



T.C.
AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KIYMA VE KÖFTE ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN
Staphylococcus aureus İZOLATLARININ ANTİMİKROBİYAL
DİRENÇ PROFİLİNİN VE BİYOFİLM OLUŞUMUNUN FENOTİPİK
VE GENOTİPİK İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUĞBA SARI

HAZİRAN

TUĞBA SARI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

HAZİRAN 2023

KIYMA VE KÖFTE ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN *Staphylococcus aureus* İZOLATLARININ ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ PROFİLİNİN VE BİYOFİLM OLUŞUMUNUN FENOTİPİK VE GENOTİPİK İNCELENMESİ

Tuğba SARI

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Ceren BAŞKAN

**AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HAZİRAN 2023

Yüksek Lisans Tezi Kabul ve Onay Sayfası

Tuğba SARI tarafından hazırlanan ‘Kıyma ve Köfte Örneklerinden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* İzolatlarının Antimikrobiyal Direnç Profilinin ve Biyofilm Oluşumunun Fenotipik ve Genotipik İncelenmesi’ adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Amasya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ceren BAŞKAN

Biyoloji Anabilim Dalı, Amasya Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Başkan : Doç. Dr. Ömer ERTÜRK

Biyoloji Anabilim Dalı, Ordu Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye : Dr. Öğr. Üyesi İdris BEKTAŞ

Biyoloji Anabilim Dalı, Amasya Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Tez Savunma Tarihi: 09/06/2023

Jüri tarafından kabul edilen bu tezinYüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Doç. Dr. Ümit YILDIRIM

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Amasya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
 - Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,
- bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Tuğba SARI

09/06/2023

KIYMA VE KÖFTE ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN *Staphylococcus aureus*
İZOLATLARININ ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ PROFİLİNİN VE BİYOFİLM
OLUŞUMUNUN FENOTİPİK VE GENOTİPİK İNCELENMESİ
(Yüksek Lisans Tezi)

Tuğba SARI

AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2023

ÖZET

Staphylococcus aureus (*S. aureus*), enfeksiyonlara ve gıda intoksikasyonlarına neden olduğu için halk sağlığını tehdit eden bir bakteridir. Antibiyotik dirençli mikroorganizmaların oluşması ve bakterinin biyofilm yapma yetenekleri gıda kaynaklı enfeksiyonlarda büyük sorun haline gelmiştir. Bu nedenle tez çalışması kapsamında Amasya ilinde tüketilen kıyma ve köfte örneklerinde *S. aureus* varlığının belirlenmesi, antibiyotik direnç profillerinin ve biyofilm oluşumunun tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda Şubat 2022-Temmuz 2022 tarihleri arasında Amasya ilinde tüketime sunulan 60 et örneği (30 köfte, 30 kıyma) materyal olarak kullanılmıştır. İlk olarak örneklerin peptonlu su (%0,1) ile desimal dilüsyonları yapılmış, egg yolk tellurite içeren baird parker agar plaklarına ekilerek, 35 °C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası şüpheli koloniler seçilerek *Staphylococcus* sp. olarak değerlendirilmiştir. Gram boyama, katalaz testi, mannitol salt agarda üreme ve koagülaz gibi testler ile *S. aureus* izolatları fenotipik olarak doğrulanmıştır. İkinci olarak izolatlardan kaynatma yöntemi ile DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. PZR ile izolatların cins spesifik (16S rRNA) ve tür spesifik (*nuc*) gen bölgeleri ile *S. aureus* olduğu genotipik olarak doğrulanmıştır. Üçüncü olarak izolatlarının gentamisin, tobramisin, levofloksasin, piperasilin-tazobaktam, imipenem, kloramfenikol, penisilin, metisilin ve eritromisin antibiyotiklerine karşı direnç profilleri disk difüzyon testi ile belirlenmiştir. Son olarak izolatlarının biyofilm üretimi kongo kırmızısı agar (CRA) ve mikrotitrasyon plak yöntemiyle fenotipik olarak tespit edilmiştir. Ayrıca biyofilm oluşumunu genotipik olarak doğrulamak için *icaA* ve *icaD* genlerini hedefleyen PZR testi gerçekleştirilmiştir. İncelenen örneklerden 297 tane *Staphylococcus* sp. izole edilmiş ve bu izolatların 58'inin fenotipik ve genotipik olarak *S. aureus* olduğu tespit edilmiştir. Disk difüzyon sonuçlarında izolatların hepsinin imipenem ve piperasilin-tazobaktama duyarlı, fakat metisiline %43,10 (25/58), eritromisine %41,37 (24/58), penisiline %58,62 (34/58), gentamisine %10,34 (6/58), kloramfenikole %17,24 (10/58), tobramisine %6,89 (4/58) ve levoflaksasine %1,72 (1/58) oranında dirençli olduğu belirlenmiştir. CRA'da biyofilm oluşumu %58,62 (34/58), mikrotitrasyon plak yönteminde biyofilm oluşumu %58,62 (34/58) olarak tespit edilmiştir. PZR analizinde 3 izolatta *icaD*, 2 izolatta ise *icaA* geni pozitif olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, kıyma ve köftelerde antibiyotiklere dirençli *S. aureus* varlığının tespit edilmesi ve izolatların biyofilm üretmesi bu bakterinin halk sağlığı açısından potansiyel risk taşıdığı anlamına gelmektedir. Bu nedenle gıdaların satın alma, işleme, nakliye ve satış sırasında oluşabilecek *S. aureus* bulaşma riskini azaltmak için gerekli önlemlerin alınması halk sağlığı bakımından önem taşımaktadır.

