oluştuğunu bildirmiştir [Costerton ve ark., 1995].

2.7.2.Biyofilm ve önemi

Rijnaarts ve arkadaşlarına göre (1993) biyofilm, bakteriyel hücrelerin mikrobiyal olarak değişime uğramış yüzeye ya da birbirine tutunarak, matriks ya da hücre dışı polimerik madde (EPS) içine gömülmüş olan tek hücrelerden çoğalan, genetik yapı ve protein sentezi açısından tamamen değişik, makroskobik olarak opak yapıda, ortalama 100-500 μ boyutlarında, koşullara göre değişen en ve boyda, kaygan, pürüzsüz, giderilmesi zor bir yapıdır [Rijnaarts ve ark., 1993; Hood ve Zottola, 1997; Watnick ve Kolter, 2000; Jenkinson ve Lappin-Scott, 2000; Sutherland, 2001; Donlan, 2002].

Elder ve arkadaşları (1995) biyofilmi, mikroorganizmaların ekzopolimer matriks aracılığı ile oluşturdukları yapısal birlik ve Carpentier ve Cerf (1993), bakterilerin gömülü olarak bulunduğu ve yüzeye yapışmış olan organik polimer matriks olarak tanımlamışlardır [Elder ve ark. 1995].

Watnic ve Kolter (2000) biyofilmi, cansız ya da canlı bir yüzeye tutunmuş birçok bakterinin salgıladıkları mukoz yapı içerisinde bir araya gelmesiyle oluşan “mikroplar şehri” olarak tanımlamıştır [Watnic ve ark. 2000].

Donlan (2002) biyofilmi, geri dönüşümsüz olarak bir substrata, ara yüze veya birbirlerine tutunmuş, kendi ürettikleri ekstrasellüler polimerik maddelerden oluşan bir matriks içerisinde gömülü, büyüme hızları ve gen transkripsiyonları açısından serbest dolaşan türdeşleri ile aralarında farklılıklar bulunan mikrobiyal hücrelerden oluşan hareketsiz bir topluluk olarak tanımlamıştır [Donlan 2002].

Post ve arkadaşlarına göre (2002) biyofilm, bir yüzeye yapışarak, belirli bir yapısal bütünlük içerisinde toplu halde yaşayan ve birbirleriyle haberleşerek varlıklarının

devamı için gerekli işlevlerin yerine getirilmesini sağlayan bakterilerin oluşturduğu bir organizasyondur.[Post ve ark. 2002].

Kierek ve Karatan (2005), Biyofilmler, hidrate bir matriks içerisinde gömülü hücrelerin oluşturduğu çok katmanlı,yüzeye bağlı mikrobiyal topluluklardır [Kierek ve Karatan, 2005].

Biyofilm içerisinde yaşamak bakteriler için avantajlıdır. Öncelikle matriks hem fiziksel güçlere hem de kimyasal saldırılara karşı (hidrojen peroksit, klorin gibi) koruyucu bariyer sağlar [Elkins ve ark., 1999; Noorwood ve Gilmous, 2000; Yıldız ve ark., 2001]. Biofilm içindeki bakteri birçok antibiyotik tarafından öldürmeye dirençlidir ve fagositoza direnç göstererek immün sistemden kaçır [Mah ve ark., 2003; Steawart ve ark., 2001; Leid ve ark., 2002].

Biyofilmin tek hücreden üstünlükleri Donlan (2002) tarafından dört madde altında toplanmıştır. Bunlar sırasıyla ;

- 1) Biyofilm içerisindeki bakterinin salgıladığı EPS yapısı ortamdaki besin maddelerinin (C-N-PO₄ gibi) daha konsantre hale gelmesini sağlayarak bakterilerin bu besinleri kullanımını artırmaktadır.
- 2) Biyofilm yapısındaki bakteriler anti mikrobiyal maddelere, yüzey gerilimi değiştiren ajanlara, sıcaklığa, konakçıya ait fagositlere, konakçı oksijen radikallerine, proteazlar gibi çeşitli koşullara ve maddelere karşı dirençlilik geliştirirler.
- 3) Yüzeyde bulunan bakterilerin tabakalı dizilimi çeşitli kimyasallara karşı mekanik kalkan oluşturmaktadır. Bunun yanı sıra yüzeydeki tabakada katalaz, peroksidaz, proteaz ve lipaz inhibitörleri salgılayarak antimikrobiyellere karşı iç yüzeyde bulunan bakterileri korurlar.
- 4) Biyofilm parçaları zamanla olgun biyofilmden koparak yeni yüzeylere yayılır. Bu şekilde planktonik bir hücrenin tutunmasından daha kolay bir tutunma

gerçekleştiriler. Böylece ortamda biyofilm oluştuğu anda birbirini takip eden tutunmalar daha hızlı gerçekleşecektir [Koluman, 2006].

Bakteriler tercihen olumsuz ortamlarda biyofilm yaparlar [John Wiley ve Sons, 1990]. Birçok kez pasajlanmış ve adhezyon yeteneğini yitirmiş laboratuvar suşlarıyla yapılmış bakteriyel adhezyon çalışmalarında, pürüzsüz yüzeylerin bakteriyel adhezyondan kaçabildiği saptanmıştır. Buna karşılık; pasajlanmamış ve bütünüyle adheran bakteriyel suşlarla yapılan çalışmalarda pürüzsüz yüzeylerin, pürüzlü yüzeyler kadar kolay kolonize olduğu ve yüzeyin fiziksel özelliklerinin bakteriyel adhezyona etkisinin minimal olduğu gösterilmiştir [Consterton, Lewondowski ve ark.,1995]. Biyofilm oluşumu sonrası sessil hücreler tarafından sentezlenen eksopolisakkarit matriks, biyofilme viskoelastik bir yapı kazandırır [Stoodley ve ark., 1998]. Bakterilerin uygun koşullarının olduğu ortamlarda oluşturdukları biyofilmler kırılgan bir yapıya sahipken, uygun olmayan koşullarda ürettikleri biyofilmlerin viskozitelerinin arttığı ve mekanik kırılmalara dayanıklı oldukları gösterilmiştir [Donlan, 2002].

Biyofilmin temel birimi “mikrokoloniler”dir. Mikrokoloniler bir veya birkaç türdeki bakteri hücresinden oluşurlar. Mikrokolonilerin %10-25’i hücrelerden ,%75-90’ı ise EPS matriksinden oluşmaktadır. Mikrokoloniler çoğunlukla “mantar benzeri şekil”e sahip yapı olarak tanımlanmıştır [Donlan, 2002].

2.7.3. Bakteriler neden biyofilm oluşturur?

1.Biyofilm formasyonunda strese yanıt

Biyofilmler, kan akımı ve salgıların yıkayıcı etkisi tarafından oluşturulan gerilme kuvvetleri gibi fiziksel kuvvetlere dirençlidir. Biyofilm, içindeki organizmaları besinsel eksikliklere, pH değişikliklerine, oksijen radikallerine, dezenfektanlara ve antibiyotiklere karşı koymada, planktonik hücrelerden daha başarılıdır. Biyofilme

zarar verme çabası gerçekte, biyofilmin kendisinden çok çevresindeki dokuya zarar verir.

2. Kolonizasyon

İnsanlar ve hayvanlar, sürekli olarak vücutlarına yerleşmeye çalışan mikroorganizmalara karşı kompleks bir immün sistem geliştirmişlerdir. Vücudun en azından bir bölümü, bakterinin yaşama ve gelişmesi için besin, su, O₂ ve ısı gibi ortamda devamlı bulunan faktörlerle sabit bir yapı oluşturmaktadır. Tüm bunların sonucu vücudun immün sistemi ile bakteri arasında, vücudu istila etmesine karşı amansız bir yarış süregitmektedir. Bazı durumlarda uzlaşma olarak belirli bölgelerde büyük miktarlarda kommensal bakterilerin yaşamasına mücade edilmektedir ve bu bakterilerin çoğu biyofilm oluşturmaktadır [Jefferson, 2004].

Biyofilm oluşum hipotezini destekleyen bir diğer bulgu da ,karbon katabolitlerini indükleyen gen regülasyonun biyofilm formasyonunda kritik rol oynadığı bulgusudur. Ekso polisakkarit ekspresyonu ve biyofilmin gelişmesi, glukoz ya da diğer kullanılabilir karbon kaynaklarının bol olması durumunda, *Pseudomonaslar*, *V.cholorae*, *E.coli*, *Stafilokok* ve *Streptococcuslar* gibi bazı bakterilerde önemli ölçüde artmıştır [O'Toole ve ark., 2000 ; Jefferson , Pier ve ark., 2004] .

3. Topluluk oluşturmak

Bakterilerin fenotipik farklılıkları olmasına karşın aynı çevre faktörlerine aynı yanıtı vermeleri topluluk oluşturma özelliklerinin en önemli göstergesidir [Jefferson, 2004].

Topluluk oluşturmak için bakteriler ;

- a) Metabolik yükü paylaşmak
- b) Gen transferi
- c) Özverili davranış gibi bir dizi düzenlenebilir davranış gösterirler.

4. Yaşanabilir çevre geliştirme

Özellikle ortamdaki glukozun bakteri tarafından kullanılabilir olmasının *Pseudomonaslar*, *V.cholorae*, *E.coli* ve *Staphylococlar*ın EPS ekspresyonu ve biyofilm oluşturmalarını belirgin bir şekilde arttırdığı gösterilmiştir. Karbon katabolitlerinin konakçıda yapışmış bakterinin gen regülasyonunu indükleyerek biyofilm oluşumunda kritik rol oynaması baterinin konakçıda uygun bir ortam oluşturarak kalabilmesindeki mekanizmalar için biyofilm gerekliliği hipotezini ciddi şekilde desteklemektedir [O'Tootle ve ark., 2000; Ammendolia ve ark., 1999].

2.7.4. Biyofilm yapısı ve genel özellikleri

Pek çok mikroorganizma ekstraselüler polimerik araçların biyosentezi tarafından fonksiyonel bir yapı oluştururlar ve biyofilin olarak isimlendirilen ekstraselüler polimerik maddeler (ekzopolisakkaritler, EPS'ler) sentezlerler [Yılmaz ve Çelik, 2007].

Biyofilmdeki hücreler, polisakkaritler, proteinler, DNA ve su karışımından oluşan ekstraselüler matriks yapısı ile birbirlerine tutunmaktadırlar. Bu ürün bakterilerin koloniler olarak büyümelerine yardım eden, besleyiciler ile konuşlanmış ,sert yüzeylere tutunmalarını sağlayan yapılardır. Bu EPS'ler ya bakteri yüzeyine tutulu olarak kalırlar ya da yapışkan bir şekilde ekstraselüler ortamlarda serbest olarak bulunurlar. Jel oluşumu, flokulasyon, emülsiyon, absorbsiyon, film formasyonu ve koruma gibi pek çok role sahip bu polimerler, biyofilm matriksinin ana yapı materyalidir [Yılmaz ve Çelik, 2007].

EPS'nin kimyasal ve fiziksel olarak farklılık gösterse de öncelikli olarak polisakkaritten oluştuğu, polisakkaritlerden bir kısmının doğal, bir kısmında anyonik yapıda olduğu ortaya konmuştur. Uronik asitlerin (D-glukonik, D-galakturonik ve mannuronik asitler) ya da ketal bağlantılı piruvatların bu yapıya anyonik özellik kattığı bildirilmiştir [Sutherland, 2001]. Biyofilmde gram pozitif bakterilerin varlığında EPS katyonik yapı gösterir ve ana yapı teikoik asit ve proteinden oluşur [Hussain ve ark. 1993] .

Sutherland (2001), tarafından yapılan çalışmada EPS'nin yüksek seviyede su içerdiğini ve yapısındaki hidrofobik ya da hidrofilik kısımlar barındırdığını bildirilmiştir.

Leriche ve ark. (2000), tarafından yapılan benzer bir çalışmada ise hidrofilik bölümlerde yapının %93'nün su olduğu bildirilmiştir. Hem hidrofilik hem de hidrofobik yapıların bir arada olduğu EPS varlığı, çeşitli bakterilerce oluşturulan biyofilmde tanımlanmıştır [Koluman, 2006] .

Polisakkaritler, üretici suşlar tarafından katabolize edilemediklerinden enerji kaynağı değildirler, buna karşılık mikroorganizmayı veya ortamı kurumaya karşı korur, zararlı veya düşman bir ortamdan uzaklaştırırlar. EPS, bakteriyi koruyucu bir örtü şeklinde sarmakta ve olası tehlikelere karşı onları korumaktadır. EPS'nin bakteriyi koruma özelliği ayrıca antibiyotiklere karşıda fiziksel bir koruyuculuk şeklinde de ortaya çıkmaktadır. Ortamdaki metabolik iyonların tutulmasını sağlarlar ayrıca bitki, insan ve hayvan patojenlerinin ürettikleri EPS'lerin virülans faktörü oldukları da bilinmektedir. Aynı zamanda bitkilerle bakteriler arasında bir etkileşim aracıdır. Sonuç olarak, yüksek moleküler yapıya sahip EPS şekli kolonin direncini ve kararlılığını ortaya koymaktadır [Yılmaz ve Çelik, 2007].

Polisakkaritler, bakteri suşlarının çoğalmaları sırasında suşa ve çoğalma evresinin farklı kademelerine göre değişen koşullarda sentezlenir. Sentez, hücre dışında olduğu kadar membranda da meydana gelebilir. EPS sentezinin Sutherland (2001), tarafından önerilen genel modele göre gerçekleştiği düşüncesi ağırlık kazanmıştır. EPS oluşumunda ;

- UDP-glikoz-dehidrogenaz
- Glikozil- transferaz
- Galaktozil-transferaz 1 ve 2
- Polimeraz gibi polisakkarit sentezine özgü olmayan birçok enzim görev alır.

- Heteropolisakkaritler hücre içinde sentezlenirler ve daha sonra hücre dışına çıkarılarak hücrenin etrafını sararlar. Bu işlemler için birçok enzimin varlığına ihtiyaç duyulur. Bu enzimlerden bazıları lipopolisakkaritlerin sentezinde de kullanılmaktadır. Nötral homopolisakkaritlerin sentezi farklıdır. Hücre dışında üretilen bu EPS'ler sakkaroz varlığında sırasıyla, levansukroz ve dekstransukroz enzimlerinin aktivitesi ile ekstraselüler olarak üretilmektedir [Yılmaz ve Çelik, 2007].

2.7.5. Biyofilm oluşum mekanizması

Bir biyofilmin oluşması için gerekli olan ortak bileşenler mikroorganizma, glikokaliks ve yüzeydir. Bu bileşenlerden biri olmadığı takdirde biyofilm oluşmaz [Donlan, 2002].

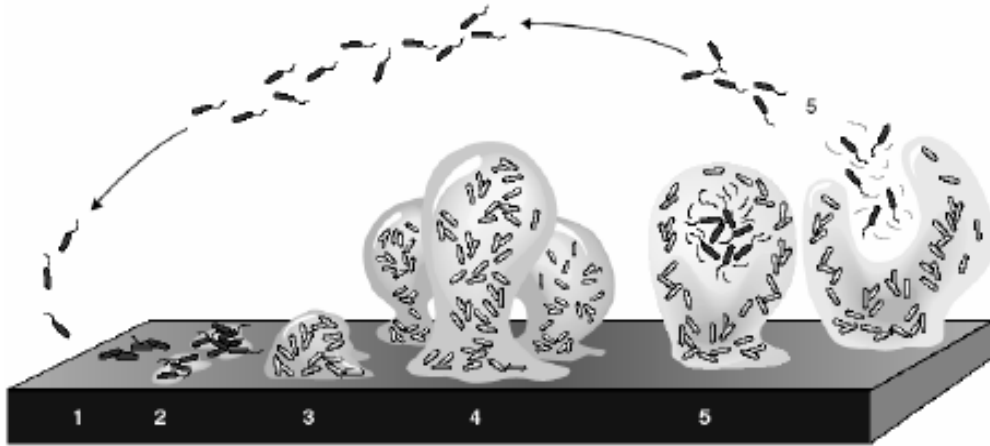
Bir biyofilmin yapısı %95-97 su olmak üzere %2-5 mikroorganizma, %1-2 polisakkarid, %1-2 protein, %1-2 DNA ve iyonlardan oluşmaktadır. Biyofilmler tek bir mikroorganizma türü tarafından oluşturulabildiği gibi birden fazla türü de yapısında barındırabilir. Farklı türlerde oluşan biyofilmlerde her tür kendi mikrokolonisini oluşturur. Bu mikrokoloniler birbirlerinden su kanalları aracılığıyla ayrılmıştır. Bu su kanalları içinde devam eden su akışı besin maddelerinin ve oksijenin difüzyonunu sağlar. Sistemin yapısına, mikroorganizmanın türüne ve çevresel faktörlere bağlı olarak olgun bir biyofilmin oluşması birkaç saat ile birkaç hafta zaman alır. Örneğin; *P. aeruginosa*'nın elektrik yüklü bir yüzeye yapışması sadece 30 saniye alır [Jones ve ark., 1969].

Genomik ve proteomik çalışmalar sonunda biyofilm gelişimi ile ilgili birçok gen bulunmuştur. Bu genlerin hücre fizyolojisindeki rolleri araştırıldığında adezyon, “quorum sensing”, hücre duvar yapımı, metabolizma, stres cevabı ve plazmide bağlanmada etkili oldukları görülmüştür. Biyofilm oluşukça mikro çevredeki değişiklikler gen ekspresyonlarında da değişiklikler oluşturarak biyofilmin

oluşumunu hızlandırmaktadır. Biyofilm oluşumuna etkili genlerin bir kısmı biyofilm oluşumunu arttırırken bir kısmı da azaltmaktadır. Biyofilm oluşturan genetik materyal plazmidler aracılığı ile de kolaylıkla aktarılmaktadır [Post ve ark., 2004].

Biyofilm gelişimi uygun mikroorganizmaların varlığında hemen hemen her çevre ve her yüzeyde meydana gelebilir. Mikroorganizmaların çoğunluğu durumunda; mikroorganizmaların normal yaşamı ve üremeleri için katı yüzeylere tutunmasında canlı ya da inert ve /veya organik ya da inorganik oluşumlar esansiyel şartlardır [Costerton ve ark. ,1987; Melo ve ark., 1992; Zottola ve Sasahara ,1994].

Biyofilm oluşumu 5 evrede gerçekleşmektedir;



Resim 2.1. Biyofilm oluşum aşamaları

1.Tutunma

Biyofilm oluşumu bakterilerin bir yüzeye tutunmaları ile başlayan dinamik bir olaydır. Tutunma sonucu biyofilm fenotipinin ortaya çıkmasına neden olan bir dizi genetik işlem başlatılır. Bakterilerin bir yüzeye tutunabilmeleri için, kendilerinin bir yüzey ile ne zaman temas kurduklarını anlamaları gereklidir. Bakteriler bu çevresel uyarıları fenotipik değişiklere çevirebilmek amacıyla, bir verici ve bir alıcıdan oluşan düzenleyici bir sisteme sahiptir. Tutunma işleminden sonra biyofilm oluşturmak yönünde farklılaşma işleminin başlaması, “quorum sensing” sistemi denilen baska bir haberleşme sisteminden gelen yanıtlara bağlıdır. Bu sistem ile bakteriler çevrelerindeki bakteriyel popülasyonun yoğunluğunu belirlerler. Bir yüzeye tutunan her bakteri, ortama mesaj veren bir molekül salgılar. Yüzeye tutunan bakterilerin sayısı arttıkça, bu sinyalin lokal konsantrasyonları artmaktadır. Bu sinyal molekülünün konsantrasyonundaki artış ile birlikte, biyofilm oluşumuna yönelik bir dizi işlem başlatılmış olur. Biyofilm içerisindeki bakteriler intersellüler, düşük molekül ağırlıklarına sahip haberciler aracılığıyla iletişim sağlarlar [Vuong, 2002].

Başlangıçta bakteri hücreleri arasında gelişen zayıf etkileşim ve substrat reversibl tutunmadır; Reversible yapışma sürecini etkileyen çeşitli uzun mesafe etkileşim güçleri, elektrostatik güç ve hidrofobik etkileşimlerdir. Bu aşamada bakteri hala Brown hareketi gösterir ve çok az bir durulama gibi kesici güç akımları ile ortadan kaldırılabilir [Marshall ve ark.,1971]. Hücrelerin irreversibl tutunması ise biyofilm oluşumundaki bir sonraki çok önemli basamaktır. İtici güçler bakteri hücrelerinin yüzeyle direkt kontaktını engeller. Ancak bakterilerin flagella, fimbria ve pili gibi yüzey uzantılarını ve ekzopolisakkarit fibrillerinin üretiminden dolayı yüzeyle temas devam eder [Jones ve Isaacson, 1983; Hancock, 1991]. Geri dönüşümsüz tutunma dipol dipol etkileşimi, hidrojen, iyonik ve kovalent bağlar ve hidrofobik etkileşimleri içeren kısa mesafede etkili çeşitli güçleri içerir. Bakteri hücresi ile yüzey arasında köprü görevi gören polimerik fibriller yüzeyle geri dönüşümsüz tutunmaya olanak sağlar. Bu süreçte hücrelerin yüzeyle ilişkisinin kesilmesi ortadan kaldırılması için fırçalama ve ovalama gibi çok güçlü kuvvetler gereklidir [Marshall ve ark., 1971].

2. Yapışma

Bakterilerin yüzeye yapışma veya kuvvetli bir şekilde tutunma işlemidir [Vuong, 2002].

3. Toplanma

Bakteriler mikrokoloniler haline dönüşürler [Vuong,2002]. Geri dönüşümsüz tutunan bakteri hücreleri bu şartlar altında büyür ve bölünür. Bu da mikrokolonilerin oluşumuna neden olur. Bu periyotta yapışan hücreler polimer (EPS)üretimi gerçekleştirir. Polimer üretimi hücrelerin yüzeye sabitlenmesini ve çevreden gelen bozucu etkilere, karşı koymasını sağlar [Characklis ve Marshall,1990].

4. Olgun Biyofilm

Mikrokoloniler büyürler ve kompleks, mantar şeklindeki yapılara veya kulelere dönüşürler.

5. Kopma veya Ayrılma Evresi

Bakteri veya bakteri kümeleri biyofilm tabakasından koparak ortama yayılır. Ayrılma işlemi dış kuvvetlerin etkisiyle olabileceği gibi, biyofilm oluşum sürecinin bir parçası olarak tek bir hücrenin veya multipl hücrelerin emboli şeklinde kopmasının bir sonucudur [Vuong, 2002].

2.7.6. Quorum Sensing

Biyofilm oluşumu bakterilerin bir araya gelerek belirli bir yüzeye tutunarak yapışmaları ve o yüzeydeki diğer türlerle birlikte yaşamaya devam ettikleri, rastgele gerçekleşen bir olay değildir. Bazı bakterilerde biyofilm oluşumunun, bakteriyel hücreden hücreye iletişim dizgeleri ile kontrol edildiği açıktır. Ökaryot ve prokaryot

hücrelerden salınan ve hücreler arası sinyal iletimini sağlayarak, bakterinin gen ekspresyonunu düzenleyen moleküllerle, biyofilm yapımının düzenlenebileceği gösterilmiştir. Bu veriler biyofilmin patojenite ve çevreye adaptasyonda önemini arttırmıştır. Çoğunluğu algılama “quorum sensing” (QS) olarak adlandırabileceğimiz bu dizgeler, geniş bir organizma topluluğunda virülans etkenlerinin düzenlenmesinde de yer alırlar [Davies, 1998; Labbate , 2004; Lynch, 2002].

Biyofilm içindeki bakteriler, yüksek hücre yoğunluğu ve sınırlı besin nedeniyle yavaş gelişir [Moller ve ark., 1996]. Buna dayanarak ortaya çıkan ve “quorum sensing” olarak bilinen hücreler arası sinyal hipotezi, biofilm fizyolojisi ve gelişiminde önemlidir [Davies ve ark., 1998; Zhu ve Mekalanos, 2003]. Taşlar üzerinde oluşmuş suya ait biyofilmlerde yapılan araştırmalarda quorum sensing hormonu açıl-homoserin laktam (AHL) yanıtı *Agrobacterium tumefaciens* A136 ‘da saptanmıştır ve bu çalışma doğal olarak oluşmuş biyofilmlerde “kendi kendini uyarıcı aktiviteyi” kanıtlayan ilk yayındır [McLean ve ark., 1997].

Çeşitli bakteri türlerinde, sekonder metabolit üretimi yüzme ve kümelenme hareketi konjugal plazmid transferi ,antibiyotik direnci, biyofilm gelişimi ve virulans gibi fizyolojik süreçler quorum sensing aracılığı ile düzenlenir [Williams,2006]. İlk kez Fuqua ve arkadaşları (1994) tarafından kullanılan bu terim “autoinducer” veya bazende “pheromone” olarak adlandırılan sinyal moleküllerinin eşik konsantrasyonuna ulaşması sonrası ,hücre populasyon yoğunluğuna bağlı olarak gen ekspresyonunun olduğu, bakteriyel hücreler arası iletişimin partiküler bir formu olarak tanımlanmıştır [Fuqua ve ark., 1994] .

Başka bir tanımla quorum sensing, bakterilerin salgıladıkları “autoinducer” adı verilen küçük sinyal moleküllerinin konsantrasyonunu ölçerek, hücre populasyon yoğunluğunu ölçmeleridir [Federle ve Bassler,2003]. Quorum sensing bakteri populasyonunda, hücreler bu “ autoinducer”ları oluşturur ve ekstraselüler ortama salgırlar. Böylece “ekstraselüler autuinducer” konsantrasyonu izleme yoluyla,

bakteriler birbirlerini sayabilir ve buna göre hedef gen ekspresyonunu değiştirebilirler [Miller ve ark., 2001] .

Quorum sensing sistem iki örnek grupta sınıflandırılabilir ;

1. Gram negatif bakterilerde
2. Gram pozitif bakterilerde [Federle ve Bassler, 2003].

Gram negatif bakterilerde “açıl homoserin laktonlar (AHLs) “quorum sensing’e etki eden ana moleküldür ve biyofim mimarisini etkilediği gösterilmiştir [Parsek ve Greenberg, 2000].

Gram negatif bakterilerin tam tersine, gram pozitif bakterilerde AHL aracılı quorum sensing kullanımı gösterilmemiştir[Federle ve Bassler, 2003]. Gram pozitif bakteriler ,oligopeptit “autoinducer”larını yapar ve çevrelerinde taşırlar. Bu ”oligopeptitler autoinducing peptitler (AIPs)”olarak bilinirler ve tipik olarak 5-17 aminoasitten oluşmakla birlikte, bazen alışılmışın dışında yan zincir modifikasyonları içerirler [Lazazzera ve Grassman, 1998]. Bunun yanı sıra AHL sinyalinin farklı olarak, bakteri hücre membranı AIPs karşı geçirgen değildir. Bu de ekstraselüler ortama AIPs salgılanmasını kolaylaştırmak için hücre yüzeyine özgü oligopeptit taşıyıcılarını gerekli kılmıştır. AIPs saptanması, iki komponentli duysal iletim sistemi aracılığı ile olur [Federle ve Bassler, 2003].

Bu iki komponentli sistem, çok çeşitli gram negatif ve gram pozitif bakteri de vardır. Bu döngüler,çok çeşitli ekstraselüler sistemlerin dalgalanmalarını belirlemekten ve bu esansiyel bilgiyi, değişen çevre şartlarına yanıt olarak, gen ekspresyonunu doğru bir şekilde ayarlayabilmek için hücre içine taşımaktan sorumludurlar [Hakenbeck ve Stock, 1996].

İnsanlarda çeşitli hastalıklara yol açma özelliğini geliştirmek ve konağın birçok hücrelerini işgal etmek için Stafilokoklar, hücreler arası iletişimi sağlayan ve birçok

kolonizasyon ve virölans faktörünü düzenleyen quorum sensing sistemini geliştirmişlerdir. *Staphylococcus aureus* quorum sensing sistemi, agr (accessory gene regulator) bölgesi tarafından kodlanır. (AgrBDCA). Stafilokokla gen düzenleyici (agr) quorum sensing sistemi, in vitro olarak birçok hücre yüzey proteinin salınımını azaltırken logaritmik büyüme fazından durağan faza geçişte salgılanan virölans faktörlerinin salınımını artırır [Vuong ve ark., 2000; Novick ve ark., 1993]. *Staphylococcus aureus* 'un durağan biyofilm sistemindeki agrD mutanlığı doğal suştan daha geniş biyofilm oluşturur [Yarwood ve ark., 2004]. Bu suşlar tarafından akışkan hücrelerde oluşturulan biyofilm yapısı ve kalınlık açısından anlamlı fark göstermez [Kierek-Pearson ve Karatan, 2005].

2.7.7.Biyofilm oluşumunun klinik olarak önemi

Biyofilmlerin öneminin anlaşılması ve bu yönde yapılan çalışmalar son otuz yıldır hız kazanmıştır. Vücut içerisinde biyofilm oluşumu önem taşımaktadır. Oluşan biyofilmler yüksek ateş, ciddi organ hasarları ve hatta ölüme bile neden olabilirler. Birçok biyomalzeme üzerine tutunan bakteriler, biyofilm oluşturarak enfeksiyona neden olurlar. Bu tip üreme kronik enfeksiyonları da beraberinde getirir, çünkü biyofilmlerden doğal olarak zaman zaman kopan mikroorganizmalar vücutta başka yerlerde de bir enfeksiyona neden olabilirler [Consterton ve ark., 1999]. Klinik olarak biyofilmler canlı dokularda ve vücuda implante edilen biyomalzemeler üzerinde oluşabilirler [Jefferson ,2004].