Sayfa Adedi : 83
Anahtar Kelimeler : Antimikrobiyal direnç, biyofilm , kıyma, köfte, *S. aureus*
Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Ceren BAŞKAN

PHENOTYPICAL AND GENOTYPICAL INVESTIGATION OF THE
ANTIMICROBIAL RESISTANCE PROFILE AND BIOFILM FORMATION OF
Staphylococcus aureus ISOLATES FROM GROUND BEEF AND MEATBALLS
(M. Sc. Thesis)

Tuğba SARI

AMASYA UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

June 2023

ABSTRACT

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) is a bacterium that threatens public health because it causes infections and food intoxications. The formation of antibiotic-resistant microorganisms and the ability of bacteria to form biofilms have become a major problem in foodborne infections. For this reason, within the scope of the thesis study, it was aimed to determine the presence of *S. aureus*, antibiotic resistance profiles and biofilm formation in ground beef and meatball samples consumed in Amasya. For this purpose, 60 meat samples (30 ground beef, 30 meatballs) presented for consumption in Amasya between February 2022 and July 2022 were used as material. First, decimal dilutions of the samples were made with peptone water (0.1%), inoculated on Baird Parker agar plates containing egg yolk tellurite and incubated at 35 °C for 24-48 hours. After incubation, suspicious colonies were selected and evaluated as *Staphylococcus* sp. *S. aureus* isolates were phenotypically confirmed by tests such as Gram stain, catalase test, growth on mannitol-only agar, and coagulase. Secondly, DNA isolation was performed from the isolates by boiling method. The isolates were genotypically confirmed to be *S. aureus* with genus specific (16S rRNA) and species specific (*nuc*) gene regions by PCR. Thirdly, the resistance profiles of the isolates against gentamicin, tobramycin, levofloxacin, piperacillin-tazobactam, imipenem, chloramphenicol, penicillin, methicillin, and erythromycin antibiotics were determined by disk diffusion test. Finally, biofilm production of isolates was determined phenotypically by Congo red agar (CRA) and microtitration plate method. In addition, PCR testing targeting the *icaA* and *icaD* genes was performed to genotypically confirm biofilm formation. From the samples examined, 297 *Staphylococcus* sp. were isolated and 58 of these isolates were determined to be *S. aureus* phenotypically and genotypically. Disk diffusion results showed that all of the isolates were susceptible to imipenem and piperacillin-tazobactam, but resistant to methicillin %43.10 (25/58), erythromycin %41.37 (24/58), penicillin %58.62 (34/58), gentamicin %10.34 (6/58), chloramphenicol %17.24 (10/58), tobramycin %6.89 (4/58), and levofloxacin %1.72 (1/58). Biofilm formation was determined as 58.62% (34/58) in CRA and 58.62% (34/58) in microtitration plate method. In PCR analysis, *icaD* gene in 7 isolates and *icaA* gene in 2 isolates were evaluated as positive. In conclusion, detection of *S. aureus* in ground meat and meatballs, development of antibiotic resistance and biofilm production of isolates mean that this bacterium poses a potential risk for public health. For this reason, it is important for public health to take the necessary measures to reduce the risk of *S. aureus* contamination that may occur during the purchase, processing, transportation and sale of foods.

Number of pages : 83
Keywords : Antibiotic resistance, biofilm, ground beef, meatballs, *S. aureus*
Supervisor : Asst. Prof. Dr. Ceren BAŞKAN

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca ilgi, alaka ve desteğini benden esirgemeyen, bilgi ve deneyimleriyle her zaman yol gösteren, her daim kendisini örnek alacağım çok kıymetli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Ceren BAŞKAN’a teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans derslerime giren saygıdeğer Prof. Dr. D. Duygu KILIÇ, Prof. Dr. Birsen AYDIN KILIÇ, Dr. Öğr. Üyesi Ekrem BÖLÜKBAŞI ve Dr. Öğr. Üyesi Ece AVULOĞLU YILMAZ hocalarıma teşekkür ederim.