Biyofilm oluşturan bakteriler ile doğal kapak endokarditi, otitis media, kronik bakteriyel prostatit, kistik fibrozis, periodontit gibi doğal seyirli hastalıklar ve bunun dışında, protez kapak, santral venöz katater, üriner kateter, ortopedik protez, kontakt lens ve intrauterin cihazlar gibi yabancı cisim enfeksiyonları arasındaki epidemiyolojik bağ artık kanıtlanmıştır. Bu ilişkide değişik mekanizmaların rol oynadığı bildirilmiştir [Donlan ve Consterton, 2002].

Patojen mikroorganizmalar yaşamlarını sürdürebilmek ve çoğalabilmek için genellikle canlı dokulara tutunurlar. Mikroorganizmaların tutunması için uygun proteinlere sahip olan canlı doku ,aynı zamana mikroorganizmaların beslenmesi için önemli olan besinleri de elde etmelerini sağlar. Dokulara tutunan bakteriler uygun yaşam şartları nedeniyle çok hızlı bir biçimde çoğalmaya başlar ve kısa süre içerisinde biyofilm oluşturabilirler. Normal bir bakteriyel floranın patojenik hale geçmesin de söz konusu olabilir. Bu geçiş, doku yüzey kimyasındaki değişimlerle ,antibiyotik tedavisiyle veya yaşlanma sonucu ortaya çıkabilir. Patojen olmayan (saprofit) mikroorganizmalar normal bulundukları ortamdan farklı bir bölgeye yerleştiklerinde patojen hale geçebilirler. Yer değişikliği sonucunda aşırı üreme ve buna bağlı olarak zehirli atık üretiminin artması zararsız mikroorganizmaları da zararlı hale getirmektedir. Mikroorganizmalar yapışkan polimerler üretilip ,fimbria gibi yüzey bileşenlerini kullandıklarından kuvvetli bir yapışma özelliğine sahiptir. Böylece bulundukları ortamdaki sıvı akışı (örneğin kan) ve mekanik hareket gibi onlar için olumsuz fiziksel şartlardan korunurlar [Jefferson, 1994].

Biyomalzeme olarak metaller, seramikler, kompozitler ve polimerler kullanılmaktadır. Yapay deri, damar, kalp, eklem gibi birçok protez bu malzemelerden üretilmektedir. Biyomalzemelerin vücut tarafından kabul edilmesi için biyoyumlu olmaları gerekmektedir. Biyoyumlu malzemeler aynı zamanda bakteriler içinde elverişli olabilir. Örneğin vücut hücrelerinin kaplanması için fibronektin gibi bağlayıcı (yapıştırıcı) proteinler kullanılır. Bu proteinler sadece vücut hücreleri için değil, bakteriler için de bağlayıcı bir fonksiyon göstermektedir. Fakat bazı durumlarda bu fonksiyon farklılaşabilmektedir. Örneğin fibronektin yüksek derişimlerde vücut hücreleri için bağlayıcı özelliğini korumakta ,ancak bakteri hücreleri için bu fonksiyonunu kaybetmektedir. Mikroorganizmaların sentetik malzemelere tutunarak sağladıkları en önemli avantaj, canlı dokudaki bağışıklık sistemiyle karşı karşıya gelmemeleridir. Bunu dışında ,malzemede bulunan bazı metaller (Al_3^+ , Mg_2^+), mikroorganizmaların oluşturduğu hücre dışı polisakkarit matris için destek malzeme oluşturur. Böylece mikroorganizmalar olumsuz dış koşullara

karşı daha dayanıklı hale gelir [Consterton ve ark., 1999]. Biyomalzemeye patojen bakteriler iki şekilde ulaşabilir. Birinci yol, üretim veya implantasyon sırasında malzemenin bakterilerle temas ederek enfekte olması ve vücuda bu şekilde yerleşmesidir. İkinci yol ise, vücut içerisinde bulunan veya vücutun dış ortama açık kısımlarından (ağız,burun v.b.) vücuda bulşan mikroorganizmaların vücut sıvıları yoluyla malzemeye ulaşması şeklindedir. İmplantların reddedilmesini önlemek amacıyla implant yerleştirildikten sonra bağışıklık sistemi baskılanır, ancak bu durum enfeksiyon riskini de artırır.

Biyofilmlerle ilgili enfeksiyonlar

Biyofilmler ile ilişkili enfeksiyonların bulunma sıklığı ve modelini belirlemek güçtür. Ancak biyofilmlerin, dental plak, üst solunum yolu enfeksiyonları, peritonit, ürogenital enfeksiyonlar ve yabancı cisim enfeksiyonları gibi birçok durumla ilgili oldukları söylenebilir. Biyofilmler normal floranın oluşumundan, kronik enfeksiyonlar kadar çok geniş bir yelpazede rol oynamaktadırlar.

Biyofilm oluşumu; *S.aureus*, *S. epidermidis*, *viridans streptokoklar*, *enterokoklar*, *aktinomiçesler*, *E.coli*, *P. aeruginosa*, *B.cepacia*, *V.cholerae*, *Klebsiella spp.* ve *Candida ssp.* gibi birçok mikroorganizmada gösterilmiştir. Biyofilm oluşturan bakterilerin yüzeylere adheransının, biyofilm oluşturmayan bakterilere oranla daha fazla olduğu bilinmektedir [Kirov ve ark.,2003].

Biyofilmler doğaları gereği konak savunması ve antibiyotiklerden konurlar. Biyofilm matriksi, biyofilm bakterilerinin konak savunmasından korunmasında anahtar rol oynar [Fux ve ark. ,2005].

Yapılan çalışmalar *Aeromonas*'ların neden olduğu gastroenterik enfeksiyonların %30'unun biyofilm oluşumları olduklarını göstermiştir. *Aeromonas* türlerinin lateral ve polar flagellaları konak hücrenin yüzeyine tutunmada kritik rol oynamaktadır.

Polar flagella yüzme hareketi ve ilk tutunma ile intestinal kolonizasyonda rol alırken lateral flagella ise, belirgin bir şekilde hücrelere tutunmada rol oynamaktadır. Bu flagellalar insan bağırsak hücrelerine tutunabilmekte olup, tüm bu bulgular her iki flagellanın *Aeromonas*'ların biyofilm oluşumu sırasında yüzeylere tutunmasında etkili olduğu sonucunu desteklemektedir [Kirov ve ark., 2003].

Younis ve arkadaşları(2004), polisakkarit inter sellüler adhesin'i (PIA) yıkıcı mutasyon geçirmiş bakterilerde, polimorfonükleer lökositlerle fagositoz ve öldürmenin arttırdığını bildirmişlerdir [Younis ve ark., 2004].

Shiau ve Wu (1998), *Staphylococcus epidermidis* tarafından üretilen ekstrasellüler slime faktörünün makrofaj fagositik aktivitesine engel olduğunu saptamıştır.

Meluleni ve arkadaşları (1995), kronik kistik fibrozisli hastalara ait opsonik antikorların, biyofilm mikrokolonilerinde gelişen bakteriyel hücrelerin fagositozu ve eliminasyonda etkisiz olduğunu göstermiştir.

Yasuda ve arkadaşları (1994), biyofilm içerisinde gelişen *E.coli* hücrelerini fagositoza duyarlı biyofilm dışı bakteriler ile süspanse etmiş ve in vitro olarak insan polimorfonükleer lökositlerinin öldürücü aktivitesine karşı daha az duyarlı olduklarını saptamışlardır. Buna dayanarak fagositoza dirençteki artışın, biyofilm bakterilerinin polimorfonükleer lökositlerdeki oksijen ile öldürülemeyen, dirençli türler ortaya çıktığı hipotezini öne sürmüşlerdir. Bu sonuca göre, medikal araçlar veya kronik enfeksiyonlardaki biyofilmlerden ayrılan organizmalar immün sistemi aşarak enfeksiyon oluşturmaya daha hazırdır [Yasuda ve ark., 1994].

Biyofilm ve antibiyotik direnci

Biyofilm içerisindeki bakterilerin en önemli özelliği, konak cevabından kurtulup antibiyotik tedavisine direnç göstermeleridir. Laboratuvar koşullarında (in vitro) yapılan testlerde biyofilm bakterilerinin, serbest bakteriler için belirlenen minimum

inhibisyon konsantrasyonundan (MIC) birkaç yüz veya bin kez fazla antibiyotik konsantrasyonuna bile direnç gösterdikleri bulunmuştur [Stewart ve Consterton, 2001]. Vücut içinde (in vivo) antibiyotikler serbest bakterileri öldürerek enfeksiyon riskini azaltabilir, fakat antibiyotik tedavisi kesildiği anda biyofilm oluşumu yeniden gözlenir.

Mikroorganizmalar biyofilm oluşturduğunda, antimikrobiyallere karşı oldukça dirençlidir. Biyofilmi oluşturan her mikroorganizma tek başına bulunduğunda, herhangi bir antimikrobiyal ile kolayca inhibe olmasına rağmen biyofilm mimarisi içinde yer aldığı zaman aynı mikrobiyal ile inhibe etmek oldukça zordur [Durack ve Beeson, 1972] . Biyofilm oluştuğu zaman onu yüzeyden ayırmak son derece güçtür ve antimikrobiyal ajanlara karşı dirençlidir [Brunce ve ark., 1992]. Biyofilmin doğal yapısı ve biyofilmi içindeki mikroorganizmalar antibiyotik, dezenfektan ve germisid gibi antimikrobiyal ajanlara karşı direnç göstermektedir.

Direnç gösterme mekanizmaları şu şekilde açıklanabilir [Patti ve ark., 1994];

Antimikrobiyal ajanın biyofilm matriksinde çok yavaş ilerlemesi

Antimikrobiyal ajanların hücreleri inaktive edebilmesi için, biyofilm matriks içerisinde yayılması gerekmektedir. Biyofilm matriksini oluşturan ekstreşellüler polimerik maddeler antimikrobiyal moleküllerin yayılım hızını yavaşlatan ya da matriks ajanlarıyla ilişkisini kesen bariyer görevi görmektedir [Pattive ve ark., 1994].

Biyofilm organizmalarının üreme hızlarının değişmesi

Biyofilm hücrelerinin planktonik fazdaki hücrelere göre çok yavaş çoğaldığı bu nedenle antimikrobiyal ajanları çok daha yavaş hücre içersiene aldığı bildirilmektedir [Pattive ve ark., 1994].

Biyofilm gelişimi sırasında diğer fizyolojik değişiklikler

Biyofilm gelişimi sırasında besin kısıtlaması ya da toksik metabolik maddelerin konsantrasyonlarının artması biyofilmin derin tabakalarında şiddetli şekilde izlenebilir ve bu şekilde biyofilm gelişimi etkilenebilir [Pattive ve ark.,1994].

Biyofilm içerisindeki hücrelerden en az bir kısmı besin yetersizliği yaşamakta ve bu nedenle yavaş üreme fazına girmek zorunda kalmaktadır [Characklis ve Marshall, 1990].

Biyofilm içinde çoğalan bakterilerin aynı suşa ait planktonik bakterilerle karşılaştırıldığında antimikrobiyal ajanların çok yüksek konsantrasyonlarda duyarlı olduğu gösterilmiştir [Olson ve ark., 2002; Amorena ve ark., 1999; Ceri ve ark., 1999]. Biyofilm içindeki bakterilerin direncinde bilinen antibiyotik direnç mekanizmaları (effluks pompası, enzim modifikasyonu ve hedef mutasyonu) rol oynamaz. Biyofilmin antimikrobiyal ajanlara direncinden sorumlu olan 3 ana mekanizma bildirilmiştir [Mah ve O'Toole, 2001; Gilbert ve ark., 1997; Stewart, 2000]. Bu mekanizmalardan ilk i 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 adsorbsiyonu biyofilm içine antibakteriyel ajanın transportunu sınırlandırabilir [Stewart, 1996].

Anderl ve ark. (2000), *Klebsiella pneumonia* tarafından oluşturulan biyofilme ampisilinin penetre olamadığını hatta biyofilm içinde çoğalan beta-laktamaz geni yönünden mutant *K. pneumonia* suşlarının bile ampisiline dirençli olduğunu göstermiştir.

Biyofilmin antimikrobiyal ajanlara karşı bir bariyer olup olmadığını belirlemeye yönelik yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* biyofilminin piperasilinin difüzyonunu engellediği, *S. epidermidis*

biyofilminin ise rifampisin ve vankomisin difüzyonuna izin verdiği ve bu antibiyotiklerin etkin şekilde biyofilme penetre olabildiği gösterilmiştir. *K. pneumoniae* tarafından oluşturulan biyofilme ampisilinin penetre olamadığı hatta biyofilm içinde çoğalan *K. pneumonia* beta-laktamaz mutantlarının bile ampisiline dirençli olduğu gösterilmiştir. Biyofilm kalınlığı ve antibiyotiklere direnç arasında lineer bir korelasyon olduğu gözlenmiştir [Melchior ve ark., 2006]. Bu sonuçlar, ekzopolisakkarid matriksin antimikrobiyal ajanların difüzyonuna karşı tam bir engel oluşturmadığını ve farklı mekanizmaların da biyofilmdeki bakterilerin antimikrobiyal direncine katkı sağladığını göstermektedir.

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

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

Biyofilmlerdeki bakteriler sadece antibiyotikler tarafından öldürülmeye değil klorin ve glutaraldehid gibi kimyasal dezenfektanlara da direnç göstermektedir.

Biyofilmdeki persiste hücre subpopulasyonu geniş antibiyotik direncinden sorumlu tutulmaktadır. Persiste hücre populasyonu oldukça korunmuş spor benzeri bir yapı özelliği göstermektedir. Uzun süreli antibiyotik tedavisi sonrasında biyofilmdeki bakteri populasyonun büyük bir kısmı ölmesine rağmen küçük bir bakteri populasyonu etkilenmeden kalmaktadır. Çok ince biyofilmlerde bile bakterilerin antibiyotiklere düşük duyarlılık geliştirmeleri persiste hücreler ile açıklanmaktadır [Stewart, 2002].

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

2.7.8. Biyofilm oluşumunun gıda endüstrisi açısından önemi

Doğada ve gıda sistemlerinde mikroorganizmalar gelişimlerini ve yaşamlarını sürdürebilmek için uygun besinleri iyonlar ve diğer organik maddelerin temas halinde olduğu katı yüzeylere tutunurlar. Biyofilm ve biyolojik kirlenme temas halinde bulunan yüzeyler üzerinde ki gelişme ve biyolojik yapışmayla ilgili iki terimdir [Zottola ve Sasahara, 1994]. Doğada ve gıda işletim sistemlerinde ortamda

bulunan patojenlerin yüzey teması direk olarak kontamine olan yüzeylerle ya da indirek olarak hava kökenli partiküller aracılığı ile olur [Lindsay ve Holy, 1999].

Birçok patojen ve gıda kökenli bakteri gıdaya temas halindeki yüzeylere yapışabilme yeteneğindedir. Bu bakterilerden bazıları biyofilm oluşturmaya daha fazla eğilimlidir. Bunlardan *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Staphylococcus* ve *Bacillus* en yaygın olanlarıdır [Mattila-Sandholm ve Wirtanen, 1992; Genigeorgis, 1995]. Bu nedenle temizlik ve dezenfeksiyon mikrobiyal oluşumun akümülayonunu önlemek için oldukça önemli işlemlerdir. [Consterton ve ark., 1987]. Biyofilm oluşumu birçok endüstride problemlere yol açar. Özellikle atık su arıtma sistemleri ve gıda endüstrilerini yakından ilgilendirir.

Salmonella enteritidis, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Aeromonas hydrophilla*, *Yersinia enterocolitica* gibi patojenlerle kontamine olan gıdaların sadece gıda işletmeleri açısından değil, halk sağlığı bakımından da büyük sorun olduğu bilinmektedir. Bu alanda yapılan çalışmalarda, bulaşma için çapraz kontaminasyonun, personel ve tesis hijyeninin önemini ikinci plana iten, üretim alanında yüzeylere yapışan bakterilerin varlığı ortaya konmuştur [Denes ve ark., 1999; Denes ve ark., 2002]. Gıda işletim sistemlerinde ise biyofilm oluşumu gıdaların ve ekipmanın kontamine olmasına neden olur [Mattila-Sandholm ve Wirtanen, 1992; Genigeorgis, 1995]. Gıda teknolojisinde biyofilm oluşumu insan sağlığı açısından oldukça önemli olup, gıdayla temas halinde bulunan yüzeylerde bakteriyel yapışma gıdalarda bozulma ve bozulmaya bağlı olarak hijyen problemlerine ve ekonomik kayıplara yol açmaktadır [Dunsmore ve ark., 1981]. Elverişli şartlar altında bakteri hücreleri yüzeylere tutunup üreme gösterebilir. Bu tür mikroorganizmalar ortamdan tamamen uzaklaştırılmadıkları sürece gıdaların güvenliğini ve kalitesini etkileyerek biyofilmler oluştururlar. Gıda endüstrisinde temizlik ve sanitasyon prosedürlerinin limiti ekipmanların yüzeyinde biyofilm oluşumuna neden olan mikroorganizmaların akümülayonudur, ancak biyofilm oluşturan mikroorganizmaların akümülayonun direnci işletim sonrası kontaminasyona ve ürünlerin raf ömürlerinin kısalması gibi

sorunlara yol açmaktadır [Holah ve Kearney, 1992]. Gıda kökenli patojenler ve bozulmaya neden olan mikroorganizmalar tipik olarak gıda işletim çevrelerinde bulunan paslanmaz çelik alüminyum, cam, teflon ve naylon materyaller üzerinde biyofilm olarak birirmektedir. Naylon teflon yüzeyler pürüzsüz bir yüzeye sahipken paslanmaz çelik yüzey bakterileri tuzağına düşürmek için elverişli olan çatlak ve yarıklardan dolayı pürüzlü bir yapıya sahiptir.

Süt, et ve birçok besin maddesinin üretimi sırasında, üretilen besinin proteinleri (kazein, jelatin), üretimde kullanılan teçhizat (reaktör, kazan, tepsi v.b.) üzerinde hazırlayıcı bir film oluşturarak mikroorganizma yapışmasını kolaylaştırır. Böylece mikroorganizmalar paslanmaz çelik, cam, alüminyum, teflon, naylon gibi gıda teknolojisinde kullanılan birçok malzeme üzerinde film oluşturarak insan sağlığını tehdit edebilir [Zottola ve Sasahara, 1994]. Yine benzer şekilde süt ve süt ürünleri endüstrisinde uygun olmayan temizlik ve sanitasyon ekipmanları ve hava kökenli mikroflora genellikle süt ve süt ürünlerinin kontaminasyonunun ana kaynağı olarak dikkate alınmaktadır [Poulsen, 1999].

Süt ve gıda endüstrisinde biyolojik kirlenme yüzey ısı akımının engellenmesi, yüzeydeki akıcı sürtünme direncindeki artma ve enerji ve ürün kaybına sebep veren aşındırma oranındaki artma gibi ciddi problemlere neden olur. Mesela sıcaklık değişimi durumunda biyofilmler hem sıvı akımına hem de sıcaklık transferindeki direncin artmasına neden olur [Dunsmore ve ark., 1981]. Buna ek olarak biyofilmler, bozulmaya neden olan patojen mikroflorayı içeren, kümes hayvanı etleri ya da diğer et yüzeyleri gibi gıda yüzeylerinde oluşan çapraz kontaminasyon ve işletim sonrası kontaminasyonda problem arz eden oluşumlardır.

Çiğ sütün pastörizasyonu sırasında sütte bulunan *Bacillus cereus* sporları pastörizatörde film yapısı içerisinde canlı kalarak çimlenir ve gelişir. Bunun sonucunda takip eden ürünlerde kontaminasyona sebep olur. Bu süt endüstrisinde sıkla karşılaşılan bir tehlikedir. Tutunmuş basiller biyofilm yapısında çoğunlukla

vejetatif hücreler olarak bulunurlar. Temizleme ve dezenfeksiyon tutunmuş bu sporları yok etmeyebilmektedir [Books ve Flint, 2008].

Tüketicinin kullanımına hazır paketlenmiş pastörüze sütlerde gram negatif psikrotropik bakteriler tespit edilmektedir. Bu durum sütün paketlenme anında dolum makinelerinin içlerinin ve çevrelerinin musluk suyu ile durulanmasından kaynaklanmaktadır.

Oluşmuş biyofilmi tamamen ortadan kaldırmak oldukça zordur. O nedenle biyofilm oluşumunun önlenmesi gerekmektedir. Bu yüzden biyofilm oluşumunu önlemenin en iyi yolu, biyofilm gelişimini kontrol etmektir. HACCP uygulamaları biyofilm riskini azaltmak için kullanılabilecek en verimli ve rasyonel yöntemlerden biridir. HACCP sisteminin en önemli amacı, sorunun oluşmadan önlenmesidir ki bu da biyofilm oluşumunu kontrol altına almak için kullanılan ilk prensiptir. Bu amaca hizmet etmek için HACCP programının uygulanması 7 temel prensip içermektedir. Bu prensipler sırasıyla; tehlike analizi, kritik kontrol noktalarının belirlenmesi, kabul sınırları ve kısıtlarının oluşturulması, izlemenin yürütülmesi, düzeltici işlemlerin uygulanması, doğrulama, kayıt tutma şeklinde sıralanabilir.

Biyofilmlerde bakteri hücrelerinin EPS oluşturarak meydana getirdikleri matriks yapı bozulduğunda antimikrobiyel maddelere karşı dirençleri azalmakta veya kaybolabilmektedir. Bu nedenle; gıda işletmelerinde uygun aralıklarla işletmeye uygun ve etkili bir temizlik işlemi uygulanarak mikroorganizmaların tutnabileceği organik maddeler uzaklaştırılmalı ve bu işlemi etkili bir dezenfeksiyon uygulaması izlemelidir [Evans, 2000].

3.MATERYAL VE METOT

Araştırmamızda 15.06.2009 – 15.08.2010 tarihleri arasında Ankara'daki çeşitli marketlerden temin edilen dana kıyma (56 adet), tavuk but (56 adet), beyaz peynir (56 adet), süt fabrikasından temin edilen çiğ süt (56 adet) ve çeşitli semtlerdeki pastanelerden temin edilen dondurma (56 adet) örneklerinden izole edilen stafilokok suşları materyal olarak kullanılmıştır. Gıda örneklerinden izole edilen Stafilokokların kongo kırmızılı agarda ve mikroplak yöntemi ile biyofilm oluşumları incelenmiştir. Ayrıca Stafilokok suşlarının Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile çeşitli antibiyotiklere olan dirençlilikleri araştırılmıştır.(çizelge 3.1.)

Çalışmamızda referans suş olarak *S.aureus* ATCC 29213 nolu suş kullanılmıştır.

3.1. Örnek Alma ve Örneklerin Analize Hazırlanması

Çiğ süt örnekleri Türk Standartları Enstitüsü'nde (TSE 11566) belirlenen esaslara göre hazırlanmıştır. Örnekler 200ml'lik steril şişelerle alınıp en kısa sürede laboratuvara getirilerek analize başlanmıştır. Çiğ süt örneklerinin 25 ml'si 225 ml'lik steril Tamponlanmış Peptonlu Su (TPW) kullanılarak sırasıyla 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} lük dilusyonlar hazırlanmıştır.

Peynir örnekleri Türk Standartları Enstitüsü'nde (TSE 11566) belirtildiği gibi hazırlanmıştır. Peynir örneklerinin 25 gr'ı steril koşullarda tartılarak 225 ml tamponlanmış peptonlu su ile 400 devirlik steril laboratuvar blenderi yardımıyla 10 dakika boyunca homojenize edilmiş ve 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} lük dilusyonlar hazırlanmıştır.

Dondurma örnekleri aseptik koşullarda steril 250 ml'lik kavanozlarda toplanmıştır ve soğutulmuş taşıma kabında laboratuvara getirilerek -18°C 'de saklanmıştır. Örnekler mikrobiyolojik analizden 10 dakika önce buzdolabı sıcaklığına getirilerek, Tamponlanmış Peptonlu Su ile 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} lük dilusyonlar hazırlanmıştır.

Araştırmamızda çiğ et örnekleri (dana kıyma, tavuk but) Türk Standartları Enstitüsü'nde (TSE 11566) belirlenen esaslara göre hazırlanmıştır. 25 gr et örneği steril koşullarda tartılarak 225 ml Tamponlanmış Peptonlu Su ile 400 devirlik steril laboratuvar blenderi yardımıyla 10 dakika boyunca homojenize edilerek 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} lük dilusyonlar hazırlanmıştır.

3.1.1. Örneklerin Analiz Edilmesinde Kullanılan Besiyerleri

Tamponlanmış Peptonlu Su

Pepton :10 g

Sodyum klorür : 5 g

Disodyum hidrojen fosfat : 9 g

Potasyum dihidrojen fosfat: 1,5 g

Distile su : 1000 ml

pH:7,2 $\pm$ 0,2 ayarlanıp, 121 °C 'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.2. Stafilocokların İzole Edilmesi

Çiğ süt, peynir, dondurma, kıyma ve tavuk but örneklerinin 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} lük dilusyonlarından steril pipetlerle 0,1 ml alınarak içerisinde Egg Yolk Tellurite emülsiyon ilave edilmiş Baird Parker Agar (Oxoid CM 275) besiyerine, Mannitol salt agar (MERCK) besiyerine ve kanlı agara inoküle edilerek 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda her plaktan benzer morfoloji gösteren tipik Stafilocok kolonileri (Baird Parker Agarda siyah, konveks, etrafında berrak zon oluşturan, Mannitol salt agarda beyaz, sarı ve pembe renkte üreyen koloniler) alınarak Brain Heart Infusion Broth (BHI Broth) (Oxoid CM 225) besiyerine aktarılmıştır. Stoklama amacı ile de Brain Heart Infusion (BHI) agar

(Oxoid CM 375) besiyerine pasajları yapılarak, 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir.

3.2.1. Stafilokokların İzolasyonunda Kullanılan Besiyerleri

Baird parker agar (Oxoid CM 275)

Trypton	: 10 g
Lab-Lemco powder	: 5 g
Yeast extract	: 1 g
Sodyum piruvat	: 10 g
Glisin	: 12 g
Lityum klorid	: 5 g
Agar	: 20 g

63 gr tartılarak 1000 ml distile su ile karıştırılıp, pH: $6,8 \pm 0,2$ ayarlanıp, 121 °C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. 50 °C’ye soğutulduktan sonra içerisine Egg Yolk Tellurite emülsiyonundan 50 ml eklenerek karıştırılıp petri plaklarına dökülmüştür.

Egg yolk tellurite (Oxoid SR 34)

Potasyum telürit	: 1 ml
Egg yolk	: 5 ml
Distile su	: 100 ml

Kanlı Agar (Blood Agar Base) (BBL)

Bileşimi :

Kalp Kası	2 g
Pancreatic digest of casein	13 g
Maya extract	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g

Hazırlanışı :

pH $\pm$ 7,3'e ayarlandıktan sonra toz halindeki Blood-Agar Base (BBL) besiyerinden 40 g tartılıp 1000 ml distile su içinde çözülmüştür. 121 °C'de 15 dakika steril edilmiştir. Otoklavdan çıkan besiyeri 45 – 5 °C'ye kadar soğutulduktan sonra % 5 oranında kan ilave edilerek karıştırılıp kullanılmıştır.

Mannitol salt Agar (MERCK)

Pepton	:10 g
Meat extract	: 1 g
Sodyum klorür	:75 g
D (-) mannitol	:10 g
Agar-agar	:12 g

Hazırlanışı:

Stafilokoklar için seçici bir besiyeri olarak kullanılmıştır.108 gram besiyeri 1 litre distile suyla karıştırılıp 121°C'de 15 dakika steril edilip kullanılmıştır.

Brain Heart Infusion Broth (Oxoid CM 225)

Calf Brain infusion solids : 12,5 g

Beef heart infusion solids : 5 g

Proteaz pepton : 10 g

Sodyum klorür : 5 g

Disodyum fosfat : 2,5 g

Distile su : 1000 ml

pH:7,4 $\pm$ 0,2'ye ayarlandıktan sonra besiyerleri 1'er ml tüplere dağıtılmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Brain Heart Infusion Agar (Oxoid CM 375)

Calf Brain infusion solids : 12,5 g

Beef heart infusion solids : 5 g

Proteaz pepton : 10 g

Dekstroz : 2 g

Sodyum klorür : 5 g

Disodyum fosfat : 2,5 g

Agar No. 1 : 10 g

Distile su : 1000 ml

pH:7,4 $\pm$ 0,2'ye ayarlandıktan sonra besiyerleri 1'er ml tüplere dağıtılmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.3. Stafilokok İzolatlarının Tanımlanması

Baird Parker Agar ve Mannitol Salt Agar besiyerinde üreyen stafilokokların tanımlanmasında Bergey's of Manuel Systematic Bacteriology'de belirtilen çeşitli biyokimyasal testlerden faydalanılmıştır. İzolatların tanımlanmasında klasik mikrobiyolojik testlerin dışında Api-Staph (Biomerieux) kiti kullanılmıştır. Stafilokok şüpheli kolonilere gram boyama, koagülaz, katalaz, oksidaz, oksidasyon fermentasyon (O/F glukoz-O/F mannitol) testleri uygulanmıştır. Gr(+) üzüm salkımı şeklinde kok, katalaz (+), oksidaz (-), oksidasyon fermentasyon (O/F glukoz,O/F mannitol) (+) olan koloniler Stafilokok olarak adlandırılmıştır. Stafilokok olarak adlandırılan bu kolonilere koagülaz testi uygulanarak koagülaz (+) ve koagülaz (-) Stafilokoklar ayırt edilmiştir. Koagülaz test sonucu (+) ve VP (+) olan koloniler *S. aureus* olarak tanımlanmıştır. Koagülaz (-) Stafilokok türlerinin adlandırılmasında Dichotomous Şeması kullanılmıştır. Bu şemada belirtilen karbonhidrat fermentasyon testleri ksiloz, sukroz, trehaloz, maltoz, fruktoz, laktoz, mannoz, ayrıca fosfataz, nitrat redüksiyonu, novobiosin hassasiyet, üreaz test sonuçlarına göre koagülaz (-) Stafilokokların tür tayinleri yapılmıştır.