Maddi ve manevi her zorlukta yanımda olan çok kıymetli anneme ve babama teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimime başlamak için beni teşvik eden, her zaman yanımda olan değerli eşime teşekkür ederim. Hayatıma en değerli ve en güzel emanet olarak verilen oğluma ve kızıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ÖN SÖZ ve TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Stafilokokların Taksonomisi ve Bazı Biyokimyasal Özellikleri.....	4
2.2. <i>S. aureus</i> 'a Ait Bazı Özellikler	5
2.2.1. <i>S. aureus</i> 'un virulans faktörleri.....	6
2.2.2. Enzimler.....	8
2.3. Enfeksiyon Dozu ve Patajonitesi	10
2.3.1. Enterotoksinler.....	11
2.3.2. Toksinler.....	13
2.4. <i>S. aureus</i> 'un Etken Olduğu Enfeksiyonlar.....	15
2.5. Hayvansal Kökenli Gıda Ürünlerinde <i>S. aureus</i> Varlığı ve Bulaş Yolları	16
2.6. Biyofilmin Tanımı ve Yapısı	18
2.6.1. Biyofilm oluşturma mekanizması.....	19
2.6.2. <i>S. aureus</i> ve biyofilm oluşumu.....	21
2.7. Antibiyotikler ve Direnç	24

Sayfa

2.7.1. Antibiyotiklerin etki mekanizmasına göre incelenmesi.....	25
2.7.2. Temel antibiyotik grupları ve direnç oluşumu.....	26
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	33
3.1. Materyal	33
3.1.1. Kıyma ve köfte örneklerinin temini.....	33
3.1.2. Kullanılan antibiyotik diskleri.....	33
3.1.3. Mikrobiyolojik ve moleküler analizler için kullanılan kimyasallar.....	33
3.1.4. Mikrobiyolojik ve moleküler analizlerde kullanılan besiyerleri ve çözeltilerin hazırlanışı.....	34
3.2. Yöntem.....	37
3.2.1. <i>S. aureus</i> 'un izolasyonu.....	37
3.2.2. <i>S. aureus</i> izolatları için uygulanan fenotipik testler.....	37
3.2.2.1. Katalaz testi.....	37
3.2.2.2. Gram boyama.....	37
3.2.2.3. Koagülaz testi.....	38
3.2.2.4. Mannitol salt agarda fermentasyon testi.....	38
3.2.3. <i>S. aureus</i> izolatlarının genotipik olarak polimeraz zincir reaksiyonu ile doğrulanması.....	39
3.2.3.1. İzolatlardan total DNA izolasyon.....	39
3.2.3.2. Cins spesifik ve tür spesifik genlerinin belirlenmesi.....	39
3.2.4. Antibiyotik duyarlılık testleri.....	40
3.2.5. Biyofilm oluşumu.....	41
3.2.5.1. Biyofilm oluşumunun kongo kırmızısı agar metoduyla belirlenmesi.....	41
3.2.5.2. Mikrotitrasyon plağı yöntemi.....	41

Sayfa

3.2.5.3. <i>S. aureus</i> izolatlarının biyofilm üretme özelliklerinin moleküler olarak değerlendirilmesi.....	42
4. BULGULAR.....	44
4.1. <i>S. aureus</i> İzolasyon ve İdentifikasyonu	44
4.2. <i>S. aureus</i> İzolatları İçin Uygulanan Fenotipik Testler	44
4.2.1. Gram boyama.....	45
4.2.2. Katalaz testi.....	45
4.2.3. Koagülaz testi.....	46
4.2.4. Mannitol salt agarda fermentasyon testi.....	46
4.3. <i>S. aureus</i> İzolatlarının Genotipik Olarak PZR İle Doğrulanması	47
4.3.1. <i>Staphylococcus</i> için cins spesifik 16S rRNA gen varlığının belirlenmesi.....	47
4.3.2. <i>S. aureus</i> izolarında <i>nuc</i> geninin tanımlanması.....	47
4.4. <i>S. aureus</i> İzolatlarının Antibiyotiklere Olan Direnç ve Duyarlılığı.....	48
4.5. <i>S. aureus</i> İzolatlarında Biyofilm Oluşumu	49
4.5.1. Kongo kırmızısı agar metodu.....	49
4.5.2. Mikrotitrasyon plağı yöntemi ile biyofilm oluşumunun belirlenmesi.....	50
4.5.3. <i>S. aureus</i> izolatlarının biyofilm üretme özelliklerinin moleküler olarak değerlendirilmesi.....	51
4.5.4. <i>icaA</i> ve <i>icaD</i> gen varlığının PZR ile araştırılması.....	52
5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇ	66
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	84