3.3.1. Stafilokok suşlarının tanımlanmasında kullanılan testler ve besiyerleri

Gram boyama

Klasik gram boyama yöntemindeki kristal viyole, iyot, alkol ve fuksin hazırlanarak kullanılmıştır. Sonucunda Gram (+) üzüm salkımı görünümünde koklar seçilerek alınmıştır ve Stafilokok olarak değerlendirilmiştir.

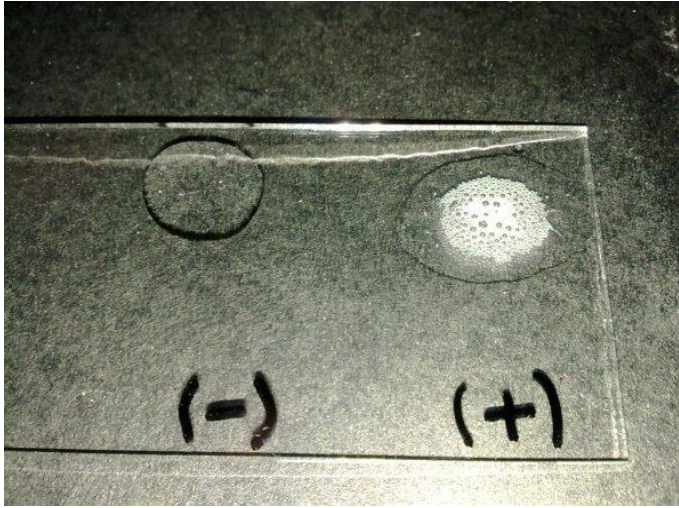
Plazma koagülaz testi

Stafilokok olarak ön tanımlaması yapılan koklara tüpte plazma koagülaz testi uygulanmıştır. Tüpte koagülaz testinde 1/5 oranında steril serum fizyolojik ile karıştırılan defibrine insan plazması kullanılmıştır. Test yapılırken 1.5ml

sulandırılmış plazmaya 2-3 bakteri kolonisi ilave edilen tüpler 37°C’de 2-4-16 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süreler sonunda plazmanın koagüle olup olmadığına dikkat edilmiştir. Plazmayı koagüle ederek pıhtılaştıranlar koagülaz (+) Stafilokok olarak tanımlanmıştır.

Katalaz testi

Şüpheli koloniler temiz bir lam üzerine %3’lük H₂O₂ ilave edilerek süspanse edilmiştir. Gaz çıkışı pozitif olarak değerlendirilen koloniler Stafilokok olarak tanımlanmıştır.



Şekil 3.1. Katalaz testi pozitif ve negatif sonuçları

Oksidaz testi

N,N,dimetil p-fenilendiamin dihidrokloridin(%1’lik) çözelti hazırlanarak Whatman No.1 kurutma kağıdına emdirilir. Bu kurutma kağıdının üzerine, Stafilokok kolonileri öze ile alınarak reaksiyona sokulur. 5-10 saniye içinde pembe renk oluşturan koloniler oksidaz (-), mavi renk oluşturan koloniler oksidaz (+) olarak değerlendirilir. Çalışmamızda Stafilokok tanımlanmasında oksidaz (-) koloniler değerlendirilmeye alınmıştır.

Oksidasyon-fermentasyon testi (O/F)

Hazırlanan besiyerleri tüplere 9 ml olarak dağıtılır ve steril edilir. Üzerine % 45 μ m çapındaki membran filtreden geçirilip steril edilen % 10'luk glikozdan 1 ml ilave edilir. Daha sonra her kültürden öze dolusu bakteri alınarak 2 farklı tüpe inoküle edilir. Tüplerden birisinin ağzı steril parafinle kapatılarak 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılır. Örneğin inoküle edildiği 2 tüpte sarı renk oluşturanlar pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir.

Oksidasyon-Fermentasyon besiyeri

Tripton	:2 g
Sodyum klorür	:5 g
Dipotasyum fosfat	:0,3 g
Bromtimol mavisi	:0,08 g
Agar	:2 g
Distile su	:1000 ml

Voges-Proskauer (VP) testi

VP sıvı besiyerine Stafilokok suşları aşılantmış ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda besiyerine 0,6 ml alfa-naftol + etil alkol karışımı olan VP indükatörü ve 0,2 ml %40 KOH ilave edilmiştir. Test sonucunda pembe renk oluşumu (+), sarı renk oluşumu ise (-) olarak değerlendirilmiştir.

Voges-Proskauer (VP) besiyeri (Oxoid CM 43)

Pepton	: 5 g
--------	-------

Glukoz	:5 g
Fosfat buffer	:5 g
Distile su	:1000 ml

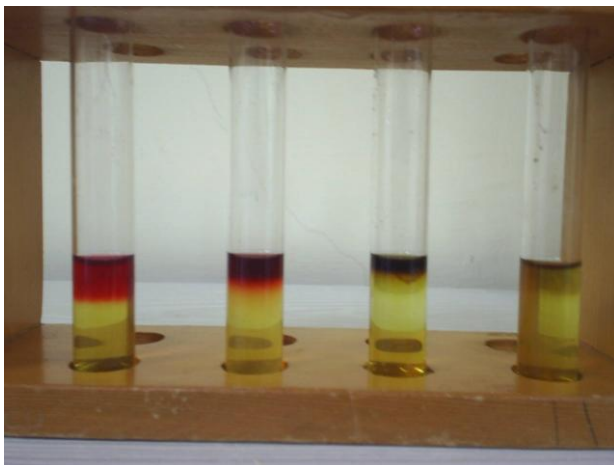
pH:7,5 $\pm$ 0,2 'ye ayarlanıp, 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

VP indikatörü

Alfa-naftol	:5 g
Etil alkol	:100 ml

% 40 KOH

Potasyum hidroksit	:40 g
Distile su	:100 ml



Şekil 3.2. VP testi pozitif ve negatif sonuçları

Nitrat redüksiyon testi

Koagülaz (-) Stafilokok suşları besiyerine inoküle edilip 37 °C’de 3-7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Test sonucunu değerlendirmek amacıyla tüpteki besiyerlerinin üzerine 1 ml solüsyon A ve 1 ml solüsyon B ilave edilmiştir. Tüpteki kırmızı renk oluşum pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir.

Nitrat redüksiyon besiyeri

Pepton	:10 g
Sodyum klorür	:5 g
Potasyum nitrat	: 2 g
Agar	:3 g
Distile su	:1000 ml

pH:7,7 ‘ye ayarlanıp tüplere 5 ml dağıtılarak 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Solüsyon A

Sülfanilik asit	:0,8 g
Asetik asit(5N)	:100 cc

Solüsyon B

Alfa-naftol	:0,5 g
Asetik asit (5N)	:100 cc

5N Asetik Asit'in hazırlanışı

Asetik asit	: 60 ml
Distile su	:140 ml

Üreaz aktivitesi testi

Koagülaz (-) Stafilokok suşları üreaz besiyerine inoküle edilerek 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda pembe renk pozitif, sarı renk negatif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir.

Üre Agar Base (Oxoid CM 53)

Pepton	:1 g
Glukoz	:1 g
Sodyum klorür	:5 g
Disodyum fosfat	:1,2 g
Potasyum dihidrojen fosfat	: 0,8 g
Fenol kırmızısı	:0,012 g
Agar	: 15 g

Besiyerinden 2,4 g alınıp 95ml distile su ilave edilmiştir.

pH:6,8± 0,2 ayarlanıp, 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Daha sonra 5 ml steril üre ilave edilerek tüplere dağıtılmıştır.



Şekil 3.3 Üreaz testi pozitif ve negatif test sonuçları

Novobiosin hassasiyet testi

Staphylococcus saprophyticus'un adlandırılmasında 5µg'lık novobiosin (Oxoid) antibiyotik diski kullanılmıştır. Bu amaçla koagülaz (-) Stafilocok'lar Muller Hinton besiyerine ekilerek üzerine 5 µg 'lık novobiosin diski steril pens ile yerleştirilmiş ve 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda zon çapı 16 mm'den küçük olan izolatlar *Staphylococcus saprophyticus* olarak tanımlanmıştır.

Fosfataz testi

100 ml Blood Agar base (Oxoid CM 271) steril edilerek 50°C'ye kadar soğutulmuş ve 1 ml%1'lik fenol ftaleyn fosfat ilave edilmiştir. Bu besiyeri plaklara dağıtıldıktan sonra ekim yapılmış ve 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir.İnkübasyondan sonra plaklara amonyak buharı püskürtülmüştür. Parlak pembe koloniler (+) reaksiyon olarak değerlendirilmiştir.

Blood Agar Base (Oxoid CM 271)

Bileşimi :

Kalp Kasi

:2 g

Pancreatic digest of casein	:13 g
Maya extract	: 5 g
NaCl	: 5 g
Agar	: 15 g

Hazırlanışı :

pH $\pm$ 7,3'e ayarlandıktan sonra toz halindeki Blood-Agar Base (Oxoid CM 271) besiyerinden 40 g tartılıp 1000 ml distile su içinde çözülmüştür. 121 °C'de 15 dakika steril edilmiştir. Otoklavdan çıkan besiyeri 45 – 5 °C'ye kadar soğutulduktan sonra % 5 oranında kan ilave edilerek karıştırılıp kullanılmıştır.

Karbonhidrat fermentasyon besiyeri (Purple broth base)

Proteaz pepton No:3	: 10 g
Beef extract (Lab-lemco powder)	: 1 g
Sodyum klorür	: 5 g
Brom cresol Purple	: 0,02 g
Distile su	:1000 ml

pH 6,8 $\pm$ 0,2'ye ayarlanıp tüplere 9 ml pipetlenerek, 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

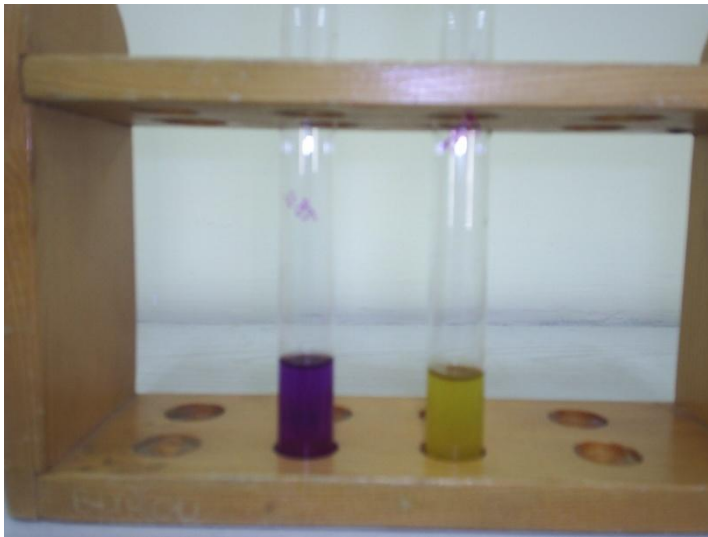
Karbonhidrat solüsyonu

Bu çalışmada Stafilokok'ların adlandırılmasında kullanılan karbonhidrat solüsyonları; ksiloz, sukroz, trehaloz, mannitol, fruktoz, maltoz ve mannozdur.

Karbonhidrat	:1 g
--------------	------

Distile su :10 ml

Hazırlanan solüsyonlar 0,2-0,45 μm 'lik membran filtre ile steril edilmiştir. Bu solüsyonlardan steril pipet ile 1 ml alınıp önceden hazırlanmış 9 ml'lik temel besiyerine (Purple Broth Base) ilave edilmiştir. Hazırlanan bu besiyerine koagülaz (-) Stafilokok kültürlerinden bir öze dolusu alınarak inoküle edilmiştir. 37°C'de 1-7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Karbonhidrat kullanarak asit üreten koagülaz (-) Stafilokok türleri besiyerinin rengini sarıya dönüştürmüştür. Negatif reaksiyonda renk değişimi olmamıştır.



Şekil 3.4. Karbonhidrat testi pozitif ve negatif test sonuçları

3.4. Stafilokok suşlarının Kirby Bauer Disk Difüzyon Yöntemiyle Antibiyotik

Duyarlılıklarının Test Edilmesi

Stafilokok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları Standart disk difüzyon metodu ile (CLSI 2009) ve *S. aureus* ATCC 29213 kontrol suşu kullanılarak çalışılmıştır. Tanımlanan suşların ampisilin, eritromisin, gentamisin, kloromfenikol, metisilin,

amikasin, vankomisin, tetrasiklin, oksasilin ve klindamisin duyarlılıkları belirlenmiştir.

Stafilokok suşlarının antibiyotik duyarlılıklarını belirlemede Kirby Bauer Disk Difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Antibiyotiklere duyarlılıkları belirlenicek bakteri kültüründen 1 koloni alınarak Mueller Hinton Agar besiyerine tek koloni ekilmiştir. Plaklar 37°C’de 24 saat inkübe edilmiş, inkübasyon sonucunda steril tuzlu su da 0,5 McFarland bulanıklığı ayarlanmıştır. Steril svaplar yardımıyla bulanıklığı ayarlanan kültürden Mueller Hinton Agar besiyerinin tüm yüzeyine ekim yapılmıştır. Standart antibiyotik diskler pens yardımı ile yerleştirilerek besiyeri ile teması sağlanmıştır. Petri plakları 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu zon çapları ölçülmüş ve çizelgede verilen değerlerle karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan antibiyotik çeşitleri

Antibiyotik Adı	Miktarı	Grubu
Amikasin(AN)	30µ	Aminoglikosidaz
Ampisilin(AM)	10µ	Aminopenisilinaz(βlaktamaz)
Eritromisin(E)	15µ	Makrolidaz
Gentamisin(GM)	10µ	Aminoglikosidaz
Klindamisin(CC)	2µ	Lincosamidaz
Kloromfenikol(C)	30µ	Kloromfenikol
Metisilin(MET)	10µ	Penisilin
Tetrasiklin(TE)	30µ	Tetrasiklin
Vankomisin(VA)	30µ	Glikopeptidaz

3.4.1. Antibiyotik Duyarlılık Testinde Kullanılan Besiyerleri

Mueller Hinton Agar (LabM 39)

Meat infusion	: 6 g
Casein hydrolysate	:17,5 g
Starch	:1,5 g
Agar	:10 g

35g tartılarak 1000 ml distile suyla karıştırılıp pH7,4 $\pm$ 0,2 ayarlanıp 121 °C'de 15 dakika otoklavlanmıştır.

Mc Farland bulanıklık tüpü

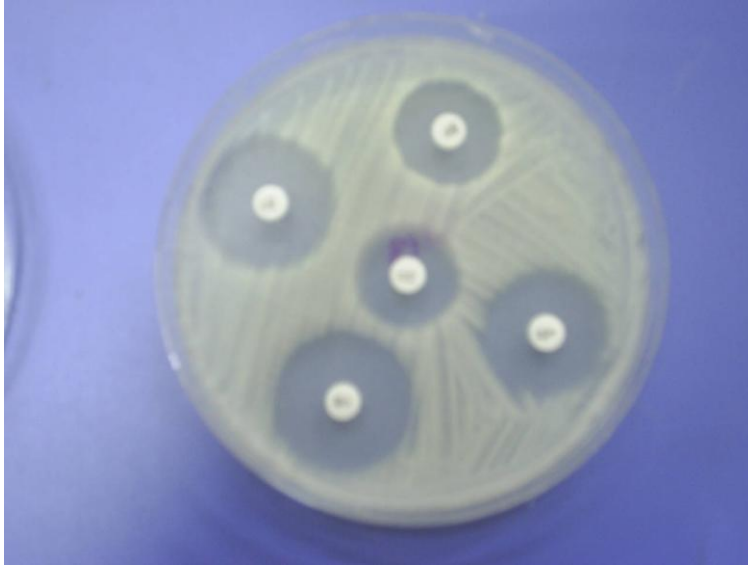
0,5 Mc Farland standardına uygun bulanıklık tüpü hazırlamak için :

0,048 M BaCl ₂ (%1,173gr BaCl ₂ H ₂ O)	0,5 ml
+ <u>0,18M H₂SO₄/H₂O (%1 v/v)</u>	<u>99,5 ml</u>

0,5 Mc Farland = 10⁸ cfu/ml

Baryum klorür ve sülfirik asit kullanılarak hazırlanan bu solüsyon deney tüplerine

5'er ml ilave edilerek oda sıcaklığında, karanlıkta saklanmıştır.



Şekil 3.5. Antibiyotik direnç testinin yapılışı

3.5. Stafilocok suşlarının Biyofilm Üretimini Saptanması

Stafilocok suşlarının biyofilm üretimlerinin belirlenmesinde iki yöntem kullanılmıştır. Suşlarının kantitatif olarak biyofilm üretimleri Christensen ve ark. (1985) tarafından tanımlanan mikrotitreplak yöntem ile, suşların fenotipik olarak biyofilm üretimlerinin belirlenmesi, kongo kırmızılı agar metodu (CRA) ile sağlanmıştır.

3.5.1. Mikrotitre plak yöntemiyle biyofilm oluşumunun belirlenmesi

Kantitatif olarak biyofilm oluşumlarının belirlenmesinde, stafilocok suşları stok kültürden alınarak aktiveleştirilmek üzere TSB'ye aktarıldıktan sonra 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda %2 oranında glukoz içeren TSB ile 1/100 seyreltildikten sonra steril düz tabanlı mikropalak'ın her bir kuyucuğuna 200µl konularak 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Negatif kontrol sadece sıvı besiyeri ile doldurulmuştur [Christensen ve ark., 1985].

Biyofilm oluşumundaki fenotipik ifadenin in vitro koşullarda değişmeye olduķa mősait olmasından dolayı hataları minimize etmek ve bilgilerin güvenilirliğinin sağlamak için her bir suş en az 3 defa tekrarlanıp, buna ek olarak her bir test de iki kez yapılmıştır.

İnkübasyon sonucu mikropalakın her bir gözündeki sıvı atık konteynırına boşaltılıp her bir kuyucuk üç kez 200µl 'lık steril tamponlanmış fosfat tuzu (PBS) ile nazikçe yıkanmıştır. Yıkama işlemi için mikropipet kullanılmıştır. Yıkama sonrasında mikropalaklar kurutulmak amacıyla ters çevrilmiştir [Christensen ve ark., 1985] .

Kurutma işleminden sonra her bir kuyucuğa %2'lik kristal viyole solüsyonundan 200µl dağıtılarak 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuyucuklar tekrar steril tamponlanmış fosfat tuzu (PBS) ile nazikçe üç kez yıkanmıştır. Yıkama sonrasında mikropalaklar kurutulmak amacıyla ters çevrilmiştir [Christensen ve ark., 1985].

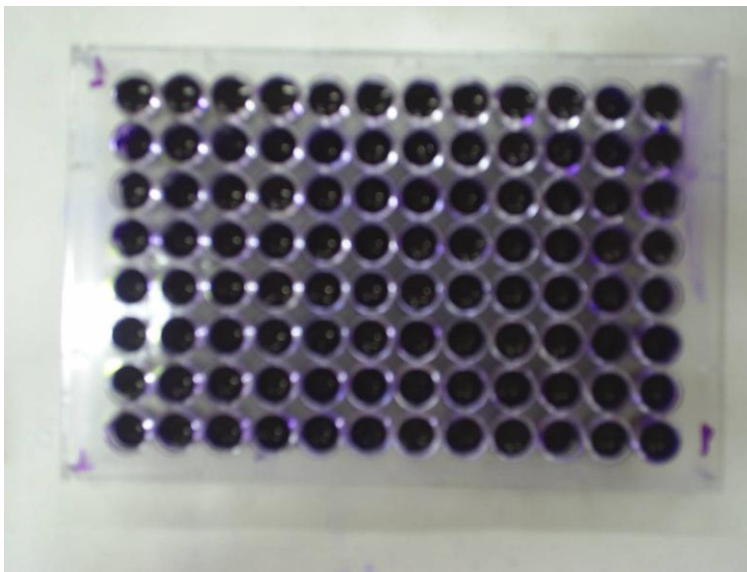
Mikropalaklar oda sıcaklığında kurutulduktan sonra hücrelere bağlanan boya geri çözdürölmek üzere her kuyucuğa 200µl etanol asetik asit (95:5) ilave edilmiştir. Mikropalakların hava ile temasını önlemek için kapakları kapatılıp oda sıcaklığında en az 10 dakika çalkalamaksızın bekletilmiştir. Etanol asetik asit hem tavan hem de duvara yapışan bakterilerin indirekt ölçölmesinde olanak sağlamıştır [Christensen ve ark., 1985].

Kristal viyole ile boyanan kuyucuklardaki boya etanol asetik asit ile çözdüröldükten sonra her bir kuyucuktaki Optik yoğunluk (OD) 570 nm'de ELISA okuyucuda ölçölümüştür [Christensen ve ark., 1985].

İzolaların mikrotitre plak yöntemiyle belirlenen adherens kapasiteleri negatif, zayıf (+), orta (++), kuvvetli (+++) olarak kategorize edilmiştir. Bu sınıflandırmada $OD \leq OD_c$; negatif, $OD_c \leq OD \leq 2 \times OD_c$; zayıf, $2 \times OD_c \leq OD \leq 4 \times OD_c$; orta, $4 \times OD_c \leq OD$; kuvvetli adherens olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3.6. Stafilokok izolatlarını mikrotitre plak içerisinde 37 °C’de 24 saatlik inkübasyonu



Şekil 3.7. Kristal viyole ile yapılan boyama

3.5.2. Kongo Kırmızılı Agar Yöntemiyle Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi

Stafilokok olarak adlandırılan suşlar Kongo Kırmızılı Agara tek koloni ekimi yapılarak 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra parlak siyah koloniler biyofilm (+) olarak değerlendirilmiştir.

Kongo Kırmızılı Agar

Sükroz	:50 g
BHI broth	:37 g
Kongo kırmızısı	:0,8 g
Agar	:10 g
Distile su	:1000 ml

121°C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilir ve plaklara dağıtılır.



Şekil 3.8. Kongo kırmızılı agarda biyofilm oluşumu

4. BULGULAR

4.1. Gıdalardan İzole Edilen Stafilocokların Dağılımı

Araştırmamızda 15.06.2009 – 15.08. 2010 tarihleri arasında Ankara'daki çeşitli marketlerden temin edilen dana kıyma (56 adet), tavuk but (56 adet), beyaz peynir (56 adet), süt fabrikasından temin edilen çiğ süt (56 adet) ve çeşitli semtlerdeki pastanelerden temin edilen dondurma (56 adet) örneği materyal olarak kullanılmıştır. Çalışılan gıda örneklerinde çizelge 1.1 'de gösterilen Bergey's Manuel of Systematic Bacteriology'de belirtilen testlerin sonucunda 209 Stafilocok suşu izole edilmiştir.(Çizelge 4.1) Referans suş olarak *S.aureus* ATCC 29213 kullanılmıştır.

Baird Parker Agar, Mannitol salt Agar ve Kanlı Agar besiyerlerinden izole edilen Stafilocok türlerinin çeşitli antibiyotiklere (oksasilin(1µ), klindamisin(2µ), tetrasiklin(30µ), vankomisin(30µ), amikasin(30µ), kloromfenikol(30µ), gentamisin (10µ), eritromisin(15µ), ampisilin(10µ)) olan dirençlilikleri ve duyarlılıkları CLSI 2009'da belirtilen antibiyotik inhibisyon zon çap ölçümlerine göre değerlendirilmiştir.

İzole edilen Stafilocok türlerinin biyofilm oluşumları, mikrotitre plak yöntemi ve Kongo kırmızılı agar ile araştırılmıştır.

Çizelge 4.1. Stafilocokların izole edildikleri örneklere göre dağılımları

Gıda örnekleri	Örnek sayısı	İzole edilen Stafilocok		Örnekten izole edilme yüzdesi (%)
		(n)	(%)	
Dana kıyma	56	56	26,8	100
Tavuk but	56	44	21,1	78,5
Çiğ süt	56	44	21,1	78,5
Dondurma	56	36	17,2	64,3
Peynir	56	29	13,8	51,8
Toplam	280	209	100	74,6

Araştırmamızda materyal olarak kullanılan 280 gıda örneğinden 209 (%74,6) Stafilocok türü izole edilmiştir. 209 izolatin 56'sı (%26,8) dana kıyma, 44'ü (%21,1) tavuk but, 44'ü (%21,1) çiğ süt, 36'sı (%17,2) dondurma ve 29'u (%13,8) peynir örneklerinde tespit edilmiştir. (Çizelge 4.1.)

Çizelge 4.2. Gıda örneklerinden izole edilen Koagülaz Pozitif Stafilokok (KPS) ve Koagülaz Negatif Stafilokok (KNS) sayıları ve yüzde dağılımları

Gıda örnekleri	İzole Edilen Stafilokok sayısı (n)	KPS		KNS	
		Sayı (n)	Yüzde (%)	Sayı (n)	Yüzde (%)
Dana Kıyma	56	6	10,7	50	89,3
Tavuk But	44	3	6,8	41	93,2
Çiğ süt	44	21	47,7	23	52,3
Dondurma	36	-	-	36	100
Peynir	29	4	13,8	25	86,2
Toplam	209	34	16,3	175	83,7

Araştırmamızda 209 stafilokok suşunun 34'ü (%16,3) koagülaz pozitif stafilokok (KPS) ve 175'i (%83,7) koagülaz negatif stafilokok (KNS) olarak tespit edilmiştir. Çiğ süt örneklerinden izole edilen stafilokokların %47,4'si , peynir örneklerinden izole edilen stafilokokların %13,8'i ,dana kıyma örneklerinden izole edilen stafilokokların %10,7'si ve tavuk but örneklerinden izole edilen stafilokokların %6,8'i koagülaz pozitif olarak bulunmuştur. Dondurma örneklerinden izole edilen stafilokoklarda koagülaz pozitif stafilokok türlerine rastlanılmamıştır. (Çizelge 4.2.)

Çizelge 4.3. Gıda örneklerinden izole edilen Koagülaz Pozitif Stafilokok (KPS) türlerinin izole edildiği örneklerle göre dağılımları

Gıda örnekleri Tür	Dana kıyma		Tavuk but		Çiğ süt		Dondurma		Peynir		Toplam	
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
<i>S.aureus</i>	6	35,3	-	-	9	53	-	-	2	11,7	17	50
<i>S. hyicus</i>	-	-	-	-	4	100	-	-	-	-	4	11,8
<i>S.intermedius</i>	-	-	3	23,1	8	61,5	-	-	2	15,4	13	38,2
Toplam	6	17,6	3	8,8	21	61,7	-	-	4	11,7	34	100

n: izolat sayısı

34 koagülaz pozitif stafilokok (KPS) suşunun 17'si (%50) *S.aureus*, 13'ü (%38,2) *S.intermedius* ve 4 'ü (%11,8) *S.hyicus* olarak tanımlanmıştır. (Çizelge 4.3.)

Çizelge 4.4. Gıda örneklerinden izole edilen Koagülaz Negatif Stafilokok (KNS) türlerinin izole edildikleri örneklerle göre dağılımı

Gıda Türü Tür	Dana kıyma		Tavuk but		Çiğ süt		Dondurma		Peynir		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>S.cohnii</i>	2	3,5	10	22,7	4	9,1	20	55,5	10	34,5	46	26,3
<i>S.hominis</i>	7	12,5	6	13,6	11	25	6	16,7	4	13,8	34	19,4
<i>S.xylosus</i>	36	64,2	-	-	-	-	-	-	-	-	36	20,6
<i>S.simülans</i>	-	-	13	29,5	4	9,1	1	2,8	2	6,9	20	11,4
<i>S.epidermidis</i>	2	3,5	-	-	2	4,5	3	8,3	-	-	7	4
<i>S.capitis</i>	3	5,4	9	20,5	-	-	1	2,8	-	-	13	7,4
<i>S.auricularis</i>	-	-	2	4,5	1	2,3	-	-	3	10,4	6	2,8
<i>S.haemolyticus</i>	-	-	1	2,3	1	2,3	2	5,6	5	17,2	9	5,1
<i>S.warneri</i>	-	-	-	-	-	-	2	5,6	1	3,5	3	1,7
<i>S.saprophyticus</i>	-	-	-	-	-	-	1	2,8	-	-	1	0,6
Toplam	50	28,5	41	23,4	23	13,1	36	20,6	25	14,3	175	100

n=izolat sayısı

175 koagülaz negatif stafilokok (KNS) suşunun 46'sı (%26,3) *S.cohnii*, 34'ü (%19,4) *S.hominis*, 36'sı (20,6) *S.xylosus*, 20'sı (%11,4) *S.simülans*, 7'si (%4) *S.epidermidis*, 13'ü (%7,4) *S.capitis*, 6'sı (%2,8) *S.auricularis*, 9'u (%5,1) *S.haemolyticus*, 3'ü (%1,7) *S.warneri*, 1'i (%0,6) *S.saprophyticus* olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 4.5 Dana kıyma örneklerinden izole edilen Stafilocokların tür dağılımları

Stafilokok türü	İzolat sayısı (n)	Yüzdesi (%)
<i>S.xylosus</i>	36	64,3
<i>S.hominis</i>	7	12,5
<i>S.aureus</i>	6	10,7
<i>S.capitis</i>	3	5,3
<i>S.cohnii</i>	2	3,6
<i>S.epidermidis</i>	2	3,6
Toplam	56	100

Araştırmamızda dana kıyma örneklerinden tür seviyesinde tanımlanan 56 Stafilocok suşunun 36'sı (%64,3) *S.xylosus*, 7'si (%12,5) *S.hominis*, 6'sı (10,7) *S.aureus*, 3'ü (%5,3) *S.capitis*, 2'si (%3,6) *S.cohnii* ve 2'si (%3,6) *S.epidermidis* olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.6. Tavuk but örneklerinden izole edilen Stafilocokların tür dağılımları

Stafilokok türü	İzolat sayısı (n)	Yüzdesi (%)
<i>S.simulans</i>	13	29,5
<i>S.cohnii</i>	10	22,7
<i>S.capitis</i>	9	20,5
<i>S.hominis</i>	6	13,6
<i>S.intermedius</i>	3	6,8
<i>S.auricularis</i>	2	4,5
<i>S.haemolyticus</i>	1	2,3
Toplam	44	100

Araştırmamızda tavuk but örneklerinden tür seviyesinde tanımlanan 44 Stafilocok suşunun 13'ü (%29,5) *S.simulans*, 10'u (%22,7) *S.cohnii*, 9'u (%20,5) *S.capitis*, 6'sı (%13,6) *S.hominis*, 3'ü (%6,8) *S.intermedius*, 2'si (%4,5) *S.auricularis* ve 1'i (%2,3) *S.haemolyticus* olarak tanımlanmıştır. (Çizelge 4.6)

Çizelge 4.7 Çiğ süt örneklerinden izole edilen Stafilocokların tür dağılımı

Stafilocok türü	İzolat sayısı (n)	Yüzdesi (%)
<i>S.hominis</i>	11	25
<i>S.aureus</i>	9	20,5
<i>S.intermedius</i>	8	18,2
<i>S.cohnii</i>	4	9,1
<i>S. hyicus</i>	4	9,1
<i>S. simulans</i>	4	9,1
<i>S.epidermidis</i>	2	4,5
<i>S.haemolyticus</i>	1	2,8
<i>S.auricularis</i>	1	2,8
Toplam	44	100

Araştırmamızda çiğ süt örneklerinden tür seviyesinde tanımlanan 44 Stafilocok izolatının 11'i (%25) *S.hominis*, 9'u (%20,5) *S.aureus*, 8'i (%18,2) *S.intermedius*, 4'ü (%9,1) *S.cohnii*, 4'ü (%9,1) *S. hyicus*, 4'ü (%9,1) *S. simulans*, 2'si (%4,5) *S.epidermidis* ve 1'er (%2,8) *S.haemolyticus* ve *S.auricularis* olarak tespit edilmiştir. (Çizelge 4.7)

Çizelge 4.8. Dondurma örneklerinden izole edilen Stafilocokların tür dağılımı

Stafilokok türü	İzolat sayısı (n)	Yüzdesi (%)
<i>S.cohnii</i>	20	55,5
<i>S.hominis</i>	6	16,7
<i>S.epidermidis</i>	3	8,3
<i>S.haemolyticus</i>	2	5,5
<i>S. warnerii</i>	2	5,5
<i>S.capitis</i>	1	2,8
<i>S. saprophyticus</i>	1	2,8
<i>S. simulans</i>	1	2,8
Toplam	36	100

Araştırmamızda dondurma örneklerinden tür seviyesinde tanımlanan 36 Stafilocok izolatının 20'si (%55,5) *S.cohnii*, 6'sı (%16,7) *S.hominis*, 3'ü (%8,3) *S.epidermidis*, 2'si (%5,5) *S.haemolyticus*, 2'si (%5,5) *S. warnerii*, 1'i (%2,8) *S.capitis*, 1'i (%2,8) *S. saprophyticus* ve 1'i (%2,8) *S. simulans* olarak tespit edilmiştir. (Çizelge 4.8)

Çizelge 4.9. Peynir örneklerinden izole edilen Stafilocokların tür dağılımı

Stafilokok türü	İzolat sayısı (n)	Yüzdesi (%)
<i>S.cohnii</i>	10	34,5
<i>S.haemolyticus</i>	5	17,2
<i>S.hominis</i>	4	13,8
<i>S.auricularis</i>	3	10,3
<i>S.aureus</i>	2	6,9
<i>S.intermedius</i>	2	6,9
<i>S. simulans</i>	2	6,9
<i>S. warnerii</i>	1	3,5
Toplam	29	100

Araştırmamızda peynir örneklerinden tür seviyesinde tanımlanan 29 Stafilocok izolatının 10'u (%34,5) *S.cohnii*, 5'i (%17,2) *S.haemolyticus*, 4'ü (%13,8) *S.hominis*, 3'ü (%10,3) *S.auricularis*, 2'si (%6,9) *S.aureus*, 2'si (%6,9) *S.intermedius*, 2'si (%6,9) *S. simulans* ve 1'i (%3,5) *S. warnerii* olarak tespit edilmiştir. (Çizelge 4.9)

Çalışmamızda izole edilen Stafilocok türlerinin biyofilm oluşumları mikrotitre plak ve kongo kırmızılı agar yöntemleri ile araştırılmıştır.

Çizelge 4.10 Stafilocok suşlarının Mikrotitre plak yöntemiyle biyofilm oluşumu test Sonuçları

Yöntem	Biyofilm pozitif		Biyofilm negatif		Toplam Sayı
	Sayı (n)	Yüzde (%)	Sayı (n)	Yüzde (%)	
Mikrotitre plak Yöntemi	162	77,5	47	22,5	209

280 gıda örneğinden izole edilen 209 Stafilocok suşundan tespit edilen mikrotitre plak yöntemiyle biyofilm oluşumu test sonuçları Çizelge 4.10'da gösterilmiştir. Çizelge 4.10'daki sonuçlara göre 209 izolatin mikrotitre plak yönteminde 162'si (%77,5) biyofilm pozitif, 47'si (%22,5) biyofilm negatif olarak tespit edilmiştir.

Mikrotitre plak yöntem sonuçları üçer defa tekrarlanmış ve kendi içinde değerlendirilmiştir. Yapılan kontrol örneğinin ölçüm sonuçlarından düşük değerde ölçülen örnekler (-), kontrol değeri ve bu değerin iki katı kadar olan aralıkta ölçülen örnekler (+), kontrol değerinin iki katı ve dört katı kadar olan aralıkta ölçülen örnekler (++) ve kontrol değerinin dört katından yüksek değerde ölçülen örnekler (+++) olarak kabul edilmiştir.

Çizelge 4.11 Dana kıyma örneklerinden izole edilen Stafilocoklarda yapılan biyofilm sonuçları (mikrotitre plak yöntemi)

Örnek no	Ölçüm	Ortalama	Oran *
1	0,350/0,491/0,546	0,462	+++
2	0,434/0,401/0,444	0,426	+++
3	0,469/0,260/0,304	0,344	+++
4	0,341/0,290/0,319	0,316	+++
5	0,406/0,472/0,349	0,409	+++
6	0,358/0,459/0,430	0,416	+++
7	0,300/0,374/0,266	0,313	++
8	0,431/0,408/0,459	0,432	+++
9	0,376/0,272/0,235	0,294	++
10	0,287/0,386/0,312	0,328	+++
11	0,578/0,515/0,397	0,496	+++
12	0,391/0,326/0,310	0,342	+++
13	0,261/0,361/0,313	0,308	++
14	1,580/1,279/1,524	1,461	+++
15	0,233/0,194/0,189	0,205	++
16	0,906/0,582/0,667	0,718	+++
17	1,284/1,583/1,564	1,477	+++
18	2,006/2,448/2,020	2,158	+++
19	0,323/0,295/0,321	0,313	++
20	0,401/0,456/0,588	0,481	+++
21	0,228/0,275/0,192	0,231	++
22	0,230/0,177/0,204	0,203	++
23	0,179/0,173/0,170	0,174	++
24	0,205/0,183/0,199	0,195	++
25	0,176/0,261/0,231	0,222	++
26	0,154/0,161/0,220	0,178	++

Çizelge 4.11 (Devam) Dana kıyma örneklerinden izole edilen Stafilocoklarda yapılan biyofilm sonuçları

27	0,201/0,154/0,134	0,163	++
28	0,167/0,155/0,135	0,152	+
29	0,147/0,106/0,112	0,121	+
30	0,122/0,143/0,175	0,146	+
31	0,152/0,169/0,134	0,151	+
32	0,112/0,112/0,146	0,123	+
33	0,550/0,257/0,231	0,346	+++
34	1,457/1,100/0,786	1,114	+++
35	0,919/0,445/0,285	0,549	+++
36	0,608/0,177/0,455	0,413	+++
37	0,597/1,113/1,316	1,008	+++
38	1,817/1,549/1,355	1,573	+++
39	0,961/0,797/0,536	0,764	+++
40	0,595/0,666/0,533	0,598	+++
41	1,662/1,431/1,753	1,615	+++
42	0,584/0,829/0,452	0,621	+++
43	1,596/1,917/1,579	1,697	+++
44	0,245/0,228/0,150	0,207	++
45	1,885/0,827/1,4585	1,399	+++
46	0,962/1,578/1,851	1,463	+++
47	0,484/0,998/0,721	0,734	+++
48	0,561/0,338/0,411	0,436	+++
49	0,510/0,295/0,185	0,330	+++
50	0,468/0,350/0,221	0,346	+++
51	0,129/0,116/0,130	0,125	++
52	0,120/0,122/0,109	0,117	++
53	0,107/0,123/0,166	0,132	+
54	0,143/0,227/0,280	0,216	++

Çizelge 4.11 (Devam) ana kıyma örneklerinden izole edilen Stafilocoklarda yapılan biyofilm sonuçları

55	0,185/0,147/0,138	0,156	+
56	0,142/0,104/0,118	0,121	+
Kontrol	$\dots < (-) > 0,078$ $0,078 < (+) > 0,156$ $0,156 < (++) > 0,312$ $0,312 < (+++) > \dots$		

*(-); negatif , *(+); zayıf ,*(++); orta, *(+++); kuvvetli

Çizelge 4.11’de dana kıyma örneklerinden izole edilen Stafilocok suşlarının mikrotitre plak yöntemiyle yapılan biyofilm ölçüm sonuçlarına göre 56 izolatın 56’sı da (%100) biyofilm pozitif sonuç vermiştir.

Çizelge 4.12 Tavuk but örneklerinden izole edilen Stafilocoklarda yapılan biyofilm sonuçları (mikrotitre plak yöntemi)

Örnek no	Ölçüm	Ortalama	Oran*
1	0,801/1,413/1,749	1,321	+++
2	0,911/0,453/0,323	0,562	++
3	0,641/0,312/0,484	0,479	++
4	2,534/0,982/2,710	2,075	+++
5	0,220/0,276/0,403	0,309	+
6	0,442/0,368/0,300	0,370	+
7	0,624/0,565/0,569	0,586	++
8	0,412/0,487/0,359	0,419	+
9	0,316/1,008/0,281	0,535	++
10	0,312/0,237/0,241	0,263	+
11	0,313/0,323/0,342	0,326	+
12	0,628/0,428/0,680	0,579	++
13	0,367/0,390/0,304	0,353	+

Çizelge 4.12 (Devam) Tavuk but örneklerinden izole edilen Stafilocoklarda yapılan

biyofilm sonuçları (mikrotitre plak yöntemi)

14	0,455/0,189/0,220	0,288	+
15	0,363/0,428/0,353	0,381	+
16	0,382/0,479/0,435	0,432	++
17	0,253/0,812/0,476	0,513	++
18	0,397/0,542/0,475	0,471	++
19	0,220/0,252/0,216	0,229	+
20	0,182/0,200/0,267	0,216	+
21	0,169/0,198/0,256	0,207	-
22	0,204/0,155/0,153	0,170	-
23	0,147/0,170/0,185	0,167	-
24	0,186/0,235/0,132	0,184	-
25	0,176/0,231/0,230	0,212	-
26	0,253/0,242/0,223	0,240	+
27	0,241/0,415/0,216	0,291	+
28	0,177/0,192/0,193	0,187	-
29	0,266/0,238/0,261	0,255	+
30	0,258/0,263/0,377	0,299	+
31	0,285/0,223/0,217	0,241	+
32	0,204/0,171/0,253	0,209	-
33	0,145/0,103/0,206	0,151	-
34	0,241/0,193/0,453	0,305	+
35	0,235/3,286/0,393	1,304	+++
36	0,419/0,448/0,401	0,422	+
37	0,459/0,225/0,207	0,297	+
38	0,175/0,214/0,273	0,220	+
39	0,259/0,363/2,166	1,344	+++
40	0,243/0,400/1,373	0,672	++

Çizelge 4.12. (Devam) Tavuk but örneklerinden izole edilen Stafilocoklarda yapılan

biyofilm sonuçları (mikrotitre plak yöntemi)

41	0,241/0,201/0,225	0,222	+
42	1,406/1,079/1,142	1,209	+++
43	0,233/0,150/0,303	0,228	+
44	1,056/1,267/0,686	0,229	+
Kontrol	< (-) >0,215 0,215< (+) > 0,430 0,430< (++) >0,860 0,860< (+++) > ...		

*(-); negatif , *(+); zayıf ,*(++); orta, *(+++); kuvvetli

Çizelge 4.12 ‘de tavuk but örneklerinden izole edilen Stafilocok suşlarının mikrotitre plak yöntemiyle yapılan biyofilm ölçüm sonuçlarına göre 36 ‘sı (%81,2) biyofilm pozitif, 8’i (%18,2) biyofilm negatif tespit edilmiştir.

Çizelge 4.13 Çiğ süt örneklerinden izole edilen Stafilocoklarda yapılan biyofilm

sonuçları (mikrotitre plak yöntemi)

Örnek no	Ölçüm	Ort.	Oran
1	0,349/0,421/0,318	0,336	-
2	0,284/0,604/0,420	0,436	-
3	1,485/1,441/2,536	1,83	++
4	0,893/0,497/0,264	0,551	-
5	0,327/0,732/1,719	0,926	+
6	0,391/0,403/0,289	0,361	-
7	0,267/0,580/0,233	0,360	-
8	0,976/1,240/1,033	1,083	+

Çizelge 4.13. (Devam) Çiğ süt örneklerinden izole edilen Stafilocoklarda yapılan

biyofilm sonuçları (mikrotitre plak yöntemi)

9	0,334/1,033/0,441	0,603	+
10	0,453/0,334/0,421	0,402	-
11	0,334/0,370/0,370	0,358	-
12	0,488/0,549/0,551	0,530	-
13	0,609/0,609/0,685	0,634	+
15	0,263/0,300/0,301	0,288	-
14	0,455/0,189/0,220	0,288	+
16	0,234/0,378/0,283	0,298	-
17	0,420/0,664/0,401	0,495	-
18	0,393/0,466/0,646	0,501	-
19	0,340/0,246/0,286	0,291	-
20	1,690/0,823/0,856	1,123	+
21	1,157/2,818/1,241	1,739	++
22	3,485/3,400/3,309	3,398	+++
23	0,641/0,313/1,483	0,318	-
24	1,240/0,226/0,236	0,567	+
25	0,471/0,388/0,303	0,387	-
26	2,393/1,193/2,011	1,86	++
27	0,576/0,737/0,352	0,555	-
28	0,221/0,277/0,245	0,247	-
29	1,384/0,740/1,244	1,123	++
30	1,690/0,823/0,856	1,123	+
31	1,240/0,226/0,236	0,567	+
32	0,609/0,609/0,685	0,634	+
33	0,327/0,732/1,719	0,926	+
34	0,976/1,240/1,033	1,083	+
35	0,334/1,033/0,44	0,603	+
36	1,690/0,823/0,856	1,123	+

Çizelge 4.13. (Devam) Çiğ süt örneklerinden izole edilen Stafilocoklarda yapılan

biyofilm sonuçları (mikrotitre plak yöntemi)

37	0,327/0,732/1,719	0,926	+
38	1,384/0,740/1,244	1,123	+
39	0,565/0,577/0,787	0,643	+
40	0,616/0,563/0,582	0,587	+
41	0,706/0,647/0,598	0,650	+
42	1,020/1,388/1,076	1,161	+
43	1,106/1,079/1,142	1,109	+
44	1,033/0,441/0,334	0,603	+
Kontrol	$\begin{aligned} & \dots < (-) > 0,568 \\ & 0,568 < (+) > 1,136 \\ & 1,136 < (++) > 2,272 \\ & 2,272 < (+++) > \dots \end{aligned}$		

*(-); negatif , *(+); zayıf , *(++); orta, *(+++); kuvvetli

Çizelge 4.13'de Çiğ süt örneklerinden izole edilen Stafilocok suşlarının mikrotitre plak yöntemiyle yapılan biyofilm ölçüm sonuçları gösterilmiştir. Suşların 26'sı (%59) biyofilm pozitif, 18'i (%41) biyofilm negatif olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.14 Dondurma örneklerinden izole edilen Stafilocoklarda yapılan biyofilm

sonuçları (mikrotitre plak yöntemi)

Örnek no	Ölçüm	Ort.	Oran
1	2,675/3,572/3,423	3,22	+
2	2,829/3,529/2,846	3,068	+
3	3,492/2,696/2,437	2,875	-
4	3,005/3,258/1,160	2,474	-
5	3,601/3,563/2,531	3,232	+
6	3,554/3,564/3,528	3,548	+

Çizelge 4.14 (Devam) Dondurma örneklerinden izole edilen Stafilokoklarda yapılan

biyofilm sonuçları (mikrotitre plak yöntemi)

7	3,521/3,477/3,497	3,49	+
8	3,026/3,108/2,317	2,817	-
9	3,423/3,143/2,299	2,955	+
10	1,334/3,615/3,503	2,817	-
11	3,490/3,423/3,040	3,318	+
12	2,911/0,933/2,313	2,052	-
13	2,878/2,078/1,481	2,146	-
14	2,026/3,576/3,532	3,045	+
15	3,541/3,575/3,539	3,552	+
16	3,656/3,527/3,381	3,491	+
17	2,913/2,264/3,631	2,936	-
18	3,595/3,579/3,426	3,53	+
19	3,558/3,546/3,531	3,55	+
20	3,471/3,414/3,459	3,450	+
21	3,589/3,300/2,050	2,97	+
22	2,649/3,283/3,549	3,16	+
23	3,544/3,499/3,515	3,520	+
24	3,507/2,914/3,452	3,291	+
25	3,346/2,230/2,087	2,554	+
26	3,548/3,561/3,535	3,548	+
27	3,433/3,499/3,539	3,490	+
28	3,485/3,459/3,387	3,44	+
29	3,490/3,157/3,509	3,385	+
30	3,492/3,505/3,490	3,50	+
31	3,452/3,405/3,475	3,44	+
32	3,440/3,446/3,415	3,44	+
33	3,577/3,619/3,576	3,59	+
34	3,568/2,643/3,497	3,236	+

Çizelge 4.14. (Devam) Dondurma örneklerinden izole edilen Stafilocoklarda yapılan biyofilm sonuçları (mikrotitre plak yöntemi)

35	3,465/3,437/3,464	3,455	+
36	3,442/3,409/3,411	3,421	+
Kontrol	$\dots < (-) > 2956$ $2,956 < (+) > 4,956$		

*(-); negatif , *(+); zayıf ,*(++); orta, *(+++); kuvvetli

Çizelge 4.14’de dondurma örneklerinden izole edilen Stafilocok suşlarının mikrotitre plak yöntemiyle yapılan biyofilm ölçüm sonuçları gösterilmiştir. Suşların 29’u (%80,6) biyofilm pozitif, 7’si (%19,4) biyofilm negatif olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.15 Peynir örneklerinden izole edilen Stafilocoklarda yapılan biyofilm sonuçları (mikrotitre plak yöntemi)

Örnek no	Ölçüm	Ort.	Oran
1	0,429/0,267/0,236	0,310	-
2	2,110/0,716/0,957	1,261	+
3	1,613/0,810/2,526	1,649	++
4	0,352/0,566/0,287	0,401	-
5	0,453/0,318/0,376	0,382	-
6	0,497/0,624/0,553	0,558	-
7	0,291/0,220/0,303	0,271	-
8	0,344/0,180/0,163	0,229	-
9	1,672/0,596/1,591	1,286	+
10	1,907/1,157/0,902	1,322	+
11	1,044/0,934/0,645	0,874	+
12	0,216/0,189/0,196	0,200	-
13	0,344/0,341/0,449	0,378	-
14	0,420/0,635/0,411	0,488	-
15	1,350/1,437/1,806	1,531	++

Çizelge 4.15 Peynir örneklerinden izole edilen Stafilocoklarda yapılan biyofilm sonuçları (mikrotitre plak yöntemi)

16	1,133/0,775/0,891	0,933	+
17	1,020/1,588/1,276	1,295	+
18	2,014/1,550/1,443	1,669	++
19	0,853/0,704/0,641	0,732	+
20	0,437/0,262/0,234	0,311	-
21	0,556/0,550/0,682	0,596	-
22	0,706/0,647/0,598	0,650	-
23	0,895/0,769/0,773	0,812	+
24	0,607/0,811/1,101	0,840	+
25	0,885/1,068/1,179	1,004	+
26	0,616/0,464/0,582	0,554	-
27	0,741/0,550/0,477	0,589	-
28	0,565/0,577/0,787	0,634	-
29	1,201/0,959/1,423	1,194	+
Kontrol	,... < (-) > 0,690 0,690 < (+) > 1,380 1,380 < (++) > 2,760 2,760 < (+++) > ...		

*(-); negatif , *(+); zayıf , *(++); orta, *(+++); kuvvetli

Çizelge 4.15’de peynir örneklerinden izole edilen Stafilocok suşlarının mikrotitre plak yöntemiyle yapılan biyofilm ölçüm sonuçlarına göre 14’ü (%48,8) biyofilm pozitif, 15’i (%51,2) biyofilm negatif olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.16 Stafilokok türlerinin mikrotitre plak yöntemiyle tespit edilen biyofilm oluşumlarının değerlendirilmesi

Türler	İzole edilen suşlar	Biyofilm oluşumu negatif (0)		Zayıf biyofilm oluşumu (+)		Orta değerde biyofilm oluşumu (++)		Kuvvetli biyofilm oluşumu (+++)		Toplam biyofilm oluşumu	
	n	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>S. aureus</i>	17	6	35,3	4	23,5	4	23,5	3	17,6	11	64,7
<i>S. intermedius</i>	13	7	53,8	5	38,5	-	-	1	7,7	6	46,1
<i>S. hyicus</i>	4	3	75	1	25	-	-	-	-	1	25
<i>S. cohnii</i>	46	9	19,5	32	69,5	2	4,3	3	6,5	37	80,4
<i>S.xylosus</i>	36	-	-	5	13,9	14	38,9	17	47,2	36	100
<i>S.hominis</i>	34	7	20,5	17	50	3	8,8	7	20,6	27	79,4
<i>S.simulans</i>	20	4	20	10	50	4	20	2	10	16	80
<i>S.capitis</i>	13	3	23	3	23	5	38,5	2	15,4	10	76,9
<i>S.haemolyticus</i>	9	1	11,1	7	77,8	1	11,1	-	-	8	88,9
<i>S.epidermidis</i>	7	1	14,3	4	57,1	-	-	2	28,5	6	85,7
<i>S.auricularis</i>	6	3	50	2	33,3	1	16,7	-	-	3	50
<i>S.warneri</i>	3	2	66,6	1	33,3	-	-	-	-	1	33,3
<i>S.saprophyticus</i>	1	1	100	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	209	47	22,5	91	43,5	34	16,3	37	17,7	162	77,5

Çizelge 4.16'ya göre 209 izolatin 47'si (22,5) biyofilm oluşturmazken, 91'i (43,5) düşük değerde, 34'ü (16,3) orta değerde ve 37'si (17,7) yüksek değerde biyofilm

pozitif olarak tespit edilmiştir. Toplam suşların 162'si (77,5) biyofilm pozitif bulunmuştur.

Çizelge 4.17 Kongo kırmızılı agar (CRA) yöntemi ile biyofilm pozitif ve biyofilm negatif toplam 209 Stafilocok suşunun dağılımları

Yöntem	Biyofilm pozitif		Biyofilm negatif		Toplam	
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
CRA	84	40,2	125	59,8	209	100

n: Suş sayısı

280 gıda örneğinden izole edilen 209 Stafilocok suşunun kongo kırmızılı agar (CRA) da ki biyofilm oluşumu sonuçları çizelge 4.17'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre 209 suşun 84'ü (%40,2) biyofilm oluşumu pozitif, 125'i (%59,8) biyofilm oluşumu negatif olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.18 Gıda örneklerinden izole edilen 209 Stafilocok suşunun CRA yöntemi ile biyofilm test sonuçları

Gıda örneği	CRA testi				Toplam
	Pozitif		Negatif		
	n	%	n	%	
Dana kıyma	12	21,4	44	78,6	56
Tavuk but	19	43,2	25	56,8	44
Çiğ süt	20	45,5	24	54,5	44
Dondurma	27	75	9	25	36
Peynir	6	20,7	23	79,3	29
Toplam	84	40,2	125	59,8	209

n: Suş sayısı

Çizelge 4.18'deki sonuçlara göre dana kıyma örneklerinin 12'si (%21,4), tavuk but örneklerinin 19'u (%43,2), çiğ süt örneklerinin 20 'si (%45,5), dondurma örneklerinin 27'si (%75) ve peynir örneklerinin 6'sından (%20,7) olmak üzere toplam 84 (%40,2) biyofilm pozitif sonuç tespit edilmiştir.

Çizelge 4.19 Kıyma örneklerinden izole edilen Stafilocok türlerinin CRA test sonucu

Stafilokok türü	CRA(+)		CRA(-)		Toplam
	(n)	(%)	(n)	(%)	
<i>S.xylosus</i>	7	19,4	29	80,6	36
<i>S.hominis</i>	1	14,3	6	85,7	7
<i>S.aureus</i>	3	50	3	50	6
<i>S.capitis</i>	-	-	3	100	3
<i>S.cohnii</i>	-	-	2	100	2
<i>S.epidermidis</i>	1	50	1	50	2
Toplam	12	21,4	44	78,6	56

n:Suş sayısı

Dana kıyma örneklerinden izole edilen 56 Stafilocok suşunun biyofilm oluşum dağılımı çizelge 4.19’da gösterilmiştir. 7 (%19,4) *S.xylosus*, 3 (%50) *S.aureus*, 1 (%50) *S.epidermidis* ve 1 (%14,3) *S.hominis* suşunun biyofilm oluşturduğu, 29 (%80,6) *S.xylosus*, 6 (%85,7) *S.hominis*, 3 (%50) *S.aureus*, 3 (%100) *S.capitis*, 2 (%100) *S.cohnii* ve 1 (%50) *S.epidermidis* suşunun biyofilm oluşturmadığı gözlenmiştir.

Çizelge 4.20 Tavuk but örneklerinden izole edilen Stafilocok türlerinin CRA test sonucu

Stafilokok türü	CRA(+)		CRA(-)		Toplam
	(n)	(%)	(n)	(%)	
<i>S.simulans</i>	9	69,2	4	30,8	13
<i>S.cohnii</i>	4	40	6	60	10
<i>S.capitis</i>	1	11,1	8	88,9	9
<i>S.hominis</i>	3	50	3	50	6
<i>S.intermedius</i>	2	66	1	33	3
<i>S.auricularis</i>	-	-	2	100	2
<i>S.haemolyticus</i>	-	-	1	100	1
Toplam	19	43,2	25	56,8	44

n: Suş sayısı

Tavuk but örneklerinden izole edilen 44 Stafilocok suşunun biyofilm oluşum dağılımı çizelge 4.20’de gösterilmiştir. 9 (%69,2) *S.simulans*, 4 (%40) *S.cohnii*, 3 (%50) *S.hominis*, 2 (%66) *S.intermedius* ve 1 (%11,1) *S.capitis* suşunun biyofilm oluşturduğu, 8 (%88,9) *S.capitis*, 6 (%60) *S.cohnii*, 4 (%30,8) *S.simulans* ,3 (%50) *S.hominis*, 2 (%100) *S.auricularis*, 1 (%100) *S.haemolyticus* ve 1 (%33) *S.intermedius* suşunun biyofilm oluşturmadığı gözlenmiştir.

Çizelge 4.21 Çiğ süt örneklerinden izole edilen Stafilocok türlerinin CRA test sonucu

Stafilokok türü	CRA(+)		CRA(-)		Toplam
	(n)	(n)	(n)	(n)	
<i>S.hominis</i>	6	54,5	5	45,5	11
<i>S.aureus</i>	5	55,6	4	44,4	9
<i>S.intermedius</i>	3	37,5	5	62,5	8
<i>S. hyicus</i>	3	75	1	25	4
<i>S.cohnii</i>	1	25	3	75	4
<i>S. simulans</i>	-	-	4	100	4
<i>S.epidermidis</i>	2	100	-	-	2
<i>S.auricularis</i>	-	-	1	100	1
<i>S.haemolyticus</i>	-	-	1	100	1
Toplam	20	45,5	24	54,5	44

n: Suş sayısı

Çiğ süt örneklerinden izole edilen Stafilocok suşlarının CRA sonuçlarının türlere göre dağılımı çizelge 4.21’de gösterilmiştir. 6 (%54,5) *S.hominis*, 5 (%55,6) *S.aureus*, 3 (%75) *S. hyicus*, 3 (%37,5) *S.intermedius*, 2 (%100) *S.epidermidis* ve 1 (%25) *S.cohnii* suşunun biyofilm oluşturduğu, 5 (%45,5) *S.hominis*, 5 (%37,5) *S.intermedius*, 4 (%44,4) *S.aureus*, 4 (%100) *S. simulans*, 3 (%75) *S.cohnii*, 1 (%100) *S.auricularis*, 1 (%100) *S.haemolyticus* ve 1 (%25) *S. hyicus* suşunun biyofilm oluşturmadığı gözlenmiştir.

Çizelge 4.22 Dondurma örneklerinden izole edilen Stafilocok türlerinin CRA test sonucu

Stafilokok türü	CRA(+)		CRA(-)		Toplam
	(n)	(%)	(n)	(%)	
<i>S.cohnii</i>	17	85	3	15	20
<i>S.hominis</i>	5	83,3	1	16,7	6
<i>S.haemolyticus</i>	2	100	-	-	2
<i>S. warnerii</i>	2	100	-	-	2
<i>S.epidermidis</i>	-	-	3	100	3
<i>S.capitis</i>	1	100	-	-	1
<i>S. saprophyticus</i>	-	-	1	100	1
<i>S. simulans</i>	-	-	1	100	1
Toplam	27	75	9	25	36

n :Suş sayısı

Çizelge 4.22'deki dondurma örneklerinin CRA pozitif sonuçlarının 17'si (%85) *S.cohnii*, 5'i (%83,3) *S.hominis*, 2'si (%100) *S.haemolyticus*, 2'si (%100) *S. warnerii* ve 1'i (%100) *S.capitis* olarak tespit edilirken, CRA negatif sonuçların 3'ü (%15) *S.cohnii*, 3'ü (%100) *S.epidermidis*, 1'i (%16,7) *S.hominis*, 1'i (%100) *S. saprophyticus* ve 1'i (%100) *S. simulans* olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.23 Peynir örneklerinden izole edilen Stafilocok türlerinin CRA test sonucu

Stafilokok türü	CRA (+)		CRA (-)		Toplam
	(n)	(%)	(n)	(%)	
<i>S.cohnii</i>	1	10	9	90	10
<i>S.haemolyticus</i>	-	-	5	100	5
<i>S.hominis</i>	2	50	2	50	4
<i>S.auricularis</i>	-	-	3	100	3
<i>S.aureus</i>	2	100	-	-	2
<i>S.intermedius</i>	-	-	2	100	2
<i>S. simulans</i>	-	-	2	100	2
<i>S.warnerii</i>	1	100	-	-	1
Toplam	6	20,7	23	79,3	29

n: Suş sayısı

Peynir örneklerinden izole edilen Stafilocok suşlarının CRA sonuçlarının türlere göre dağılımı çizelge 4.23’de gösterilmiştir. Çizelge 4.23’deki CRA pozitif test sonuçlarının 2’si (%100) *S.aureus*, 2’si (%50) *S.hominis*, 1’i (%10) *S.cohnii* ve 1’i (%100) *S.warnerii* olarak tespit edilmiştir. CRA negatiflerin ise, 9’u (%90) *S.cohnii*, 5’i (%100) *S.haemolyticus*, 3’ü (%100) *S.auricularis*, 2’si (%50) *S.hominis*, 2’si (%100) *S.intermedius* ve 2’si (%100) *S. simulans* olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.24 Toplam 209 Stafilocok suşunun Kongo kırmızılı agar (CRA) ve mikrotitre plak yöntemi (MP) ile biyofilm üretimleri

Yöntemler	Biyofilm pozitif		Biyofilm negatif		Toplam
	(n)	(%)	(n)	(%)	
CRA	84	40,2	125	59,8	209
Mikrotitreplak yöntemi	162	77,5	47	22,5	209

280 gıda örneğinden izole edilen 209 Stafilocok suşlarının kongo kırmızılı agar ve mikrotitre plak yöntemleriyle biyofilm oluşum sonuçları çizelge 4.24’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre 209 Stafilocok suşunun 84’ü (%40,2) CRA yöntemiyle pozitif sonuç verirken, 162’si (%77,5) mikrotitreplak yönteminde pozitif sonuç vermiştir. 209 suşun 125’i (%59,8) CRA yönteminde negatif sonuç vermişken ,47’si (%22,5) mikrotitre plak yönteminde negatif sonuç vermiştir.

Çizelge 4.25 Dana kıyma örneklerinden izole edilen Stafilocok türlerinin CRA yöntemi ve Mikrotitre plak yöntemi ile biyofilm test sonuçları

Yöntemler	Biyofilm pozitif		Biyofilm negatif		Toplam Sayı
	(n)	(%)	(n)	(%)	
CRA	12	21,4	44	78,6	56
Mikrotitreplak yöntemi	56	100	-	-	56

n: Suş sayısı

Dana kıyma örneklerinden izole edilen stafilokok suşlarının 12'si (%21,4) CRA pozitif, 44'ü (%78,6) CRA negatif sonuç tespit edilmiştir. Mikrotitreplak yönteminde 56'sı (%100) biyofilm pozitif sonuç tespit edilmiştir.

Çizelge 4.26 Tavuk but örneklerinden izole edilen Stafilokok türlerinin CRA yöntemi ve mikrotitreplak yöntemi ile biyofilm test sonuçları

Yöntemler	Biyofilm pozitif		Biyofilm negatif		Toplam Sayı
	(n)	(%)	(n)	(%)	
CRA	19	43,2	25	56,8	44
Mikrotitreplak Yöntemi	36	81,2	8	18,2	44

n : Suş sayısı

Çizelge 4.26'da tavuk but örneklerinden izole edilen Stafilokok suşlarının biyofilm test sonuçları verilmiştir. Sonuçlara göre örneklerin 19'u (%43,2) CRA pozitif, 25'i (%56,8) CRA negatif tespit edilmiştir. Mikrotitre plak yönteminde ise, 36' sı (%81,2) biyofilm pozitif, 8'i (%18,2) biyofilm negatif olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.27 Çiğ süt örneklerinden izole edilen Stafilocok türlerinin CRA yöntemi ve mikrotitreplak yöntemi ile biyofilm test sonuçları

Yöntemler	Biyofilm pozitif		Biyofilm negatif		Toplam
	(n)	(%)	(n)	(%)	
CRA	20	45,5	24	54,5	44
Mikrotitreplak Yöntemi	26	59	18	41	44

n : Suş sayısı

Çiğ sütlerden izole edilen Stafilocok türlerinin biyofilm test sonuçları çizelge 4.27’de verilmiştir. 44 Stafilocok türünün 20’si (%45,5) CRA pozitif, 24’ü (54,5) CRA negatif olarak tespit edilmiştir. Mikrotitre plak yönteminde ise, 26’sı (%59) biyofilm pozitif, 18’i (%41) biyofilm negatif olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.28 Dondurma örneklerinden izole edilen Stafilocok türlerinin CRA yöntemi ve mikrotitre plak yöntemi biyofilm test sonuçları

Yöntemler	Biyofilm pozitif		Biyofilm negatif		Toplam
	(n)	(%)	(n)	(%)	
CRA	27	75	9	25	36
Mikrotitreplak Yöntemi	29	80,6	7	19,4	36

n : Suş sayısı

Çizelge 4.28’de dondurma örneklerinden izole edilen Stafilocok türlerinin biyofilm oluşumları verilmiştir. Çizelge 4.28’e göre izolatların 27’ si (%75) CRA pozitif, 9’u (%25) CRA negatif tespit edilmiştir. Mikrotitre plak yönteminde ise, 29’u (%80,6) biyofilm pozitif, 7’si (%19,4) biyofilm negatif olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.29 Peynir örneklerinden izole edilen Stafilocok suşlarının CRA yöntemi ve mikrotitre plak yöntemi ile biyofilm test sonuçları

Yöntemler	Biyofilm pozitif		Biyofilm negatif		Toplam
	(n)	(%)	(n)	(%)	
CRA	6	20,7	23	79,3	29
Mikrotitreplak yöntemi	14	48,3	15	51,7	29

n : Suş sayısı

Peynir örneklerinden izole edilen Stafilocokların biyofilm oluşumları çizelge 4.29’da verilmiştir. Suşların 6’sı (%20,7) CRA pozitif, 23’ü (%79,3) CRA negatif tespit edilmiştir. Mikrotitre plak yöntemine göre 14’ü (%48,3) biyofilm pozitif, 15’i (%51,7) biyofilm negatif tespit edilmiştir.

Çizelge 4.30 Stafilocok türlerinin mikrotitre plak yöntemi (MP) ve CRA yöntemiyle biyofilm oluşumlarının karşılaştırılması

Stafilocok türleri		MP yöntemi Biyofilm oluşumu (+)		CRA yöntemi Biyofilm oluşumu (+)		Hem MP (+) Hem CRA (+)	
		(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
KPS	<i>S.aureus</i> (17)	11	64,7	10	58,8	6	35,3
	<i>S. intermedius</i> (13)	6	46,2	6	46,2	2	15,4
	<i>S. hyicus</i> (4)	1	25	3	75	1	25
KNS	<i>S.cohnii</i> (46)	37	80,4	24	52,2	20	43,5
	<i>S. xylosus</i> (36)	36	100	7	19,4	7	19,4
	<i>S.hominis</i> (34)	27	79,4	17	50	12	35,3
	<i>S. simulans</i> (20)	16	80	8	40	7	35
	<i>S. capitis</i> (13)	11	84,6	2	15,4	-	-
	<i>S. haemolyticus</i> (9)	8	88,9	2	22,2	2	22,2
	<i>S. epidermidis</i> (7)	6	85,7	3	42,8	3	42,8
	<i>S. auricularis</i> (6)	2	33,3	-	-	-	-
	<i>S. warneri</i> (3)	1	33,3	3	100	1	33,3
	<i>S.saprophyticus</i> (1)	-	-	-	-	-	-
Toplam (209)		162	77,5	84	40,2	61	29,2

n : Suş sayısı

Çizelge 4.30'da KNS ve KPS türleri için mikrotitre plak yöntemi (MP) ve CRA yöntemi ile belirlenen biyofilm oluşumlarının karşılaştırılması verilmiştir. *S.aureus* suşlarının 11 'i (%64,7) MP (+), 10'u(%58,8) CRA (+), *S.hyicus* suşlarının 1 'i(%25) MP (+), 3'ü (%75) CRA (+), *S.intermedius* suşlarının 6'sı (%46,2) hem MP(+) hem de CRA(+), *S.cohnii* suşlarının 37'si (%80,4) MP(+), 24'ü (%52,2) CRA (+), *S.xylosus* suşlarının 36'sı (%100) MP (+), 7'si (%19,4) CRA (+), *S.hominis* suşlarının 27'si (%79,4) MP (+), 17'si (%50) CRA(+), *S.simulans* suşlarının 16'sı (%80) MP(+), 8'i

(%40) CRA (+), *S.capitis* suşlarının 11'i (%84,6) MP(+), 2'si (%15,4) CRA (+), *S.haemolyticus* suşlarının 8'i (%88,9) MP (+), 2 'si (%22,2) CRA (+), *S.epidermidis* suşlarının 6'sı (%85,7) MP(+), 2 'si (%28,6) CRA (+), *S.auricularis* suşlarının 2'si (%33,3) MP(+), *S. warneri* suşlarının 1'i (%33,3) MP(+), 3'ü(%100) CRA (+) olarak tespit edilirken *S.saprophyticus* suşları MP ve CRA yöntemlerinde pozitif sonuç vermemiştir.

Çizelge 4.31 Stafilokokların mikrotitre plak yöntemi (MP) ve kongo kırmızılı agar yöntemi (CRA) ile biyofilm pozitiflerinin gıdalar türlerine göre karşılaştırılması

Türler	Dana Kıyma (56)		Tavuk But (44)		Çiğ süt (44)		Dondurma (36)		Beyaz Peynir (29)	
	CRA	MP	CRA	MP	CRA	MP	CRA	MP	CRA	MP
	n (%)	n (%)	n (%)	n(%)	n (%)	n(%)	n (%)	n(%)	n (%)	n(%)
<i>S. aureus</i> (17)	3(17,6)	6(35,3)	-	-	5(29,4)	4(23,5)	-	-	2(11,7)	1(5,8)
<i>S. intermedius</i> (13)	-	-	2(15,4)	2(15,4)	4(30,7)	3(23)	-	-	-	1(7,7)
<i>S. hyicus</i> (4)	-	-	-	-	3(75)	1(25)	-	-	-	-
<i>S. cohnii</i> (46)	-	2(4,4)	5(10,9)	8(17,4)	1(2,2)	4(8,7)	17(37)	19(41)	1(2,2)	4(8,7)
<i>S.xylosus</i> (36)	7(19,4)	36(100)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S.hominis</i> (34)	1(2,9)	7(20,6)	4(11,7)	6(17,6)	5(14,7)	8(23,5)	5(14,7)	4(11.)	2(5,8)	2(5,8)
<i>S.simulans</i> (20)	-	-	7(35)	11(55)	1(5)	3 (15)	-	1(5)	-	1(5)
<i>S.capitis</i> (13)	-	3(23,1)	1(7,7)	7(53,8)	-	-	1(7,7)	1(7,7)	-	-
<i>S.haemolyticus</i> (9)	-	-	-	1(11,1)	-	1(11,1)	2(22,2)	2(22,2)	-	4(44,4)
<i>S.epidermidis</i> (7)	1(14,3)	2(28,5)	-	-	1(14,3)	2(28,5)	-	2(28,5)	-	-
<i>S.auricularis</i> (6)	-	-	-	1(16,7)	-	-	-	-	-	1(16,7)
<i>S.warneri</i> (3)	-	-	-	-	-	-	2(66,7)	1(33,3)	1(33,3)	-
<i>S.saprophyticus</i> (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Toplam (209)	12(21,4)	56(100)	19(43,1)	36(81,8)	20(45,5)	26(59,1)	27(75)	30(83,3)	6(20,7)	14(48,3)

n : Suş sayısı % : Biyofilm oluşturan suşların, o türün toplamı içindeki yüzdesi

Çizelge 4.31’de gıdalardan izole edilen Stafilocok türlerinin CRA ve MP yöntemi ile biyofilm oluşumunun karşılaştırılması verilmiştir. Kıyma örneklerinden izole edilen suşların 12’si (21,4) CRA (+) sonu verirken MP yöntemide 56’sı (100) (+) sonu vermiştir. Tavuk but örneklerinin 19’u (43,1) CRA (+), 36’sı (81,8) MP (+), çiğ süt örneklerinin 20 ‘si (45,5) CRA (+), 26’sı (59,1) MP (+) , dondurma örneklerinin 27’si (%75) CRA (+), 30 ‘u (83,3) MP (+) ve peynir örneklerinin 6’sı (20,7) CRA (+), 14’ü (48,3) MP (+) olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.32 Dana kıyma örneklerinden izole edilen toplam 56 Stafilocok suşunun antibiyotik dirençlilikleri

Antibiyotik Adı	Duyarlı		Orta Duyarlı		Dirençli	
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
Amikasin(AN)	35	63	5	9	16	28
Ampisilin(AM)	45	80	-	-	11	20
Eritromisin(E)	35	63	12	21	9	16
Gentamisin(GM)	51	91	2	4	3	5
Klindamisin(cc)	39	70	16	28	1	2
Kloromfenikol(C)	55	98	-	-	1	2
Metisilin(met)	42	75	10	17,9	4	7.1
Tetrasiklin(TE)	37	66	1	2	18	32
Vankomisin(VA)	54	96	2	4	-	-

n: Suş sayısı

Kıyma örneklerinden izole edilen 56 Stafilocok suşlarının antibiyotik test sonuçları çizelge 4.32’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre 18’i (%32) tetrasikline, 16’sı (%28) amikasin’e, 11’i (%20) ampisilin’e, 9’u (%16) eritromisin’e, 4’ü (%7,1) metisilin’e, 3’ü (%5) oksasilin’e, 3’ü (%5) gentamisin’e, 1’i (%2) kloromfenikol’e ve 1’i (%2)

klindamisin'e dirençli olarak tespit edilmiştir. 56 Stafilocok suşunda vankomisin'e herhangi bir direnç saptanmamıştır.

Çizelge 4.33 Tavuk but örneklerinden izole edilen toplam 44 Stafilocok suşunun antibiyotik dirençlilikleri

Antibiyotik Adı	Duyarlı		Orta Duyarlı		Dirençli	
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
Amikasin(AN)	43	97,7	-		1	2,3
Ampisilin(AM)	30	68,2	7	15,9	7	15,9
Eritromisin(E)	27	61,4	-		17	38,6
Gentamisin(GM)	37	84,1	2	4,5	3	6,8
Klindamisin(cc)	37	84,1	-		-	-
Kloromfenikol(C)	40	91	-		4	9,1
Metisilin (met)	26	59,1	4	9,1	18	40,9
Tetrasiklin(TE)	10	22,7	-		34	72,3
Vankomisin(VA)	42	95,5	7	15,9	-	-

n: suş sayısı

Tavuk but örneklerinden izole edilen 44 Stafilocok suşunun antibiyotik test sonuçları Çizelge 4.33'de verilmiştir. Suşların, 34'ü (%72,3) tetrasiklin'e, 18'i (%40,9) metisilin'e, 17'si (%38,6) eritromisin'e, 7'si (%15,9) ampisilin'e, 4'ü (%9,1) ,3'ü (%6,8) gentamisin'e ve 1'i (%2,3) amikasin'e dirençli oldukları görülmüştür. 44 Stafilocok suşlarında klindamisin ve vankomisin antibiyotiklerine direnç saptanamamıştır.

Çizelge 4.34 Çiğ süt örneklerinden izole edilen toplam 44 Stafilocok suşunun antibiyotik dirençlilikleri

Antibiyotik Adı	Duyarlı		Orta Duyarlı		Dirençli	
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
Amikasin(AN)	41	93,2	2	4,5	1	2,3
Ampisilin(AM)	26	59,1	5	11,4	13	29,5
Eritromisin(E)	41	93,2	2	4,5	1	2,3
Gentamisin(GM)	42	95,5	1	2,3	1	2,3
Klindamisin(cc)	31	70,5	8	18,2	5	11,4
Kloromfenikol(C)	39	88,6	2	4,5	3	6,8
Metisilin (met)	34	77,3	4	9,1	7	15,9
Tetrasiklin(TE)	41	93,2	2	4,5	1	2,3
Vankomisin(VA)	44	100	-	-	-	-

n: Suş sayısı

Çiğ süt örneklerinden izole edilen 44 Stafilocok suşunun antibiyotik test sonuçları Çizelge 4.34’de dösterilmiştir. Çizelge 4.34’deki sonuçlara göre 44 Stafilocok suşunun 13’ü (%29,5) ampisilin’e, 7’si (%15,9) metisilin’e, 5’i (%11,4) klindamsin’e, 1’i (%2,3) tetrasiklin’e, 1’i (%2,3) amikasin’e, 1’i (%2,3) gentamisin’e ve 1’i (%2,3) eritromisin’e dirençli olarak gözlenmiştir. 44 Stafilocok suşunda vankomisin antibiyotiğine direnç saptanamamıştır.

Çizelge 4.35 Dondurma örneklerinden izole edilen toplam 36 Stafilocok suşunun antibiyotik dirençlilikleri

Antibiyotik Adı	Duyarlı		Orta Duyarlı		Dirençli	
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
Ampisilin(AM)	5	13,9	5	13,9	26	72,2
Amikasin(AN)	36	100	-	-	-	-
Eritromisin(E)	20	55,5	4	11,1	12	33,3
Gentamisin(GM)	26	72,2	6	16,7	4	11,1
Klindamisin(cc)	36	100	-	-	-	-
Kloromfenikol(C)	24	66,7	6	16,7	6	16,7
Metisilin (met)	24	66,7	-	-	12	33,3
Tetrasiklin(TE)	28	77,8	2	5,5	6	16,7
Vankomisin(VA)	36	100	-	-	-	-

n: Suş sayısı

Dondurma örneklerinden izole edilen 36 Stafilocok izolatının antibiyotik test sonuçları Çizelge 4.35’de gösterilmiştir. Çizelge 4.35’deki sonuçlara göre 36 izolatın 26’sı (%72,2) ampisilin, 12’si (%33,3) metisilin, 12’si (%33,3) eritromisin, 6’si (%16,7) tetrasiklin, 6’si (%16,7) kloromfenikol ve 4’ü (%11,1) gentamisin antibiyotiklerine direçli tespit edilmiştir. 36 Stafilocok izolatında klindamisin, vankomisin ve amikasin antibiyotiklerine direnç saptanamamıştır.

Çizelge 4.36 Peynir örneklerinden izole edilen toplam 29 Stafilocok suşunun antibiyotik dirençlilikleri

Antibiyotik Adı	Duyarlı		Orta Duyarlı		Dirençli	
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
Amikasin(AN)	28	96,6	1	3,4	-	-
Ampisilin (AM)	18	62	-	-	11	38
Eritromisin(E)	23	79,3	6	20,6	2	6,9
Gentamisin(GM)	21	72,4	6	20,6	2	6,9
Klindamisin(cc)	18	62,1	9	31	2	6,9
Kloromfenikol(C)	24	82,7	3	10,3	2	6,9
Metisilin (met)	13	44,8	4	13,8	12	41,4
Tetrasiklin (TE)	28	96,6	-	-	1	3,4
Vankomisin(VA)	29	100	-	-	-	-

n: Suş sayısı

Peynir örneklerinden izole edilen 29 Stafilocok suşunun antibiyotik test sonuçları Çizelge 4.36'da gösterilmiştir. Çizelge 4.36'daki sonuçlara göre 29 Stafilocok suşlarının, 12'si (%41,4) metisilin'e, 11'i (%38) ampisilin'e, 2'si (%6,9) klindamisin'e, 2'si (%6,9) kloromfenikol'e, 2'si (%6,9) gentamisin'e, 2'si (%6,9) eritromisin'e ve 1'i (%3,4) tetrasiklin'e dirençli olarak saptanmıştır. 29 Stafilocok suşunda vankomisin ve amikasin antibiyotiklerine herhangi bir direnç saptanamamıştır.

Çizelge 4.37. Toplam 209 Stafilocok suşunun antibiyotik dirençlilikleri

Türler	n Metisilin %	n Ampisilin %	n Gentamisin %	n Amikasin %	n Eritromisin %
<i>S.cohnii</i> (46)	11 23,9	21 45,7	6 13	-	15 32,6
<i>S.xylosus</i> (36)	-	5 13,9	-	10 27,8	3 8,3
<i>S.hominis</i> (34)	8 23,5	12 35,3	1 2,9	1 2,9	6 17,6
<i>S.simulans</i> (20)	3 15	4 20	2 10	-	9 45
<i>S.aureus</i> (17)	5 29,4	10 58,8	3 17,6	3 17,6	2 11,7
<i>S.capitis</i> (13)	4 30,1	1 7,7	-	-	2 15,4
<i>S.intermedius</i> (13)	1 7,7	4 30,7	1 7,7	-	2 15,4
<i>S.haemolyticus</i> (9)	2 22,2	4 44,4	-	-	1 11,1
<i>S.epidermidis</i> (7)	2 28,5	2 28,5	-	1 14,3	2 28,5
<i>S.auricularis</i> (6)	2 33,3	-	1 16,6	-	-
<i>S.hyicus</i> (4)	-	1 25	-	1 25	-
<i>S.warneri</i> (3)	1 33,3	2 66,6	-	-	2 66,6
<i>S.saprophyticus</i> (1)	1	1	-	-	-

Çizelge 4.37. (Devam) Toplam 209 Stafilokok suşunun antibiyotik dirençlilikleri

Türler	Kloramfenikol		Vankomisin		Tetrasiklin		Klindamisin	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>S.cohnii</i> (46)	7	15,2	-		17	37	2	4,3
<i>S.xylosus</i> (36)	1	1,8	-		10	27,8	-	
<i>S.hominis</i> (34)	2	5,9	-		5	14,7	5	14,7
<i>S.simulans</i> (20)	5	25	-		13	65	-	
<i>S.aureus</i> (17)	-		-		2	11,7	-	
<i>S.capitis</i> (13)	-		-		3	23,1	-	
<i>S.intermedius</i> (13)	-		-		3	23,1	1	7,7
<i>S.haemolyticus</i> (9)	-		-		1	11,1	1	11,1
<i>S.epidermidis</i> (7)	-		-		2	28,5	-	
<i>S.auricularis</i> (6)	-		-		2	33,3	-	
<i>S.hyicus</i> (4)	-		-		-		1	25
<i>S.warneri</i> (3)	-		-		-		-	
<i>S.saprophyticus</i> (1)	1		-		1		-	

Çizelge 4.38 Dana kıyma örneklerinden izole edilen mikrotitre plak yöntemi ile biyofilm (+) ve biyofilm (-) Stafilocokların çeşitli antibiyotiklere dirençlilikleri ve yüzde dağılımları

Antibiyotik çeşitleri	Biyofilm pozitif (n: 56)						Biyofilm negatif					
	Dirençli		Orta dirençli		Duyarlı		Dirençli		Orta dirençli		Duyarlı	
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
Ampisilin	11	19,6	-	-	45	80,4	-	-	-	-	-	-
Eritromisin	9	16,1	12	21,4	35	62,5	-	-	-	-	-	-
Gentamisin	3	5,4	2	3,6	51	91	-	-	-	-	-	-
Kloromfenikol	1	1,8	-	-	55	98,2	-	-	-	-	-	-
Metisilin	4	7,1	-	-	52	92,9	-	-	-	-	-	-
Amikasin	3	5,4	1	1,8	52	92,8	-	-	-	-	-	-
Vankomisin	-	-	2	3,6	54	96,4	-	-	-	-	-	-
Tetrasiklin	18	32,1	1	1,8	37	66,1	-	-	-	-	-	-
Klindamisin	1	1,8	16	28,6	39	69,6	-	-	-	-	-	-

n: Suş sayısı

Çizelge 4.38’de dana kıyma örneklerinden izole edilen stafilocok türlerinin biyofilm oluşumları ve antibiyotiklere olan dirençlilikleri verilmiştir. Bu yöntemle göre biyofilm oluşturmayan Stafilocok tespit edilmemiştir. Çizelge 4.38’e göre biyofilm pozitif türlerin 18’i (%32,1) tetrasiklin’e, 11’i (%19,6) ampisilin’e, 9’u (%16,1) eritromisin’e, 4’ü (%7,1) metisilin’e, 3’ü (%5,4) gentamisin’e, 1’i (%1,8) kloromfenikole’e ve 1’i (%1,8) klindamisin’e dirençli olarak tespit edilmiştir. Biyofilm pozitif türlerin hiç birisinde vankomisin antibiyotigine direnç tespit edilmemiştir.

Çizelge 4.39 Tavuk But örneklerinden izole edilen, mikrotitre plak yöntemi ile biyofilm (+) ve biyofilm (-) Stafilocokların çeşitli antibiyotiklere dirençlilikleri ve yüzde dağılımları

Antibiyotik çeşitleri	Biyofilm pozitif (n:36)						Biyofilm negatif (n:8)					
	Dirençli		Orta dirençli		Duyarlı		Dirençli		Orta dirençli		Duyarlı	
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
Ampisilin	6	16,7	6	16,7	24	66,6	1	12,5	1	12,5	6	75
Eritromisin	12	33,3	-	-	24	66,6	5	62,5	-	-	3	37,5
Gentamisin	3	8,3	4	11,1	29	80,6	-	-	-	-	8	100
Kloromfenikol	4	11,1	-	-	32	88,9	-	-	-	-	8	100
Metisilin	16	44,4	-	-	20	55,6	-	-	1	12,5	7	87,5
Amikasin	1	2,8	-	-	35	97,2	-	-	-	-	8	100
Vankomisin	-	-	1	2,8	35	97,2	-	-	1	12,5	7	87,5
Tetrasiklin	34	94,4	-	-	2	5,6	-	-	-	-	8	100
Klindamisin	-	-	6	16,7	30	83,3	-	-	1	12,5	7	87,5

n: suş sayısı

Çizelge 4.39’da tavuk but örneklerinden izole edilen 44 Stafilocok suşunun biyofilm oluşumları ve antibiyotiklere olan dirençlilikleri verilmiştir. Çizelge 4.39’a göre biyofilm pozitif türlerin 34’ü (%94,4) tetrasiklin’e, 16’sı (%44,4) metisilin’e, 12’si (%33,3) eritromisin’e, 6’sı (%16,7) ampisilin’e, 4’ü (%911,1) kloromfenikol’e 3’ü (%68,3) gentamisin’e ve 1’i (%2,8) amikasin’e dirençli olarak tespit edilirken biyofilm pozitif örneklerin hiçbirisinde vankomisin ve klindamisin antibiyotiklerine direnç gözlenmemiştir. Biyofilm negatif örneklerin ise, 5’i (%62,5) eritromisin ‘e, 1’i (%12,5) ampisilin’e dirençli olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.40 Çiğ süt örneklerinden izole edilen, mikrotitre plak yöntemi ile biyofilm (+) ve biyofilm (-) stafilokokların çeşitli antibiyotiklere dirençlilikleri ve yüzde dağılımları

Antibiyotik çeşitleri	Biyofilm pozitif (n:26)						Biyofilm negatif (n:18)					
	Dirençli		Orta dirençli		Duyarlı		Dirençli		Orta dirençli		Duyarlı	
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
Ampisilin	10	38,5	5	19,2	11	42,3	3	16,7	-	-	15	83,3
Eritromisin	-	-	-	-	26	100	1	5,6	2	11,1	15	83,3
Gentamisin	-	-	-	-	26	100	1	5,6	1	5,6	16	88,8
Kloromfenikol	3	11,5	2	7,7	21	80,8	-	-	-	-	18	100
Metisilin	6	23,1	2	7,7	18	69,2	-	-	2	11,1	16	88,8
Amikasin	-	-	1	3,8	25	96,2	1	5,6	1	5,6	16	88,8
Vankomisin	-	-	-	-	26	100	-	-	-	-	18	100
Tetrasiklin	1	3,8	1	3,8	24	92,4	-	-	1	5,6	17	94,4
Klindamisin	2	7,7	2	7,7	22	84,6	3	16,7	6	33,3	9	50

n: Suş sayısı

Çizelge 4.40'da çiğ süt örneklerinden izole edilen Stafilokok suşlarının biyofilm oluşumları ve antibiyotiklere olan dirençlilikleri verilmiştir. Çizelge 4.40'a göre biyofilm pozitif türlerin 10'u (%38,5) ampisilin'e, 6'sı (%23,1) metisilin'e 3'ü (%11,5) kloromfenikol'e, 2'si (% 7,7) klindamisin'e ve 1'i (%3,8) tetrasiklin'e dirençli olarak tespit edilmiştir. Biyofilm negatif örneklerin ise; 3'ü (%16,7) klindamisin'e, 3'ü (%16,7) ampisilin'e, 1'i (%5,6) eritromisin'e, 1'i (%5,6) gentamisin'e ve 1'i (%5,6) amikasin'e dirençli olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.41 Dondurma örneklerinden izole edilen Stafilocokların Biyofilm oluşumu ve antibiyotik dirençliliğinin karşılaştırılması

Antibiyotik çeşitleri	Biyofilm pozitif (n:29)						Biyofilm negatif (n:7)					
	Dirençli		Orta dirençli		Duyarlı		Dirençli		Orta dirençli		Duyarlı	
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
Ampisilin	20	69	5	17,2	4	13,8	6	85,7	-	-	1	14,3
Eritromisin	11	38	3	10,3	15	51,7	1	14,3	1	14,3	5	71,4
Gentamisin	3	10,3	6	20,7	20	69	1	14,3	-	-	6	85,7
Kloromfenikol	5	17,2	5	17,2	19	65,5	1	14,3	1	14,3	5	71,4
Metisilin	9	31	-	-	20	69	3	42,8	-	-	4	57,1
Amikasin	-	-	-	-	29	100	-	-	-	-	7	100
Vankomisin	-	-	-	-	29	100	-	-	-	-	7	100
Tetrasiklin	1	3,5	6	20,7	22	75,8	1	14,3	-	-	6	85,7
Klindamisin	-	-	-	-	29	100	-	-	-	-	7	100

n: Suş sayısı

Çizelge 4.41’de Dondurma örneklerinden izole edilen Stafilocok suşlarının biyofilm oluşumları ve antibiyotiklere olan dirençlilikleri verilmiştir. Çizelge 4.41’e göre biyofilm pozitif türlerin, 20’si (%69) ampisilin’e, 11’i (%38) eritromisin’e, 9’u (%31) metisilin’e, 3’ü (%10,3) gentamisin’e ve 1’i (%3,5) tetrasiklin’e dirençli olarak tespit edilmiştir. Biyofilm negatif örneklerin ise, 6’sı (%85,7) ampisilin’e, 3’ü 3’ü(%42,8) metisilin’e, 1’i (%14,3) eritromisin’e, 1’i(%14,3) gentamisin’e, 1’i (%14,3) kloromfenikol’e ve 1’i (%14,3) tetrasiklin’e dirençli olarak saptanmıştır.

Çizelge 4.42 Peynir örneklerinden izole edilen Stafilocokların Biyofilm oluşumu ve antibiyotik dirençliliğinin karşılaştırılması

Antibiyotik çeşitleri	Biyofilm pozitif (n:14)						Biyofilm negatif (n:15)					
	Dirençli		Orta dirençli		Duyarlı		Dirençli		Orta dirençli		Duyarlı	
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
Ampisilin	7	50	-	-	7	50	5	33,3	-	-	10	66,7
Eritromisin	2	14,3	6	42,9	12	85,7	4	26,7	-	-	11	73,3
Gentamisin	2	14,3	4	28,5	10	71,4	2	13,3	2	13,3	11	73,3
Kloromfenikol	-	-	2	14,3	12	85,7	2	13,3	1	6,7	12	80
Metisilin	9	64,3	1	7,1	4	28,5	3	20	3	20	9	60
Amikasin	-	-	1	7,1	13	92,8	-	-	-	-	15	100
Vankomisin	-	-	-	-	14	100	-	-	-	-	15	100
Tetrasiklin	-	-	-	-	14	100	1	6,7	-	-	14	93,3
Klindamisin	1	7,1	6	42,9	7	50	1	6,7	3	20	11	73,3

n: Suş sayısı

Çizelge 4.42’de Peynir örneklerinden izole edilen Stafilocok suşlarının biyofilm oluşumları ve antibiyotiklere olan dirençlilikleri verilmiştir. Çizelge 4.42’ye göre biyofilm pozitif türlerin, 9’u (%64,3) metisilin’e, 7’si (%50) ampisilin’e, 2’si (%14,3) eritromisin’e ve 1’i (%7,1) klindamisin’e dirençli olarak tespit edilmiştir. Biyofilm negatif Stafilocokların ise; 5’i (%33,3) ampisilin’e, 4’ü (%26,7) eritromisin’e, 3’ü (%20) metisilin’e, 2’si (%13,3) gentamisin’e, 2’si (%13,3) kloromfenikol’e, 1’i (%6,7) tetrasiklin’e ve 1’i (%36,7) klindamisin’e dirençli olarak bulunmuştur.

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Primer rezervuarları insan ve hayvanların deri ve mukoz membranları olmasına rağmen stafilokoklar doğada çok yaygındırlar. Toprak, hava ve su gibi çevresel kaynaklardan da izole edilebildikleri gibi birçok gıda da bulunabilirler [İrlinger ,2008].

İnsanların tüketimi için hazırlanan gıda ürünlerinde stafilokokların bulunması ,bazı suşlarının gıda intoksikasyonlarına sebep olması bakımından gıda endüstrisi için önem taşır.

Araştırmamızda toplam 280 gıda örneğinin 209'unun (%76,4) stafilokok suşları ile kontamine olduğu tespit edilmiştir. (Çizelge 4.1.)

Bakteriyel besin zehirlenmelerinin en sık görüleni *S.aureus* 'ların neden olduğu besin zehirlenmeleridir. Hastalık *S.aureus*'un bir toksijenik suşu tarafından oluşturulan ısıya duyarlı enterotoksin-B ve diğer enterotoksinlerle kontamine gıdaların yenilmesi sonucu ortaya çıkar. Bu mikroorganizmalar genellikle gıdayı hazırlayan kişiden de izole edilmektedir. Uygun olmayan koşullarda saklanmış, işlenmiş et, dondurma, kremalı tatlı, konserve gıdalar gibi gıdalar bulaşmaya yol açar. Gıda endüstrisinde, KPS'lar genel olarak grup düzeyinde tanımlanır. Bu grubun enterotoksijenik üyesi *S.aureus* olmasına rağmen yapılan bazı çalışmalarda diğer KPS türleri olan *S.hyicus* ve *S.intermedius*'un da stafilokokal enterotoksinler üretebildiğini göstermiştir [Gablanski ve Bohach, 1997].

Gıdalarda KPS'lerin tanımlanması ayrıca gıdaların özellikle insan kaynaklı potansiyel patojenik suşlar tarafından kontaminasyon derecesinin etkili bir indikatörüdür [Desmarchelier et al. ,1999].

Araştırmamızda 209 Stafilokok suşunun 34'ü (%16,3) KPS olarak tespit edilmiş ve bu KPS'lerinde 17'si (%50) *S.aureus*, 13'ü (% 38,2) *S.intermedius* ve 4'ü (%11,6) *S.hyicus* olarak bulunmuştur. (çizelge 4.2, çizelge 4.3.)

Gıdaların *S.aureus* ile kontaminasyonu kötü hijyen koşullarının veya çapraz kontaminasyonun bir göstergesidir. KNS'ler uzun zamandır kommensal veya kontaminant olarak değerlendirilmelerine karşın insanlarda patojenik etkilerinin olduğu, çeşitli enfeksiyonlara sebep olduğu bildirilmektedir. KNS'lerin aynı zamanda hayvanlarda da hastalık oluşturduğu, infekte inek ve keçi meme bezlerinden izole edilebildiği vurgulanmaktadır. Ayrıca subklinik mastitis vakalarında ikinci derece patojen olarak kabul edilebilmekle birlikte akut mastitise sebep olmaktadır [Bedidi-Madani ve ark. ,1998].

KNS'lerin birçok suşu fermente et ve süt ürünlerinde proteoliz ve lipoliz aroma ve lezzet artırıcı özelliklerinden dolayı kullanılmaktadır. Örneğin *S.carnosus*, *S.xylosus* ve *S.equorum* peynir ve sosislerin fermentasyonunda kullanılan KNS türleridir [Irlenger, 2008]. Bu nedenle yapılan birçok araştırma KNS türlerinin fermente süt ve et ürünlerinden izolasyonuna yöneliktir.

Araştırmamızda 280 gıda örneğinden izole edilen 209 Stafilokok suşunun 175'i (%83,7) KNS olarak tanımlanmıştır. KNS'lerin 46'sı (%26,3) *S.cohnii*, 36'sı (%20,6) *S.xylosus*, 34'ü (%19,4) *S.hominis*, 20'si (%11,4) *S.simülans*, 13'ü (%7,4) *S.capitis*, 9'u (%5,1) *S.haemolyticus*, 7'si (%4) *S.epidermidis*, 6'sı (%2,8) *S.auricularis*, 3'ü (%1,7) *S.warneri* ve 1'i (%0,6) *S.saprophyticus* olarak bulunmuştur. (Çizelge 4.4.)

Araştırma sonuçlarımız et ve süt ürünlerine KNS kontaminasyonunun oldukça fazla olduğunu göstermektedir. İzole edilen KNS suşları patojenik veya enterotoksijenik olabilir. Çünkü; *S.capitis*, *S.cohnii*, *S.epidermidis*, *S.haemolyticus*, *S.hyicus* veya *S.xylosus* gibi KNS suşlarının enterotoksin üretebildiğine ait çalışmalar bulunmaktadır [Udo ve ark. 1999, Zell 2008].

Diğer taraftan, bazı araştırmalarda ise süt ve et ürünlerinden izole edilen hiç bir KNS türünün bu gıdaların tüketilmesinden sonra insanlarda gıda zehirlenmesine yol açmadığı belirtilmektedir. KNS'lerin patojenitelerinin dışında bu suşların güvenilirliği açısından bilinmesi gereken en önemli kriter aktarılabilen antibiyotik direnç markırlarının bulunmasıdır. Tıpkı klinik izolatlar gibi gıdalardan izole edilen KNS'lerin de bir veya daha fazla antibiyotiğe direnç gösterdiği, bu şekilde antibiyotik direnç genlerinin yayılmasında önemli rolü olduğu unutulmamalıdır.

Resch ve arkadaşları (2008) yaptıkları çalışmada peynir, sosis, fermente balık, et gibi çeşitli gıdalardan toplam 330 koagülaz negatif stafilokokus izole etmişlerdir. İzolatların 137'si *S.xylosus*, 106'sı *S.carnosus*, 64'ü *S.equorum*, 11'i *S.piscifermantans*, 10'u *S.succinus* ve 2'si *S.condimenti* olarak tespit edilmiştir [Resch ve ark.,2008].Yapılan bu çalışmadaki *S. xylosus* sayısı bizim çalışmamızdan bir hayli fazladır.

Zell ve arkadaşları (2008), çalışmalarında çeşitli gıdalardan, starter kültürlerden ve klinik örneklerden 330 koagülaz negatif stafilokok izole etmişlerdir. İzolatların 106'sı *S. carnosus*, 2'si *S. condimenti*, 64'ü *S. equorum*, 10'u *S. succinus*, 11'i *S. pisci fermentans* ve 137'si *S. xylosus*'tur. Yapılan bu araştırmada, bizim araştırmamızda izole edilen KNS türlerinin dışında, farklı KNS suşları tanımlanmış olup sadece *S. xylosus* bulunma sıklığı sonuçlarımızdan yüksek olarak tespit edilmiştir [Zell ve ark.,2008].

Coton ve arkadaşları (2009), yaptıkları çalışmada peynirden 227, sosisten 204 ve klinik KNS izole etmişlerdir. Gıda örneklerindeki suşların %28.5'i *Staphylococcus equorum*, %28.3 *S. xylosus*, %12,5 *S. saprophyticus* ve %7,7'si *S. succinus* olarak tanımlanmıştır. Yapılan bu araştırmada, bizim araştırmamızda izole edilen KNS suşlarının dışında, farklı KNS suşları tanımlanmış olup *S. xylosus* ve *S. saprophyticus* bulunma sıklığı sonuçlarımızdan yüksek olarak tespit edilmiştir [Coton ve ark., 2009].

Bedidi-Madani ve arkadaşları (1998) Fransa'daki keçi sütlerinden 165 KNS izole etmişlerdir. Suşlardan 91'i *S. caprae*, 36'sı *S. xylosus*, 11'i *S. simulans*, 10'u *S. warneri*, 4'ü *S. chromogenes*, 3'ü *S. capitis*, 3'ü *S. gallinarum*, 2'si *S. cohnii*, 1'i *S. epidermidis*, 1'i *S. hominis*, 1'i *S. lugdunensis*, 2'si *Staphylococcus spp.* olarak tanımlanmıştır [Bedidi-Madani ve ark.1998]. Yapılan bu araştırmada, bizim araştırmamızda izole edilen KNS suşlarının dışında, farklı KNS suşları tanımlanmış olup *S.xylosus*, *S.simulans* ve *S.epidermidis* bulunma sıklıkları çalışmamızla yaklaşık değerler göstermiş, *S.warneri* bulunma sıklığı sonuçlarımızdan yüksek olarak tespit edilmişken, *S.capitis*, *s.cohnii* ve *S.hominis* bulunma yüzdesi sonuçlarımızdan daha düşüktür.

Honkannen ve arkadaşları (1994), mastitili sütlerden izole ettikleri 168 KNS suşundan en sık izole ettikleri suşların *S. hyicus*, *S. epidermidis* ve *S. chromogenes* olduğunu belirtmektedirler. Araştırmacılar suşları API STAPH (Biomerieux) sistemini kullanarak tanımlamışlardır. Tanımlanan KNS izolatları içerisinde, *S. hyicus* (%26,8), *S. epidermidis* (%12,5), *S. chromogenes* (%3), *S. xylosus* (%2,4), *S. warneri* (%1,8), *S. hominis* (%1,8) ve *S. haemolyticus* (%0,6) oranında tespit edilmiştir. Honkannen ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışma sonuçlarına göre *S.warneri* bulunma sıklığı çalışmamıza paralellik göstermiş ,ancak bu çalışmadaki *S.epidermidis* ve *S.hyicus* 'un bulunma yüzdesi sonuçlarımızdan yüksektir. [Honkannen ve ark.,1994].

Rampone ve arkadaşları (1993) Arjantin'de yaptıkları çalışmada mastitisli sığırlardan elde edilen 17 süt örneğinden 233 stafilokok izole edilmiştir. Bu 233 suşun 90'ı (%35,8) *S. aureus*, 48'i (%20,5) *S. cohnii*, 22'si (%9,4) *S. hominis*, 21'i (%9) *S. warneri*, 12'si (%5,2) *S. chromogenes*, 7'si (%3) *S. sciuri* , 6'sı (%2,6) *S. xylosus*, 5'i (%2,2) *S. capitis*, 6'sı (%2,6) *S. epidermidis*, 3'ü (%1,3) *S. intermedius*, 3'ü (%1,3) *S. saprophyticus* ve 3'ü (%1,3) *S. hyicius* olarak tanımlamışlardır. Bu çalışmada *S.cohnii* *S.epidermidis*, *S.saprophyticus* ve *S. hyicus* bulunma sıklığı çalışmamıza paralellik gösterirken, *S.aureus* ve *S.warneri* bulunma sıklığı

sonuçlarımızdan yüksek *S.hominis*, *S.xylosus*, *S.capitis* ve *S.intermedius* bulunma sıklıkları ise daha düşüktür [Rampone ve ark.,1993].

Gürtürk ve arkadaşları (1998), Van ve çevresindeki çeşitli işletmelerde yetiştirilen 650 inekten alınan 255 süt numunesinde 105 (%41) stafilokok türü izole etmiştir. Aynı çalışmada, izole edilen stafilokoklardan 65'i (%25,39) *S. aureus*, 9'u (%3,5) *S. haemolyticus*, 8'i (%3,12) *S. intermedius*, 8'i (%3,12) *S. warneri*, 8'i (%3,12) *S. saprophyticus* ve 7'si (%2.73) ise *S. epidermidis* olarak tiplendirilmiştir [Gürtürk ve ark.,1998]. Gürtürk ve arkadaşlarının araştırmalarında *S.haemolyticus* ve *S.epidermidis* türlerinin bulunma sıklığı çalışmamızla paralellik göstermektedir. *S.aureus*, *S. warneri* ve *S.saprophyticus* oranı çalışmamızdan yüksek, *S.internmedius* oranı ise daha düşüktür.

Araştırmamızda en yüksek sayıda stafilokok suşları sırası ile dana kıyma (%100), tavuk but (78,5), çiğ süt (%78,5), dondurma (%64,3) ve beyaz peynir (%51,8) örneklerinden izole edilmiştir. (Çizelge 4.1.)

Çiğ süt ve çiğ et ürünleri yeterli ısıtma ve pişirme işlemleri uygulandığında genel olarak halk sağlığı açısından düşük risk taşırlar. Oysaki dondurma ve peynir gibi gıdalarda stafilokokların bulunması hem üretim sonrası bir kontaminasyonu göstermesi hem de halk sağlığı açısından risk taşıması bakımından önemlidir.

Ülkemizde satışa sunulan dondurmalar ve peynirler genellikle pastörize sütlerden yapılmaktadır. Pastörizasyon ile birçok mikroorganizma yok edilmesine rağmen pastörizasyon sonrasında ilave edilen katkı maddeleri veya uygun olmayan depolama ve satış koşulları nedeniyle mikroorganizmalar ve potansiyel riskleri mevcut kalabilir.

Stafilokokal enterotoksinler gıdalarla ilişkili hastalıkların başlıca sebebi olmasına rağmen biyofilm oluşumu stafilokokların patojenitesine katkı sağlayabilmektedir.

Gıda endüstrisinde bakteriyel biyofilmler arzu edilmeyen hijyenik ve güvenlik problemleri oluşturabilir. Biyofilm oluşturan bakteriler bozulmaya neden olan ve patojen bakterilerin sürekli olarak gıdalara bulaşmasına kaynak olabilirler.

Çalışmamızda biyofilm oluşumu kongo kırmızılı agar (CRA) ve mikrotitre plak yöntemiyle değerlendirilmiştir. 280 gıda örneğinden izole edilen 209 Stafilokok suşunun 84'ü (%40.2) CRA pozitif, 125'i (%59.8) CRA negatif sonuç vermişken , mikrotitre plak yönteminde 162 (%77.5) biyofilm pozitif ,47 (%22.5) biyofilm negatif olarak tespit edilmiştir. (Çizege 4.24.)

Çalışmamızda izole edilen 17 *S.aureus* suşunun 10 'u (%58.8) hem CRA hem de mikrotitre plak yönteminde pozitif sonuç vermiştir. Tanımlanan 4 *S.hyicus* türünün 3'ü (%75) CRA pozitif sonuç verirken, mikrotitre plak yönteminde 1'i (25) biyofilm pozitif sonuç vermiştir. 13 *S.intermedius* türünün 6'sı (%46.2) CRA pozitif sonuç verirken, mikropalak yönteminde 7'si (%53.8) pozitif sonuç vermiştir. 175 KNS türünün 65'i (%37.1) CRA pozitif sonuç vermişken 144'ü (%82.3) mikrotitre plak yönteminde pozitif sonuç vermiştir.

Oliveira ve arkadaşları (2006) subklinik inek mastitislerinden izole ettikleri 16 *S. aureus* suşunun CRA yöntemi ile 6 (%37.5)'sını, MP yöntemi ile 3 (%18.75)'ünü biyofilm oluşturma yetenekleri yönünden pozitif bulmuşlardır [Oliveira ve ark. 2006]. Oliveira ve arkadaşlarının çalışmalarında *S.aureus*'un biyofilm oluşturma sonuçları çalışmamızın sonuçlarından düşük olarak tespit edilmiştir.

Vasudevan ve arkadaşları (2003) mastitisli inek sütlerinden izole edilen 35 *S. aureus* suşunun CRA yöntemi ile 32 (%91.4)'sini ve MP yöntemi ile 24 (%68.6)'ünü biyofilm üretimi yönünden pozitif bulmuşlardır [Vasudevan ve ark. 2003]. Vasudevan ve arkadaşlarının CRA ve MP yönteminde biyofilm oluşumu yönündeki sonuçların yüksek olması çalışmamıza paralellik göstermiştir.

Stafilokoklarda biyofilm üretiminin tespit edilmesinde CRA yönteminin çok daha spesifik olduğu bildirilmiştir. Vasudevan ve arkadaşları (2003), *icaA* ve *icaD* genleri yönünden pozitif olan 35 *S. aureus* suşunun 32'inde CRA yöntemi ile pozitiflik saptarken MP yöntemi 24'ünde pozitiflik saptamışlardır. Oliveira ve ark (2006) 16 *S. aureus* suşunu biyofilm üretimi yönünden CRA, MP ve FISH (fluorescent *in situ* hybridization) yöntemleri ile araştırmışlar ve MP ile %18.75'ini, %37.5'ini ise hem CRA yöntemi hem de FISH yöntemi ile pozitif sonuç verdiğini saptamışlardır.

Votava ve arkadaşları (1972) Kongo kırmızılı agar besiyerinde kan kültüründen izole edilen 32 *S.aureus* susunun 18'ini (%56.2) biyofilm pozitif degerlendirmistir [Votava ve ark. ,1972].

Baselga ve arkadaşları (1980) mastitli sığırlardan izole edilen 92 *S.aureus* suşunun 11'inde (%12) ve koyundan izole edilen 52 *S.aureus* suşunun 10'unda (%19) biyofilm üretimini göstermişlerdir Baselga ve ark. 1980]. Çalışma sonuçları, bizim çalışmamızdan düşük olarak tespit edilmiştir.

Ammendolia ve arkadaşları (1999), koagülaz pozitif stafilokokların %88,9'unda, Montanaro ve arkadaşları (1999), yaptıkları bir çalışmada izole ettikleri 35 *S. aureus* izolatının %83'ünde pozitif sonuç tespit etmişlerdir [Ammendolia ve ark., 1999; Montanora ve ark., 1999).. Sonuçlar bizim çalışmamızdan yüksek olarak saptanmıştır.

Rohde ve arkadaşları (2007), yaptıkları bir çalışmada izole ettikleri *S. aureus* suslarının %69,2'sinde, Turan (2005), süt ve süt ürünlerinden izole ettiği 110 *S. aureus* izolatının %52,7'sinde biyofilm pozitif sonuç tespit etmişlerdir [Rohde ve ark. ,2007; Turan, 2005].. Sonuçlar çalışmamızla paralellik göstermiştir.

Türkyılmaz ve arkadaşları (2006), hayvanlardan izole ettikleri 180 adet stafilokokun %61,1'inde biyofilm pozitif sonuç bulmuşlardır [Türkyılmaz ve ark.,2006].. Biyofilm pozitiflik yüzdeleri çalışmamızla paralellik göstermiştir.

Keskin ve arkadaşları (2003) mastisli ineklerin sütlerinden izole ettikleri 60 koagülaz (-) Stafilokokus suşunun %60'ını biyofilm pozitif bulmuşlardır [Keskin ve ark.,2003].Sonuçlar çalışmamızla paralellik göstermiştir.

Bedidi-Madini ve arkadaşlarının (1998) yaptıkları çalışmada keçi sütlerinden izole 165 koagülaz (-) stafilokoktan 70'i (%42) biyofilm pozitif olarak bulunmuştur [Bedidi-Madini ve ark.,1998]. Beddidi-Madini ve arkadaşlarının biyofilm pozitiflik yüzdesi çalışmamıza oranla daha düşük çıkmıştır.

Sea ve Kruze (1995), slime faktör ile ilgili yaptıkları bir çalışmada mastitis izolatu olan 190 KNS'un %10,5'inde biyofilm üretimini belirlemişlerdir [Sea ve <kruze, 1995]. Sea ve arkadaşlarının yapmış oldukları biyofilm oluşturma oranı çalışmamızdaki orandan daha düşük görülmektedir.

S. aureus'ların antibiyotiklere karşı gittikçe artan dirençlilikleri nedeniyle hastanelerde ve toplum kökenli enfeksiyonlarda büyük bir sağlık sorunu yaşanmaktadır [Aydın ve ark.,2001]. *S. aureus*'lar değişik antibiyotiklere değişik yollardan dirençli hale gelebilirler. Bu dirençlilikte genetik olarak çok yönlü olmaları ve bu direncin alt yapısının oluşumu da önemli rol oynarken; yüksek antibiyotik direnci tedavi başarısını azaltarak hastalarda mortalite, morbidite ve hastanede yatış süresinin artışına neden olmaktadır [Yakupogulları ve ark.,2006].

Araştırmamızda gıda örneklerinden izole edilen 209 stafilokok suşunun metisilin, ampisilin, klindamisin, eritromisin, kloromfenikol, gentamisin, vankomisin ve amikasin antibiyotiklerine dirençlilikleri araştırılmıştır.

B-laktamlar insan ve gıda elde edilen hayvanların enfeksiyon tedavisinde kullanılan önemli bir antibiyotik grubudur.

Araştırmamızda *S.aureus* ve diğer stafilokok suşlarının ampisilin'e yüksek oranda dirençlilik gösterdikleri tespit edilmiştir. (Çizelge 4.37.) 209 stafilokok suşunun 67'si (%32,1) ampisilin'e, 59'u (%28,2) tetrasiklin'e, 44'ü (%21,2) eritromisin'e, 40'ı (%19,1) metisilin'e, 16'sı (%7,7) amikasin'e, 16'sı (%7,7) kloromfenikol'e, 14'ü (%6,7) gentamisin'e, 10'u (%4,8) klindamisin'e dirençli bulunmuştur. Vankomisin'e herhangi bir direnç saptanmamıştır.

Nergiz ve arkadaşları (2007), yaptıkları çalışmada çeşitli klinik örneklerden 88 koagülaz negatif Stafilokok izole ve idenfiye etmişlerdir. Suşların metisiline ve vankomisine dirençlilikleri araştırılmıştır. Metisiline dirençli koagülaz negatif Stafilokokların tür dağılımı şöyledir; *Staphylococcus epidermidis* 35 (%40), *Staphylococcus hominis* 18 (%20), *Staphylococcus haemolyticus* 17 (%19), *Staphylococcus sciuri* 5 (%6), *Staphylococcus equorum* 4 (%5), *Staphylococcus capitis* 3 (%3), *Staphylococcus warneri* 2 (%2), diğer 4 (%5)'tür. Vankomisin direncine rastlanmamıştır[Nergiz ve ark.,2007]. Nergiz ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışma sonuçlarına göre, *S.hominis* ve *S.haemolyticus* türlerinin direnç sonuçları çalışmamızla paralellik gösterirken, *S.capitis* ve *S. warneri* sonuçları çalışmamızdan düşük, *S.epidermidis* sonuçları çalışmamızdan yüksek olarak bulunmuştur.

Türütoğlu ve arkadaşları (2006) Burdur yöresindeki mastitisli ineklerden aldıkları süt örneklerinden 13'ü *S.aureus*, 136'sı koagülaz negatif Stafilokok olmak üzere toplam 239 Stafilokok izole etmişlerdir. KNS suşlarının 85'i (%62,5) penisiline, 76'sı (%55,9) ampisiline, 31'i (%22,8) metisiline, 44 (%32,4) gentamisine ve 51'i (%37,5) trimethoprim-sulfametaksazole dirençli olarak saptanmıştır [Türütoğlu ve ark.,2006]. Metisilin direnç sonucu çalışmamızla paralellik gösterirken, ampisilin ve gentamisin direnç sonuçları çalışmamızdan yüksek tespit edilmiştir.

Altay ve arkadaşları (2003), araştırmalarında tavuk örneklerinden 120 Stafilokok izole etmişlerdir. 120 izolattan 74'ü koagülaz negatif stafilokoktur. Koagülaz negatif olarak izole edilen 74 suştan 16'sı *Staphylococcus simulans*, 11'i *Staphylococcus hyicus*, 8'i *Staphylococcus saprophyticus*, 6'sı *Staphylococcus epidermidis*, 4'ü

Staphylococcus schleiferi subsp. schleiferi, 4'ü *Staphylococcus arlettae*, 4'ü *Staphylococcus lentus*, 4'ü *Staphylococcus gallinarum*, 3'ü *Staphylococcus chromogenes*, 3'ü *Staphylococcus warneri*, 3'ü *Staphylococcus haemolyticus*, 2'si *Staphylococcus caprae*, 2'si *Staphylococcus auricularis*, 2'si *Staphylococcus xylosus* ve 2'si *Staphylococcus cohnii* olarak saptanmıştır. Antibiyotik duyarlılık testi sonucunda, 120 suşun %40,8'i eritromisin'e, % 37,5'i tetrasiklin'e, % 26,7'si ampisilin'e ve % 15,8'i gentamisin'e dirençli bulunmuştur [Altay ve ark.,2003]. Gentamisin ve eritromisin sonuçları çalışmamızla paralellik gösterirken, tetrasiklin ve ampisilin sonuçları çalışmamızdan yüksek tespit edilmiştir.

Aydın ve arkadaşları (2001), çeşitli klinik örneklerden 172 koagülaz negatif stafilokok izole ve idenfiye etmişlerdir. 172 koagülaz negatif stafilokoktan %84,2'si penisiline, %38,8'i metisiline, %54,8'i eritromisine ve % 44,4'ü klindamisine dirençli bulunmuştur. Vankomisin direncine rastlanmamıştır [Aydın ve ark.,2001]. Aydın ve arkadaşlarının yaptıkları bu çalışmada vankomisin direncinin görülmemesi çalışmamızla paralellik olduğunun göstergesidir. Fakat metisilin, eritromisin ve klindamisin dirençlilik oranları çalışmamızın sonuç yüzdelerinden daha yüksektir.

Simonova ve arkadaşları (2006), çalışmalarında geleneksek Slovak etlerinden stafilokok izole etmiş ve antibiyotik dirençlilik ve hassaslığını çalışmışlardır. İzole edilen suşların 119'u (%63,6) *Staphylococcus xylosus* ve 20'si (%10,7) *Staphylococcus carnosus*'tur. Çalışılan suşlar novobiosine, metisiline, ampisiline ve rifampisine %99 oranında duyarlı, linkomisin, amoksisilin, klindamisin ve tetrasikline ise %4 oranında dirençli çıkmıştır[Simonova ve ark.,2006]. Klinamisin direnç sonucu çalışmamızla paralellik gösterirken, tetrasiklin direnç sonucu çalışmamızdan düşük olarak tespit edilmiştir.

Morani ve arkadaşları 2004 yılında İtalya'da çiğ keçi sütlerinden izole ettikleri 70 koagülaz negatif stafilokokun (10 *Staphylococcus epidermidis*, 10 *Staphylococcus caprae*, 10 *Staphylococcus kloosii*, 10 *Staphylococcus ludgunensis*, 10 *Staphylococcus warneri*, 10 *Staphylococcus simulans*, 10 *Staphylococcus*

chromogenes) çeşitli antibiyotiklere (eritromisin, tilmikosin, kanamisin, tetrasiklin, sefoperazon, amoksisilin+klavulanikasit, kloksasiklin, benzilpenisilin, ve sefalonium) karşı dirençliliğini araştırmışlardır. Test ettikleri antibiyotiklerden eritromisin, tilmikosin, kanamisin ve tetrasikline karşı orta derecede direnç gösterdiklerini tespit etmişlerdir [Morani ve ark.,2004].

Resch ve arkadaşları (2008), yaptıkları çalışmada peynir, sosis, et, fermente balık gibi çeşitli gıdalardan izole ettikleri koagülaz negatif stafilokokların antibiyotik dirençliliklerini araştırmışlardır. Çeşitli gıdalardan toplam 330 koagülaz negatif stafilokok izole etmişlerdir. Suşların; 104'ü (%31,5) penisiline, 71'i (%21,5) ampisiline, 59'u (%17,9) tetrasikline, 35'i (%10,6) novobiosine ve 11'i (%3,3) eritromisine dirençli bulunmuştur [Resch ve ark.,2008]. Resch ve arkadaşlarının yapmış oldukları test sonuçlarındaki dirençlilik yüzdeleri bizim sonuçlarımıza göre daha düşük oranlarda gözükmemektedir .

Pesavento ve arkadaşları (2007), çiğ etlerden izole ettikleri 42 *S. aureus* suslarında tetrasikline karşı %8,3, direnç tespit ederken, vankomisine karşı direnç tespit edemediğini belirtmiştir [Pesavento ve ark.,2007]. Sonuçlar çalışmamızla paralellik göstermiştir.

Erksine ve arkadaşları (2002), Washington'da yaptıkları çalışmada, ineklerde mastitise neden olan *S. aureus* suslarının tetrasikline %8,5 dirençli bulduklarını belirtmişlerdir [Erksine ve ark.,2002]. Sonuç çalışmamızla paralel değerdedir.

Teale ve David (1999), 211 *S. aureus* suşunun %5'inin tetrasikline dirençli olarak bulmuşlardır [Teale ve David, 1999]. Sonuç çalışmamızdan düşük değerdedir.

Papadopoulou ve arkadaşları (1997), hayvanlardan izole ettikleri 80 adet *S. aureus* suslarının %6,25'inin seftriaksona, %17,5'inin eritromisine, %3,75'inin kloramfenikole, %62,5'inin penisiline dirençli bulurken, vankomisine karşı direnç

tespit etmemislerdir [Papadopoulou ve ark.,1997]. Eritromisin ve kloromfenikol diranç sonuçları çalışmamızdan yüksek değerde tespit edilmiştir.

Vautor ve arkadaşları (2006), koyun çiftliklerinde yaptıkları çalışmadan izole ettikleri 46 *S. aureus* susunun %4,3'ünü oksasiline, %8,7'si klindamisine, %8,7'si eritromisine, %8,7'si gentamisine, dirençli olarak bulmuşlardır [Vautor ve ark.,2006]. Eritromisin ve gentamisin direnç sonuçları çalışmamızla paralellik göstermektedir.

Altay ve arkadaşları (2003), tavuklardan izole ettikleri 120 stafilokok suşunun %40,8'inin eritromisine, %37,5'inin tetrasikline, %15,8'inin gentamisine dirençli olduklarını bulmuşlardır [Altay ve ark., 2003]. Sonuçlar çalışmamızdan yüksek değerde gözlenmiştir.

Boynukara ve arkadaşları (1998), hayvansal kaynaklı gıdalardan izole ve identifiye ettikleri 16 *S. aureus* susunun %25'inin eritromisine, %43,7'sinin tetrasikline, %81,2'sinin penisilin-G'ye dirençli olarak bulmuşlardır [Boynukara ve ark.,1998]. Eritromisin ve tetrasiklin sonuçları çalışmamızdan yüksek olarak gözlenmiştir.

Bizim sonuçlarımız ve diğer araştırmacıların sonuçları β -laktam antibiyotiklerine dirençlilikten sorumlu bla2 geninin Stafilokoklar arasında yaygın olarak bulunduğunu göstermektedir. *S.aureus* ve diğer KNS'ler deki metisilin/oksasilin direnci mecA geni tarafından kodlanan ve bilinen β -laktam antibiyotiklerine direnci sağlayan penisilin bağlayan protein 2a (PBP2a)'nın sentezine bağlıdır. mecA genine sahip stafilokoklar metisiline dirençli stafilokoklar olarak adlandırılırlar.

Son yıllarda yapılan çalışmalar metisilin'e dirençli stafilokokların kinolon ve makrolid grup antibiyotiklere aminoglikozitlere, tetrasiklin ve klindamisin'e direnç kazandığını göstermektedir. Araştırmamızda tetrasiklin'e *S.aureus* %11,7, *S.nitermedius* % 23,1, *S.cohnii* % 37, *S.xylosus* %27,8, *S.simülans* %65, *S.hominis* %14,7, *S.capitis* ve *S. intermedius* %23,1, *S.auricularis* %33,3, *S.saprophyticus*

%100, *S. epidermidis* %28,5 ve *S.haemiloyticus* %11,1 oranında dirençli bulunmuştur. (Çizelge 4.37.)

Aminoglikozidlerden gentamisin ve amikasin'e *S.aureus* 'lar %17,6, makrolidlerden eritromisin'e % 11,7 oranında direnç gösterirken, klindamisin'e ise direnç gözlenmemiştir. (Çizelge 4.37.)

Klinikte en sık kullanılan glikopeptit antibiyotik vankomisinidir. Vankomisin, gram pozitif bakterilerin hücre duvarı sentezini, peptidoglikan polimerlerinin Dalanin-D-alanin prekürsörlerine bağlanarak önlemektedir. Transglikozilaz ve transpeptidaz enzimlerinin hedeflerini bozarak inhibe eder. Ayrıca RNA sentezini bozabilir ve sitoplazmik membran permeabilitelerini değiştirerek protoplastlara zarar verebilir. Hedef organizmalara hızlıca ve sıkıca bağlanarak çoğalmakta olan bakteriler üzerinde bakterisidal etki gösterir. Gram negatif bakterilerin lipid membranından penetre olamadıkları için bu mikroorganizmalar üzerinde etkili değildir [Arman D,2000].

S.epidermidis vankomisine oldukça duyarlı olmasına rağmen biyofilm içindeki bakteri için aynı şeyi söylemek mümkün değildir. Vankomisinin molekül büyüklüğü bu azalmış duyarlılıktan sorumlu tutulmaktadır. Bazı çalışmalarda biyofilmin kendisinin glikopeptid aktivitesini azalttığı öne sürülmektedir [Cunha ,2005;Rachid ve ark.,2000].

Çalışmamızda 209 stafilokok suşunun; 46'sı *S.cohnii*, 36'sı *S.xylosus*, 34'ü *S.hominis*, 20'si *S.simülans*, 17'si *S.aureus*, 13'ü *S.capitis*, 13'ü *S.intermedius*, 9'u *S.haemolyticus*, 7'si *S.epidermidis*, 6'sı *S.auricularis* , 4'ü *S.hyicus*, 3'ü *S.warneri* ve 1'i *S.saprophyticus* olarak tanımlanmıştır. *S.cohnii* izolatlarının 11'i (%23.9) metisilin'e, 21'i(%45.7) ampisilin'e, 6'sı(%13) gentamisin'e, 15'i(%32.6) eritromisin'e, 7'si (%15.2) kloromfenikol'e, 17'si (%37) tetrasiklin'e ve 2'si (%4.3) klindamisin'e dirençli olarak tespit edilmiştir. *S.xylosus* suşlarının; 5'i (%13.9) ampisilin'e, 10'u(%27.8) amikasin'e, 10'u(%27.8) tetrasiklin'e, 3'ü(%8.3) eritromisin'e ve 1'i (%1.8) kloromfenikole dirençli tespit edilmiştir. *S.hominis*

suşlarının 12'si (%35.3) ampisilin'e, 8'i (%23.5) metisilin'e, 6'sı (%17.6) eritromisin'e, 5 'i (%14.7) tetrasikline, 5'i (%14.7) klindamisin'e, 1'i (%2.9) gentamisin'e ve 1'i (%2.9) amikasin'e dirençli olarak tespit edilmiştir. *S.simulans* suşlarının 13'ü (%65) tetrasikline, 9'u (%45) eritromisine, 5'i (%25) kloromfenikole, 4'ü (%20) ampisiline, 3'ü (%15) metisiline ve 2'si (%10) gentamisine dirençli olarak tespit edilmiştir. *S.aureus* suşlarının 10'u (% 58.8) ampisiline, 5'i (%29.8) metisiline, 3'ü (%17.6) amikasin'e, 3'ü (%17.6) gentamisine, 2'si (%11.7) eritromisine ve 2'si (%11.7) tetrasikline dirençli olarak tespit edilmiştir. *S.capitis* suşlarının, 4'ü (%30.1) metisiline, 3'ü (%23.1) tetrasikline, 2'si (%15.4) eritromisine ve 1'i (%7.7) ampisiline dirençli olarak tespit edilmiştir. *S.intermedius* suşlarının 4'ü (%30.7) ampisiline, 3'ü (%23.1) tetrasikline, 2'si (%15.4) eritromisine, 1'i (%7.7) metisiline, 1'i (%7.7) gentamisine ve 1'i (%7.7) klindamisine dirençli olarak tespit edilmiştir. *S.haemolyticus* suşlarının 4'ü (%44.4) ampisiline, 2'si (%22.2) metisiline, 1'i (%11.1) eritromisine, 1'i (%11.1) tetrasikline ve 1'i (%11.1) klindamisine dirençli olarak tespit edilmiştir. *S.epidermidis* suşlarının 2'si (%28.5) ampisiline, 2'si (%28.5) metisiline, 2'si (%28.5) eritromisine, 2'si (%28.5) tetrasikline ve 1'i (%14.3) amikasin'e dirençli olarak tespit edilmiştir. *S.auricularis* suşlarının 2'si (%33.3) metisiline, 2'si (%33.3) tetrasikline ve 1'i (%16.6) gentamisine dirençli olarak tespit edilirken, *S.hyicus* suşlarının 1'i (%15) ampisiline, 1'i (%25) amikasin'e ve 1'i (%25) klindamisine dirençli olarak tespit edilmiştir. *S.warneri* suşunun 2'si (%66.6) ampisiline, 2'si (%66.6) eritromisine ve 1'i (%33.3) metisiline dirençli olarak tespit edilirken, *S.saprophyticus* suşlarının %100'ü metisilin, ampisilin, kloromfenikol ve tetrasiklin antibiyotiklerine dirençli olarak tespit edilmiştir.

(Çizelge 4.37.)

Vankomisin direncinin gözlenmemesi ülkemiz açısından sevindirici olup gıda sektöründe glikopeptid grubu antibiyotiklerin tedavi amaçlı kullanılmadığını açıklamaktadır .

2005 yılında Ankara'da yapılan çalışmada çiğ süt örneklerinde izole edilen 157 *S. aureus* suşunda en yüksek Penisilin %47 ve Ampisilin %43,3'le dirençli bulunurken;

gentamisin %21,6, Metsilin %21, Eritromisin %13,3, Tetrasiklin %12,7 değişen oranlarda dirençli bulurlarken, Siprofloksasin %1,9 ve Timetoprim/Sulfametaksozol %3,1'e en az dirençli olarak bulmuşlardır [Nohutçu Y,2005]. Metisilin direnç sonucu çalışmamızla paralellik gösterirken, ampisilin ve gentamisin dirençlilikleri çalışmamızdan yüksek, eritromisin ve tetrasiklin dirençlilikleri çalışmamızdan düşük olarak gözlenmiştir.

2006 yılında Ankara'da yapılan bir çalışmada araştırdıkları 148 adet *S. aureus* izolatlarının tamamını Vankomisin ve Teikoplanin duyarlı bulmuşlardır [Atlı O. 2007].Sonuç çalışmamızla paralel değerdedir.

Çetin ve arkadaşları (2004), Değerli ve ark. (2000), Yapmış oldukları bir çok araştırmada Teikoplaninin, Vankomisine eşdeğer etkinlikte olduğu, yan etkiler ve uygulama kolaylığı bakımından Vankomisine alternatif olabileceği göstermişlerdir [Çetin ve ark.,2004] .

Normanno ve arkadaşları (2007), hayvansal gıdalardan izole ettikleri 160 *S. aureus* suşunun %3,7'sini Metisiline dirençli olarak bulurken bu MRSA suşlarının hiçbirinde Gentamisin, Klindamisin, Eritromisin, Vankomisin ve Tetrasiklin direnci görülmemiştir [Normanno ve ark.,2004].. Metisilin direnci çalışmamızdan düşük değerde bulunmuştur.

Casey ve arkadaşları (2007), çeşitli örneklerden izole ettikleri 3687 *S. aureus* suşunda %40,1 Siprofloksasine, %50,4 Eritromisine, %10,1 Gentamisine, %38 Metisiline, %9,2 Tetrasikline direnç gösterirken Vankomisine karşı direnç saptamamışlardır [Casey ve ark.,2007]. Eritrimisin, tetrasiklin ve vankomisin dirençlilik sonuçları çalışmamızla paralellik gösterirken , metisilin direnç sonucu çalışmamızdan yüksek değerde gözlenmiştir.

Biyofilm oluşumunun iki klinik önemi vardır. Birincisi antibiyotiklere direnç kazanılmasıdır. Bakterinin biyofilm oluşturarak yüzeye yapışmış formu (sesile) ile

süspansiyon formu (planktonik) arasında antibiyotik duyarlılık farkının olduğu gösterilmiştir. Bakteriler antibiyotiklere MBK konsantrasyonlarının 1000 katına kadar direnç gösterebilmektedirler. Biyofilm oluşumunun antibiyotiklerin etkisini önleyici fonksiyonu olduğu bildirilmektedir. Biyofilm fenotipinin ikinci önemli özelliği ise konak immün hücrelerinden korunabilmesidir. Biyofilm bakteriyi fagositoz ve degranülasyondan korumaktadır. Kemotaksisi, nötrofillerin etkisini önlemekte ve lenfosit aktivitesini azaltmaktadır [Consteryon JW ve StewartPS 1999; Mah TFC and O'Toole GA,2001]. Biyofilmle ilişkili enfeksiyonların tedavisi gittikçe daha da sorun olmaktadır. Biyofilm içindeki bakterilerin antibiyotiklere dirençli davranışı planktonik formu ile arasındaki en önemli farkı oluşturmaktadır [Ceri ve ark.1999; Gilbert ve ark.,1999].

Çalışmamızda kullanılan dana kıyma örneklerinden izole edilen Stafilokok suşlarının hepsinde biyofilm oluşumu gözlenmiştir. Tavuk but, çiğ süt, dondurma ve peynir örneklerinden izole edilen suşların biyofilm oluşturanlarının, oluşturmayanlara oranla antibiyotiklere daha yüksek oranda direnç gösterdikleri sonucu gözlenmiştir.(Çizelge 4.38.- 4.42)

Doğada yaygın olarak yaşayan stafilokok türlerinin yetersiz hijyen koşulları ve çapraz kontaminasyon gibi nedenlerle gıdalara bulaşmaları söz konusudur. Araştırma sonuçlarımızda çeşitli stafilokok suşlarının gıdalara kontamine olabildiğini göstermiştir. Kommensal veya kontaminant olarak bilinen stafilokok türlerinin yapılan son çalışmalarla çeşitli enfeksiyonlara neden olduğunun gözlenmesi gıda hijyenin önemini giderek artırmıştır. Hijyenitenin az olması gıda endüstrisi açısından istenmeyen bir durum olan biyofilm oluşumunda sebebi olmaktadır. Biyofilm oluşturabilen bakteriler gıda bozulmalarına ve patojenik etkileri olan bazı bakterilerinde gıdalara kontaminasyonlarına sebep olmaktadır. Biyofilm oluşumu bakteriyi konak immün hücrelerinden ve antibiyotik etkilerinden koruduğu için toplum kökenli enfeksiyonlarda sağlık sorunlarına neden olmakta ve aktarılabilen direnç markırları yardımıyla da tedavi başarısını azaltmaktadır.

KAYNAKLAR

- Adessiyum, A. A., and Shehu, L.M., “Detection of Staphylocoagulase using pasmas from varius animals”, **Vet. Microbiol.**, 10:387-392 (1985).
- Akan, E., “Tıbbi mikrobiyoloji”, **Oba Kitapevi**, Ankara, 1-22 (1986).
- Akan, E., “*Staphylococcus*”, Tıbbi Mikrobiyoloji, **SarayYayınları**, 2.Basım. İzmir, 1-18 (1993).
- Akalın, E. “ Klinik Uygulamada Antibiyotikler ve Diğer Antimikrobiyal İlaçlar”, 1. Baskı, **Günel Kitabevleri**, Ankara, 83, (1994).
- Akan M,” *Staphylococcus* infeksiyonları”, Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar), **İlke Emek Yayınları**, Ankara, 238, (2006).
- Altay, G., Keskin, O., Akan, M., “ Tavuklardan izole edilen *Staphylococcus* suşlarının identifikasyonu ve bazı antibiyotiklere duyarlılıklarının belirlenmesi”, **Türk. J. Vet. Anim. Science**, 27: 595-600 (2003).
- Altuğ, Ö., Ergün, A., Denizli, N., Gökçen, S., Erturun, N., “Ege bölgesi mezbahanelerde tehlike analizi kritik kontrol noktası uygulamasında mikrobiyolojik kontrol”, **İzmir Vet. Kont.ve Arast. Enst. Müd. Dergisi**, 19:33 (1995).
- Ammendolia, M.G.,Di Rosa, R., Montanaro, L., Arciola, CR., Baldosarri, L. “Slime producation and expression of the slime-associated antigen by *Staphylococcal* clinical isolates.”, **J Clin Microbial**, 37: 3235-8 (1999).
- Amorena, B., Gracia, E., Monzon, M., Leiva, J., Oteiza, C., Perez, M., Alabart, .JL., Hernandez-Yago, J., “Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro.”, **J Antimicrob Chemother**, 44: 43-55. (1999)
- Anderl, J.N., Franklin, M.J., Stewart, P.S.,” Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin.”, **Antimicrob Agents Chemotherapy**, 44: 1251- 1256. (2000)
- Anderl, J.N., Zahler, J., Roe, F., Stewart, P.S., “Role of nutrient limitation and stationrymphase existance in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin.”, **Antimicrob Agents Chemother**, 47:1251-6 (2003)
- Anwar, H., Van-Biesen, T., Dasgupta, M., Lam, K., Costerton, J.W.,” Interaction of biofilm bacteria with antibiotics”, **Antimicrob Agents Chemother** ,33:1824-6 (1989)
- Anwar, H., Strap, J.L., Costerton, J.W., “Eradication of biofilm cells of *Staphylococcus aureus* with tobramycin and cephalexin”, **J Microbiol**, 38:618-625 (1992).

Arda, M., Minbay, A., Aydın, N., “Özel mikrobiyoloji”, *Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Yayınları*, Ankara, 386:284 (1982).

Arıdoğan, A., Atasever, L., Bal, Ç., “ Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotiklere dirençleri”, *Türk Mikrobiyoloji Cem Dergisi*, 34: 20-23 (2004).

Arman, D., “Vankomisin ve Diğer Glikopeptid Antibiyotikler”, In:Topçu AW,Söyletir G, Doganay M.” İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi”, *Nobel Tıp Kitabevleri* İstanbul: 252-257 (2002).

Arslan, H., “Hastane infeksiyonu etkeni olarak izole edilen *Staphylococcus aureus*’larda metisilin direncinin saptanması ve epidemiyoloji tiplendirme”,Uzmanlık Tezi, *Ank. Üniver. İnfek. Hasta. ve Kli. Bakte. A. B. D.*, Ankara, 54 (1995).

Atlı., O. “Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotik duyarlılığının incelenmesi”, Yüksek Lisans tezi, *Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*,35-64 (2007).

Aydın, N., Gültekin, B., Eyigör, M., Gürel, M., “Klinik örneklerimizden izole edilen stafilokokların antibiyotik direnci”, *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 2 (3): 21- 26 (2001).

Baker, J.S., Borman, M.A, Bouoreau, D.H., “ Evaluation of various rapid agglutination methods for the identification of *Staph. aureus*”, *J. Clin. Microbiol.*, 21: 726-729 (1985).

Bedidi-Madani, N., Greenland, T., Richard, Y., “ Exoprotein and slime production by coagulase-negative *Staphylococci* isolated from goats milk”, *Veterinary Microbiology*, 59: 39-145 (1998).

Bergdoll, M.S., “*Staphylococcal* food poisoning in foodborne disease.dean”, *O.C.e.d. Academic Press*, London, 85-106 (1990).

Bertolatti, D., O’Brien, F.G., Grubb, W.B., “ Characterization of drug-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from poultry processing plants in Western Australia”, *İnternational Journal of Environmental Health Research*, 13: 43-53 (2003).

Bilgehan, H.,” Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi”, 5. Baskı. Ankara, Barış Yayınları, *Fakülteler Kitabevi*, 212-240 (1993)

Bilgehan, H., “Klinik mikrobiyolojik tanı”, *Barış Yayınları*, İzmir, 3. Basım, 495-504 (2002).

Boynukara, B., Timurkan, H., Kuyucuoğlu, Y., “İnek sütlerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları üzerine bir araştırma”, **Veterinarium**, 2(3-4):13-16 (1991).

Boynukara, B., “İnsan ve sığır orjinli *S. aureus* suşlarının çeşitli biyokimyasal özellikleri ile antibiyotiklere duyarlılıklarının karşılaştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, **Yüzüncüyıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, Van, 1- 50 (1998).

Brooks, J.D., Flint S.H. ., “Biofilms in the food industry: problem and potential solutions”, **International Journal of Food Science and Technology**, 43;2163-2176 (2008).

Brumfitt, W., “Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*”, Medical Progress, **The New England Journal of Medicine**, 1188-1196 (1989).

Cameron, C.M., “Immunity to *Staphylococcus aureus*”, **J. S. Afi. Vet. Med. Ass.**, 34: 363-380 (1963).

Caner, H., “Ankara Hastanesi personelinde nazal *Staphylococcus aureus* taşıyıcılığı”, Uzmanlık Tezi, **Ankara Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği**, 1-38 (1998).

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

Casey, A.L., Lambert, P.A., Elliott, T. S.J., “ *Staphylococci*”, **International Journal of Antimicrobial Agents 29 Suppl.**, 3: 23-32 (2007).

Centurbi, O.N.P., Cuadrada, A.M.A., Alcaraz, L.E., Laciari, A.L., Milan, M.C., “Prevalance of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in the dairies of San Luis city”, **Revista Argentina de Microbiol**, 24: 2, 73-80 (1992).

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**, 37, 1771-1776 (1999)

Consterton, J.W., Lewondowski, Z., Coldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scoott, H.M., “Microbial biofilms” ,**Annu Rev.Mikrobia**; 49:711-45(1995).

Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., “Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections.” , **Science**; 284: 5427–5433 (1999).

Coton, E., Desmonts, M.H., Leroy, S., Coton, M., Jamet, E., Christieans, S., Donnio, P.Y., Lebert, I., Talon, R., “Biodiversity of Coagulase-Negative Staphylococci in French cheeses, dryfermented sausages, processing environments and clinical samples”, **International Journal of Food Microbiology**, (2009)

Cunha, B.A., “Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: clinical manifestations and antimicrobial therapy”, *Clin Microbiol Infect Dis* ; 11: 33-42 (2005).

Çetin, B. D., Özcan, N., Oktar, M., Gündüz, A., Gül, M., “Yara örneklerinde izole edilen stafilokok suşlarının çeşitli antibiyotiklere direncin azalması”, *Şeh. Tıp Bülteni* 38(2): 45-47 (2004).

Çetinkaya, Y., Ünal, S., “Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* infeksiyonları”, *Epidemiyoloji ve kontrol. Flora Inf. Has. Klin. Mikrob. Derg.*, 1(3): 3-16 (1996).

Davey, M.E., O'toole, G.A., “Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics”, *Microbiol Mol Biol Rev*; 64: 847-867(2000).

Davies DG., Parsek MR., Pearson JP., Iglewski Bh., Constertan JW and Greenberg EP., “The involvement of cell to cell signals in the development of a bacterial biofilm” ,*Science*; 280: 295-8(1998).

Değerli, K., Özbakkaloğlu, B., Sürücüoğlu, S., Sezgin, C., Kurutepe, S., “Klinik örneklerden soyutlanan *Staphylococcus aureus* suşlarının çeşitli antimikrobiklere duyarlılıkları”, *İnfeksiyon Dergisi* 14(1): 87-90 (2000).

Denes A.R., Somers ,E.B., Wong,A.C.L., Denes, F.S. ,“Plasma-Aided Treatment of Surfaces Aganist Bacterial Attachment and Biofilm Deposition”, *US Patent*; 6,096,564 (2000),

Derebentli, Ş., “Stafilokoklarda antibiyotik direnci: 2003-2004 Türkiye haritası”, *Ankem Dergisi* 19 (Ek 2) : 54-60 (2005).

Devit, D., Vaudaux, P., Foster, T. J., “Genetic evidence that bound coagulase of *S.aureus* is not clumping factor”, *Infect Immun*, 60:1514 (1992).

Devriese, L.A., Davos, A., Beumer, J., Maes, R., “Characterization of staphylococci isolated from poultry”, *Poult. Science*, 11: 387-397 (1972).

Devriese, L.A., Davos, A., Beumer, Donlan RM., “Biofilms: Microbial life on surfaces”, *Emerg Infect Dis*; 8: 881-890(2002).

Dodd, C.E.R., Adams, B.W., Mead, G.C. Waites, W.M., “Use of plasmid profiles to detect changes in strains of *S.aureus* during poultry processing”, *J. App. Bacteriol.*, 63: 417-426 (1987).

Donlan, R.M., “Biofilms: Microbial life on surfaces” , *Emerg Infect Dis*; 8:881- 890 (2002).

Donlan, R.M., Costerton, J.W.,” Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms” ,*Clin Microbiol Rev*; 15: 167-193 (2002).

Duguid, I.G., Evans, E., Brown, M.R., Gilbert, P., "Growth-rate-independent killing by ciprofloxacin of biofilm-derived *Staphylococcus epidermidis*; evidence for cell-cycle dependency", *J Antimicrob chemother*;30:791-802 (1992).

Dunsmore, D.G., Twomey, W., Whittlestone, G., Morgan, H.W., "Desing and performance of systems for cleaning product contact surfaces of food equipment", *J.Food Prot*;44: 220-240 (1981).

Elder, M.J., Stapleton, F., Evans, E., Dart, J.K., "Biofilm-related infections in ophthalmology", *Eye*; 9: 102-109 (1995).

Elkins, J.G., Hassett, D.J., Stewart, P.S., Schweizer, H.P., McDermatt, T.R., "Protective role of catalase in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm resistance to hydrogen peroxide", *Appl Environ Microbial*; 65:4594-600 (1990).

Eng, R.H., Padberg, F.T., Smith, S.M., Tan, E.N., Cherubin, C.E., "Bactericidal effects of antibiotics on slowly growing and nongrowing bacteria", *Antimicrob Agents Chemother*; 35: 1824-1828 (1991).

Erksine, R.J., Walker, R.D., Bolin, C.A., Barlett D.G., " Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period", *J. Dairy Science*, 85: 1111-1118 (2002).

Evans, L.V. (Ed.), " Biofilms: Recent Advences in Their Study and control Singapore, Harwood", *Academic Publischer* (2000).

Faller, D., Schleifer, K.H., "Modifiedoxidase and benzidine test for separation of *staphylococci* and *micrococci*", *J. Clin. Microbiol*, 13(6): 1031-1035 (1981)

Farber BF, Kaplan MH and Clogston AG., "Staphylococcus epidermidis extracted slime inhibits the antimicrobial action of glycopeptide antibiotics", *J Infect Dis*; 161:37-40 (1990).

Federle, M.J., Bassler, B.L., "Interspecies communication in bacteris.", *J Clin Invest* ; 112:1291-9 (2003).

Forgren, A. Sjoquist I.J., "Protein-A from *Staphylococcus aureus* I.pseudoimmune reaction with human gama-Globulin", *J. Immunol.*, 97(6): 822-827 (1966).

Francis, P.G., Carroll, P. J., " Antibiotic resistance petterns of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical bovine mastitis", *Vet. Rec.*, 118: 361-363 (1986).

Fuqua, W.C., Winans, S.C., Greenberg, E.P., "Quorum sensing in bacteria;the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators" , *JBacteriol*; 176:269-75 (1994)

Fux, C.A., Consterton, J.W., Steward, P.S., Stoodley, P., "Survival strategies of infectious biofilms", *Trends Microbiol*;13:34-40 (2005).

Gemmel, C.G., "Coagulase-negative *staphylococci*", **J. Med. Microbiol.**, 22: 285-295 (1966).

Genigeorgis, C., Sadler, W.W., "Characterization of strains of *S.aureus* isolated from livers of commercially slaughtered poultry", **Poult. Science**, 45: 973-980 (1966).

Genigeorgis, C., "Problems associated with perishable processed meat", **Food Technol**, 4:140-154 (1986).

Georgopapadakou, N.H., "Antibiotic resistance in biofilms. In: Pace JL, Rupp M, and Finch RG. Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy. ", **Taylor & Francis Group NW**: 401-405 (2006).

Gibbs, P.A., Paterson, J.T. and Thompson, J.K., "Characterization of poultry isolates of *S.aureus* by a new set of poultry phages", **J. Appl. Bacteriol.**, 44: 387- 400 (1978).

Gibbs, P.A., Patterson, J.T. Thompson, J.K., "The distribution of *S.aureus* in a poultry processing plant", **J.Appl. Bacteriol**, 44: 401-410 (1978).

Gilbert, P., Das, J., Foley, I., "Biofilm susceptibility to antimicrobials.", **Adv Dent Res**;11: 160-167 (1997).

Götz, F., " *S.aureus* and Biofilms", **Mol Microbiol**; 43: 1367-1378 (2002).

Gürtürk, K., Boynukara, B., Ekin, İ., Gülhan, T., "Van ve yöresindeki ineklerde subklinik mastitisin etiyolojisi üzerine bir çalışma", **Yüzüncü Yıl Üniversitesi Vet. Fak. Derg.**, 9(1):1-4 (1998)

Güzel, A., "Tavuk etlerinin, kesim işleminin değişik aşamalarında *S. aureus* ile kontaminasyon derecesinin belirlenmesi", Doktora tezi **Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 1-50 (1998)

Hakenback R., Stock JB., "Analysis of two-component signal transduction systems involved in transcriptional regulation", **Methods Enzymol**, 273-300 (1996).

Halpin, M.I., Marth, E.H., " *Staphylococcus aureus*, Production of Extracellular Compounds and Behavior in Foods, A. Review", **J. Food Protect**, 52: 267-282 (1989).

Holah, J. And Kearney, L.R. " Introduction to biofilms in the food industry ". In Biofilm: Science and Technology ed. Melo, L.F., Bott, T.R., Fletcher, M. And Capdeville, B. pp. 35-41. Nato ASI Series . Dordrecht:, **Kluwer Academic Publishers** , 35-41 (2002).

Honkannen, T., Myllys, V., Pyörola, S., “Bovine clinical mastitis due to coagulase-negative staphylococci and their susceptibility to antimicrobials”, **J. Vet. Med. B.**,41:344-350 (1994)

Howard, B. J., Tilton, R. C., “ Antimicrobial susceptibility testing” , Clinical and Pathogenic microbiology, Howard, B.J.”, **The C.V. Mosby Company**, St. Louis, 121-156 (1987).

Hoyle, B.D., Costerton, J.W., “Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms”, **Prog Drug Res**; 37:91-10 (1991).

Irlinger F, “Safety assessment of dairy microorganisms:Coagulase-negative staphylococci “, **J. Food Microbiol**, 126 ;302–310 (2008)

İnternet: Universty of Wisconsin-Madison, “Plasma enhanced deposition of antibacterial layers to inhibit biofilm formation “, <http://www.wisc.edu> (erişim tarihi : 12.12.2002) (1999).

İnternet: Ankara Üniversitesi veteriner fakültesi,“Biyofilm ve gıda hijyeni yönünden önemi”, <http://www.vetgida.ankara.edu.tr/bilimsel>. Erişim tarihi: 22.11.2010 Koluman ,(2006)

İstanbuluoğlu, E., Diker, S., “Çesitli kaynaklardan izole edilen *staphylococcus* suslarının enzim karakterleri üzerine incelemeler”, **Ankara Üniversitesi Veerinerlik. Fakültesi Dergisi**, 30: 223-227 (1983).

Jang, C.H., Song, C-H., Wang, P-H., “ Topical vancomycin for chronic suppurative otitis media with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* otorrhoea”, **The Journal of Laryngology and Otology**, 118: 645-647 (2004).

Jasper, D.E., Infant, F., Dellinger J.D., “ Relationships among the results of coagulase, *staphylococcal* toxin and termonuclease tests on *staphylococci* from cow milk”, **J. Clin. Microbiol.**, 21(4): 582-584 (1985).

Jefferson KK., “What drives bacteria to produce a biofilm “ , **FEMS Microbial Lett**; 236: 163-73 (2004)

Jefferson KK., Pier DP., Goldman DA., and Pier GB ,”The teicoplanin-associated locus regulator (TcaR) and the intercellular adhesin locus regulator (Ica R) are transcriptional inhibitors of the ica locus in *Staphylococcus aureus*. ”, **J.Bacteriol** 186: 2449-56 (2004).

Jones, H.C., Roth, I.L, Saunders, W.M., “Electron microscopic study of a slime layer. ”, **J Bacteriol**; 99:316-25 (1969).

Kayser, H.F., “Meticillin and glicopetide resistance in *staphylococci*”, **Cur. Opin. Infect. Dis.**, 8:7 (1995).

Keskin, O., Altay, G., Akan, M., “Farklı hayvansal kaynaklardan izole edilen koagülaz negatif stafilokoklarda slime üretimi ve aderans”, *Türk J. Vet. Anim. Sci.*, 27: 253-257 (2003)

Kılıç, S., Beşirbellioğlu, B., Kılıç A., Pahsa A., “ Bir eğitim hastanesinde 2003- 2004 yıllarında saptanan metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* infeksiyonları” ,*Gülhane Tıp Dergisi*, 47: 195-198 (2005).

Kınık, Ö., Gönç, S., Akalın, A. S., “Çiğ sütte patojen mikroorganizmalar”, *Uluslar arası sütçülük Federasyonu (IDF) Yayını*, 1. Basım Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova , İzmir, 21-44 (1998).

Kierek–Pearson K., Karatan, E., “Biofilm development in bacteria”, *Adv. Appl Microbial* ,57:79-111(2005).

Kirov ,S.M. Castrisios A. Abd Shaw J.G. ,”*Aeromonas* Flagella (Polar and Lateral) Are Enterocyte Adhesins That Contribute to Biofilm Formation on Surfaces”, *American Society for microbiol.* 72:1939-45(2003).

Koneman, E.W., Allen, S.D., Dowell, V.R., Sommers, H.M., “Color atlas and textbook of diagnostic microbiology”, *Lippincott Company*, USA, Third Edition 89-156 (1988).

Koneman, M.D., Aillen, S.D., Schreckenberger, P.C., Janda, W.M., Winn, W.C., “Diagnostic microbiology”, *J.B. Lippincott Company*, 423-425, 435-466 (1992).

Kloos W.E., “ Systematics and natural history of *staphylococci*”, *J.Appl. Bacteriol, Symp. Supp.*, 54: 275-280 (1986).

Kloos, W.E., “Systematic and The Natural History of *Staphylococci* 1”, *J. Applied. Bacteriol.*, 69: 25-37 (1990).

Kusch, D. an Gotze, U., “Untersuchungen an staphylokokkon aus dem aufauwasser von gefriergeflügel”, *Fleirchiwirsh-wirshaft*, 12:1960-1965 (1974).

Labbate, M., Qeck, S.Y., Koh, K.S., Rice, S.A., Givskov, M., Kjelleberg, S., ”Quorum sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1”, *J Bacteriol*; 186: 692-698 (2004).

Lazazzera, B.A., Grossman, Ad., “The ins and outs of peptide signaling”, *Trends Microbiol*; 6:288-94 (1998).

Leid, J.G., Shirtliff, M., Consterton, J.W., Stoodley, A.P., “Human leukocytos adhere to,penetrate,and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms”, *Infect Immun*; 70: 6339-45 (2002).

Lencastre, H., Figueriredo, A. M., Urban, C., Rahal, J., Tomasz, A., “Multiple mechanisms of methicillin resistance and improved methods for detection in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*”, **Antimicrob agents Chemother**, 35: 632 (1991).

Leriche, V., Sibille, P., Carpenter, B., “Use of an enzyme-linked lectinsorbent assay to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms”, **Appl Environ Microbiol**; 66: 1851-1856 (2000).

Lindsay, D., von Holly, “Different Responses of Planctonic and Attached *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* to Sanitizer Treatment”, **Journal of Food Protection**; 62: (4) 368-379 (1990).

Lowy, D. F., “*Staphylococcus aureus*”, **N. Engl. J. Med.**, 339: 520-532 (1998).

Lynch, M.J., Swift, S., Kirke, D.F., Keevil, C.W., Dodd, C.E., Williams, P. , “The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*”, **Environ Microbiol**; 4: 18-28 (2002).

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**, 66, 86-92. (2002).

Mah, T.F., Pitts, B., Pellock, B., Walke, G.C., Stewart, P.S., O’Toole, G.A. ,”A genes basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance”, **Nature**; 426:306-10 (2003).

Mah, T.F.C., O’Toole, G.A., “Mechanism of biofilm resistance to antimicrobial agents”, **Trends in Microbiology**. 9, 34-39 (2001).

Marshall., “Interfaces in microbial ecology”, 44-47 (1976).

Marshall K.C., Stout, R., Mitchell, R., “Mechanisms of the initial events in the sorption and control at surfaces”, **Am. Soc. Mikrobiol. News**, 58:202-207 (1971).

Marples, R., Cooke, E.M., “Current problems with Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*”, **J. Hosp. Infect.**, 11: 381-392 (1988).

Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Upadhyay, D., Fatma, T., Rattan, A., “*Staphylococci Slime on In Vitro Activity of Glycopeptides*” , **Jpn J Infect Dis**; 58: 353-357 (2005).

Mattila-Sandholm, T., Wirtanen, G., “ Biofilm formation in the industry: A Review“, **Food Reviews International**; 8(4): 573-603 (1992).

Mbandi, E.; Shelef, L. A., “Enhanced antimicrobial effects of combination of lactate and diacetate on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in beef Bologna”, **International Journal of Food Microbiology**. 76, 191-198 (2002)

McLean, R.I., Whiteley, M., Stickler, D.J., Fuqua, W.C., "Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilms", *FEMS Microbiol Lett*; 154: 259-63(1997).

Mead, G.C., " Fresh and further-processed poultry", The Microbiological Safety Quality of food. *An Apsen Publication*, 1:445-471 (2000).

Melchior, M.B., 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*, 53, 326-332 (2006).

Meluleni G.J., Grout M. , Evans D.J. and Pier G.B. Mucoid, "*Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm in vitro are killed by opsonic antibodies to the mucoid exopolysaccharide capsule but not by antibodies produced during chronic lung infection in cystic fibrosis patients", *J Immunol*;155:2029-38 (1995).

Miller, M.B., Bassler, B.L., "Quorum sensing in bacteria", *Annu Rev Microbiol*, 55:165-99 (2001).

Minor, T.E., Marth, E.H., "*S.aureus* and *staphylococcal* food intoxications", A.Rewiew.2. Enterotoxins and Epidemiology, *J. Milk Food Technol*, 34:228- 240 (1971).

Moller, S., Pederson, A.R., Paulsen, U.K., Arvin, E., Molin, S., "Activitiy and threedimentsional distribution of toluene-degrading *Pseudomonas putida* in a multispecies biofilm assessed by quantitativw in situ hybridiation and scanning confocal laser microscopy" , *Appl Envion Microbiol*; 62: 4632-40 (1996).

Montanaro, L., Arciola, C.R., Baldassari, L., Boesetti, E., " Presence and expression of collagen adhesin gene and slime production in *Staphylococcus aureus* strains from orthopaedic prothesis infections", *Biomaterials.*, 20:1945- 1949 (1999).

Moroni, P., Vellere, F., Antonini, M., Pisoni, G., Ruffo, G., Carli, S., "Antibiotic suspectibility of coagulase-negative staphylococci isolated from goat's milk", *Int. Jour. Of Antimicrobial Agents.*, Vol.23(6):637-640 (2004)

Movitz, J., "Fomattion of extrasellular protein-A by *Staphylococcus aureus*", *Eur.J.Biochem.*68: 291-299 (1976).

Nergiz, Ş., Özekinci, T., Gülhan, B., Meşe, S., Atmaca, S., "Çeşlitli klinik örneklerden izole edilen metisiline dirençli koagülaz negatif stafilokoklarda fusidik asit direnci", *ANKEM Derg.*, 21(4):228-231 (2007)

Nicos, T. I., "Activity of glicopeptides against vancomycin resistant Gram positive bacteria", *Antimicrob Agents Chemother*, 33: 1477-1481 (1985).

Noble, W.C., "Systematic and The Natural History of *Staphylococci* 1", **J. Applied. Bacteriol.**, 69: 39-48 (1990).

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

Normanno, G., Corrente, M., La Salandra, G., Dambrosio, A., Quaglia, N.C., Parisi, A., Greco, G., Bellacicco, A.L., Virgilio, S., Celano, G.V., "Methicillinresistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy", **International Journal of Food Microbiology**, 117: 219-222 (2007).

Norwood, D.E., Gilmours, A., "The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilms." **J Appl Microbiol**; 88:512-20 (2000).

Novick, R.P., Ross, H.f., Projan, S.J., Kornblum, J., Kreiswirth, B., Maghazeh, S., "Synthesis of staphylococcal virulence factors şn controlled by a regulatory RNA moleculer" **Embo Journal**; 12: 3967-75 (1993).

O'Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R., "Biofilm formation as microbial development." **Annu Rev. Microbial**; 54: 49-79 (2000).

Özkan, F., A., Tünger, S., Ulusoy, S., Ermertcan, D., Burhanoglu, M., A. Özinel, A. Tokbas, Â, "Teikoplanin ve Vankomisinin Koagülaz Olumsuz Stafilokoklara Karsı İn Vitro Etkinliklerinin Karsılaştırılması" , II. Sempozyum, Antimikrobik Kemoterapi Günleri: **Klinik-Laboratuvar Uygulamaları ve Yenilikler**, Antalya, 10 (1995).

Papadopoulou, C., Dimitriou, D., Levidiotou, S., Gessouli, H., Panagiou, A., Golegou, S., Antoniadis, G., "Bacterial strains isolated from eggs and their resistance to currently used antibiotics: Is there a health hazard for consumers", **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.**, 20: 35-40 (1997).

Parsek, M.R., Greenberg, E.P., "Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram negative bacteria; a signaling mechanism involved in associations with higher organisms", **Proc. Natl Acad Sci USA**; 97:8789-93 (2000).

Patel, R., "Biofilms and Antimicrobial Resistance Clinical Orthopaedics and Related Research", **Lippincott Williams & Wilkins**; 437: 41-47 (2005).

Patti, J.M., Allen, B.L., McGravin, M. J., Hook, M., "MSCRAMM-mediated adherence o microorganisms to host tissue", **Annu Rev Microbiol**; 48:585-617 (1994).

Pavia, M., Carmello, G.A., Salpietro, L., Angelillo, I.F., "Vancomycin resistance and antibiotic susceptibility of enterococci in raw meat", *Journal of Food Protection*, 63(7) :912-915 (2000)

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

Prigent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C., Lejeune, P., "Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*", *J Bacteriol* ;181:5993-6002 (1999).

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

Pope, M.J., Cherry, T.E., "An evaluation of the presence of pathogens on broiler raised on poultry litter treatment", *Poultry Science*, 79: 1351-1355 (2000).

Post, J.C., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L., Ehrlich, G.D., "The role of biofilms in otolaryngologic infections", *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*; 12: 185- 190 (2004).

Rachid, S., Ohlsen, K., Witte, W., Hacker, J., Ziebuhr, W., "Effect of Subinhibitory Antibiotic Concentrations on Polysaccharide Intercellular Adhesin Expression in Biofilm-Forming *Staphylococcus epidermidis*". *Antimicrob Agent Chemother*; 44: 3357-3363 (2000).

Raffa, R.B., Iannuzzo, J.R., Levine, D.R., Saeid, K.K., Schwartz, R.C., Sucic, N.T., Terleckyj, O.D., Young, J.M., "Bacterial communication ("Quorum Sensing") via ligands and receptors: a novel pharmacologic target for the design of antibiotic drugs", *J Pharmacol Exp Ther*; 312: 417-423 (2005).

Rampone, H., Bogni, C., Giraudo, J., Calzolari, A., "Identification of *Staphylococci* from bovine milk in Argentina", *Zbl. Bakt.*, 279: 537-543 (1993)

Resch, M., Nagel, V., Hertel, C., "Antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci associated with food and used in starter cultures", *International Journal of Food Microbiology*, 127 :99–104 (2008)

Resch, A., Rosenstein, R., Nerz, C., Gotz, F., "Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions", *Appl Environ Microbiol*; 71: 2663-2676 (2005).

Reilly, W.J., Forbes, G.I., Sharp, J.C.M., Obsegbulern, S.I., Collier, P.W., Paterson, G.M., "Poultry-borne *Salmonellosis* in Scotland", *Epidem. Inf.*, 101:115-122 (1988).

Rijnarts, H.M., Norde, W., Bouwer, E.J., Lyklema, J., Zehnder, A.B., “Bacterial adhesion under static and dynamic conditions”, **Appl Environ Microbiol**; 59:3255-3265 (1993).

Rohde, H., Mack, D., Christner, M., Burdelski, C., Franke, G., Knobloch, J.K.M., “Pathogenesis of staphylococcal device-related infections: from basic science to new diagnostic, therapeutic and prophylactic approaches”, **Rev Med Microbiol**; 17: 45–54 (2006).

Rohde, H., Burandt, E.C., Siemssen, N., Frommelt, L., Burdelski, C., Wurster, S., Scherpe, S., Davies, A.P., Haris, L.G., Horstkotte, A.M., Knobloch, K.M., Ragunath, C., Kaplan, J.B., Marck, D., “ Polysaccharide intercellular adhesion or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections”, **Biomaterials**, 28: 1711-1720 (2007).

Ruben, F. L., Norden, C. W., “*Staphylococcal Infections*” , (in) Bacterial Infections of Humans, 2nd edition, Evans, A. S., Brachman, P. S., (ed), **Plenum Medical Book Company**, New York and London, 621-637 (1991).

Schleifer, K. H., “Section 12, Gr(+) Cocci”, Bergey’s of Manual Systematic Bacteriology, (Peter, H.A., Nicholas, S.M., Sharpe, M.E., Holt, G.J., Editor). Vol 2 9th Edition., **Williams and Wilkins**, Baltimore, London, Los Angeles, Sydney. 1013-1035 (1984).

Sea, E., Kruze, J., “Virulence factors of coagulase-negative *Staphylococcus* of human and bovine origin”, **J. Rev. Latinoam Microbiol.**, 37(3): 201-208 (1995)

Shiau, A.L., Wu, C.L., “The inhibitory effect of *Staphylococcus epidermidis* slime on the phagocytosis of murine peritoneal macrophages is infection independent”, **Microbiol Immunol**; 42: 33-40 (1998).

Sieradzki, K., Roberts, B. R., Haber, W. S., Tomasz, A., “The development of vancomycin resistance in a patient with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection”, **New Engl. J. Med.**, 34: 517-523 (1999)

Simonova, M., Strompfova, V., Marcinkova, M., Laukova, A., Vesterlund, S., Moratalla, M.L., Bover-Cid, S., Vidal-Carou, C., “Characterization of *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* isolated from Slovak meat products”, **Meat Science** 73 :559–564 (2006)

Soyutemiz, E., “Et ve et ürünlerinde mikrobiyal bozulmalar”, **Dünya Yayınları Gıda Dergisi**. Mart: 52-57 (2000).

Spoering, A.L., Gilmore, M.S., “Quorum sensing and DNA release in bacteria biofilms”, **Curr Opin Microbiol**; 9:133-7 (2006).

Stewart, P.S., Costerton, J.W., “Antibiotic resistance of bacteria in biofilms”, **Lancet** ;358:135-8 (2001).

Stewart, P.S., “Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms”, **Int J Med Microbiol**, 292, 107- 113 (2002).

Stewart, P.S., “Are view of experimental measurements of effective diffusive permeabilities and effective diffusion coefficients in biofilms”, **Biotechnol Bioeng** ;59:261-72 (1998).

Stoodley, P., Lewondowski, Z., “Boyle JD and streamers in turbulent flowing water as related to drag and pressure drop”, **Biotechnol Bioeng**; 57:536-44 (1998).

Sutherland, I.,”Biofilm exopolysaccharides: A strong and sticky framework”, **Microbiology**, 147,3-9 (2001)

Swenson, J.M., Hindler, J.A., Peterson, L.R., “ Special tests for detecting antibacterial resistance”, **American Society for Microbiology**, 6.e.d. Washington, 1356-67 (1995).

Tack, K.J., Sabath, L.D., “Increased minimum inhibitory concentraion with anaerobiosis for tobramycin, gentamicin, and amikacin, compared to latamoxef, piperacillin, chloramphenicol, and clindamycin “ ,**Chemotherapy**; 31:204-10 (1985).

Teale, C.J. and David G.P., “ Antibiotic resistance in mastitis bacteria, Proceedings of the British Mastitis Conference”, **VLA Shrewsbury VI Centre**, 1999: 24-29 (1999).

Tham, T., Hadju, L.J., “A comparison of six media isolation *S.aureus* from foods”, **Food Microbiol**, 4: 133-146 (1997).

The National Committee for Clinical Laboratory Standarts, NCCLS, antimicrobial Susceptibility Testing/ SC3 third edition, NCCLS Document M2- A4, 10: M7- A2, Dilution Testing (Aerobs) and M2- A4, Disc Testing, **The National Committee for Clinical Laboratory Standarts**, Vilanova, Pa.,(1990).

Topçu, A. W., Söyletir, G., Doğanay, M., “İnfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi”, **Nobel Tıp Kitabevleri**, İstanbul 165-1517 (2002).

Tunçel, G.; Tiryaki, G., “Çiğ köftelerin gıda güvenliği açısından değerlendirilmesi”, **Dünya Gıda Dergisi**. Aralık. 56-61 (2001)

Turan, E., “ Süt ve süt ürünlerinden izole edilen *Staphylococcus aureus*’ların çeşitli biyokimyasal özellikleri ve antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi ,**Gazi Üniversitesi Fen Bililimleri Enstitüsü**, Ankara, 1-30 (2005).

Türkyılmaz, S., Eskiizmirli, S., “ Detection of Slime Factor and Antibiotic Resistance in *Staphylococcus* Strains Isolated from Various”, **Türk. J. Vet. Anim. Science**, 30: 201-206 (2006).

Türütöğlu, H., Erçelik, S., Öztürk, D., “Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis”, **Bull. Vet. Inst. Pulawy**, 50, 41-45 (2006).

Uçan, S., U., Aslan, E., “ İnek mastitislerinden izole edilen koagülaz pozitif *Stafilokok* suslarının penisilin direnci ve bazı antibiyotiklere duyarlılıkları”, **Vet. Bil. Dergisi**, 8(2): 98-100 (2002).

Ulusoy, S., Çetin, B., Arda, B., Özkan, F., Tünger, A., Tokbas, A., “Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* kökenlerinin antibiyotik direnci”, **İnfeksiyon Dergisi**, 4(3): 363-367 (1995).

Ünal, S., “Sorun gram pozitif bakteri infeksiyonlarının tedavisinde yenilikler”, **Antibiyotik Bülteni**, 3: 71-76 (1993).

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**, 103, 241-247. (2004).

Verhoef, J., Schmitz, F. J., “Staphylococci and the micrococcaceae”, “Armstrong D, Cohen J (ed), Infectious Diseases”, **Mosby-Harcourt Publishers Ltd**, London 8: 131-146 (1999).

Vrany, J.D., Stewart, P.S., Suci, P.A., “Comparison of recalcitrance to ciprofloxacin and levofloxacin exhibited by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms displaying rapid-transport characteristics”, **Antimicrob Agents Chemother** ; 41:1352-8 (1997).

Vuong, C., Otto, M., “*Staphylococcus epidermidis* infections” **Microb Infect**; 4: 481-489 (2002).

Vuong, C., Gotz, F., Otto, M., “Construction and characterization of an agr deletion mutant of *Staphylococcus epidermidis*” **Infect Immun**; 68:1048-53 (2000).

Young, C., Voyich, J.M., Fischer, E.R., et.al.” Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protect *Staphylococcus epidermidis* against major components of human innate immune system cell “, **Microbiol** ; 6: 269-75 (2004).

Vautor, E., Dellamonica-Casenti, H., Sabah, M., Mancini, G., Pepin, M., Dellamonica, P., “ Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from dairy sheep farms”, **Small Rumin. Res.**, 1-3 (2006).

Voss, A., Milatović, D., Schwarz, C., et al, “Methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* in Europe”, ***Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.***, 13: 50-55 (1994).

Vuong, C., Otto, M., “*Staphylococcus epidermidis* infections”, ***Microb Infect*** ; 4: 481–489 (2002).

Walters, M.C., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M.J., Stewart, P.S., “Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and to Chemother”, ***Journal of Bacteriology***; 47:317-23 (2003).

Watnick, P., Kolter, R., “Biofilm city of microbes”, ***Journal of Bacteriology***, 182,2675-2679 (2000).

Waldvogel, F. A., “*Staphylococcus aureus*”, including toxic shock syndrome 5th ed., In Mandell, G., Bennet, J. E., Dolin, R., (eds), ***Principles and Practice of Infectious Diseases***, Churchill Livingstone New York, 2069-2092 (2000).

Willke, A., “Stafilokoklarda metisiline direnç mekanizmaları ve belirlenmesi”, ***Ankara Dergisi***, 6: 288-291 (1992).

Williams, I., Venables, W.A., Lloyd, D., Paul, F., Critchley, I., “The effects of adherence to silicone surfaces on antibiotic susceptibility in *Staphylococcus aureus*”, ***Microbiology***; 143 (Pt 7): 2407-13 (1997).

Yakupoğulları, Y., Gündüz, A., Özcan, M., Dogukan, M., Seyrek, A., Yılmaz, M., “*Staphylococcus aureus* suslarının siprofloksasin, ofloksasin, levofloksasin ve moksifloksasin duyarlılıkları”, ***Fırat Tıp Dergisi*** ,11(1): 45-47 (2006).

Yancey, R.J., “Recent Advances in Bovine Vaccine Technology”, ***J Dairy Sci***, 76(8), 2418-2436. (1993),

Yarwood, J.M., Bartels, D.J., Volper, E.M., Greenberg, E.P., “Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms”, ***J Bacteriol***;186:1883-50 (2004).

Yasuda, H., Ajiki, Y., Aoyama, J., Yolota, I., “Interaction between human polymorphonuclear leucocytes and bacteria released from in vitro bacterial biofilms models”, ***J med Microbiol***; 41:359-67 (1994).

Yıldız, F.H., Dolgonov, N.A., Schoolnic, G.K., “VpsR, a Member of the response Regulators of the Two-Component Regulatory Systems, Is Required for Expression of vps Biosynthesis Genes and EPS (Etr) – Associated Phenotypes in *Vibrio cholerae* O1 E1 Tor”, ***J Bacteriol***; 183:1716-26 (2001).

Yılmaz, M., Çelik, G.Y., 2007, “Bakteriyel Ekstraselüler Polisakkarit (EPS). International Journal of Food Science and Technology, Orlab on-line Mikrobiyoloji

Dergisi .www.mikrobiyoloji.org/pdf/702070202.pdf, 05;2,7-13. Erişim tarihi : 22.11.10

Younis, A., et. al., “ Phenotypic characterisits of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Israeli dairy herds”, **J. Vet. Med. B Infect Dis.**, 47(8): 591-597 (2000).

Zabinski, R.A., Walker, K.J., Larsson, A.J., Moody, J.A., Kaatz, G.W., Rotschafer, J.C., “Effect of aerobic and anaerobic environments on antistaphylococcal activities of five fluoroquinolones” ,**Antimicrob Agents Chemother** ;39:507-12 (1995)

Zarzour, J. Y., Belle, E. A., “ Evaluation of three tests procedurs for identification of *S.aureus* from clinical sources”, **J. Clin. Microbiol.**, 7: 133-136 (1978).

Zell, C., Resch, M., Rosenstein, R., Albrecht, T., Hertel, C., Götz, F., “Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolate from food and starter cultures”, **International Journal of Food Microbiology**, 127:246–251 (2008)

Zhu, J., Mekalanos, J.J., “Quorum sesnsing-dependet biofilms enhance colonization in *Vibrio cholorae*”, **Dev Cell** ; 5: 647-56 (2003).

Zottola, A., Sasahara, K.C., “Microbial biofilms in the food industry should they be a concern “, **Int. J.Food Microbiol.**, 23:125-148 (1994)

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ATAOL ÖZLEM
Uyruğu : T. C.
Doğum tarihi ve yeri : 17.02.1986 Ankara
Medeni hali : Bekar
Telefon : 0 (312) 320 40 27
Faks : -
e-mail : ozlem-ataol@hotmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi / Biyoloji Bölümü	2011
Lisans	Gazi Üniversitesi / Biyoloji Bölümü	2007
Lise	Başkent Lisesi / Fen Bilimleri	2003

Yabancı Dil

İngilizce

Hobiler Kitap okuma, org çalmak, müzik dinlemek