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 1.1. Stafilokokların taksonomisi (Todar, 1994).....	4
Çizelge 1.2. Stafilokok türlerine ait bazı biyokimyasal özellikler (Seo ve Bohach 2013)	5
Çizelge 1.3. <i>S. aureus</i> 'un etken olduğu enfeksiyonlar ve semptomları (Murray, Rosenthal ve Kobayashi, 2002)	15
Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan primerler	36
Çizelge 3.2. 16S rRNA geni için PZR koşulları	39
Çizelge 3.3. <i>nuc</i> geni için PZR koşulları	40
Çizelge 3.4. Antibiyotik duyarlılık testinde kullanılan antibiyotikler ve zon çaplarının değerleri	41
Çizelge 3.5. <i>icaA</i> geni için PZR koşulları	42
Çizelge 3.6. <i>icaD</i> geni için PZR koşulları	43
Çizelge 4.1. <i>S. aureus</i> izolatlarının disk difüzyon sonuçları (n:58).....	48
Çizelge 4.2. Kıyma ve köfte örneklerindeki antibiyotik dirençli izolat sayısı.....	49
Çizelge 4.3. Kongo kırmızısı agarda biyofilm oluşturan ve oluşturmayan izolat sayısı	50
Çizelge 4.4. Kongo kırmızısı agarda biyofilm oluşturan izolatların yüzdesi	50
Çizelge 4.5. Mikrotitrasyon plak yöntemiyle biyofilm oluşturan izolatlar.....	51
Çizelge 4.6. PZR ile elde edilen <i>icaA</i> ve <i>icaD</i> genlerinin sonuçları.....	52
Çizelge 4.7. <i>S. aureus</i> izolatlarına ait biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi, PZR sonuçları ve antibiyotik duyarlılık sonuçları.....	54

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. <i>S. aureus</i> 'ta biyofilm mekanizması (Gupta, Sarkar, Das, Bhattacharjee ve Tribedi 2016).....	21
Şekil 2.2. icaADBC ve PIA sentezi	23
Şekil 2.3. <i>S. aureus</i> 'ta bap geni varlığı	23
Şekil 4.1. Baird Parker Agar besiyerindeki <i>S. aureus</i> 'a ait koloni görünümü.....	44
Şekil 4.2. 100X objektifte <i>S. aureus</i> 'un gram boyama görüntüsü	45
Şekil 4.3. Şüpheli <i>S. aureus</i> izolatlarına katalaz testi yapıldığı görüntüsü	45
Şekil 4.4. Tüpte koagülaz test yönteminin görüntüsü.....	46
Şekil 4.5. Mannitol Salt agar besiyerinde <i>S. aureus</i> görüntüsü	46
Şekil 4.6. 16S rRNA PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez götüntüsü	47
Şekil 4.7. <i>S. aureus</i> izolatlarında <i>nuc</i> geninin PZR görüntüsü	47
Şekil 4.8. <i>S. aureus</i> izolatlarının antibiyotik duyarlılığı.....	48
Şekil 4.9. Kongo kırmızı agarda <i>S. aureus</i> izolatlarının biyofilm oluşum görüntüsü	50
Şekil 4.10. Mikrotitrasyon plağının analiz cihazında okutulması.....	51
Şekil 4.11. <i>S. aureus</i> 'un mikrotitrasyon plağında biyofilm oluşturmaı	51
Şekil 4.12. PZR sonrası elektroforezde <i>icaA</i> gen bölgesinin varlığının görüntüsü.....	52
Şekil 4.13. PZR sonrası elektroforezde <i>icaD</i> gen bölgesinin varlığının görüntüsü.....	52

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, yanda açıklamaları verilmek üzere aşağıda listelenmiştir.

Simgeler

Açıklama

°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
Ca ⁺²	Kalsiyum
g	Gram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
pmol	Pikomol
yy	Yüzyıl
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama

Kısaltmalar

Açıklama

bap	Biofilm associated protein
BHI	Brain heart infusion broth
BPA	Baird parker agar
CDC	Hastalık kontrol merkezi

CLSI	Clinical laboratory standart institute
dH₂O	Distile su
DNaz	Deoksiribonükleaz
EDTA	Etilendiamintetra asetikasit
EPS	Ekstrasellüler polimerik matriks
H₂O₂	Hidrojen peroksit
kDa	Kilodalton
KNS	Koagülaz negatif <i>Staphylococcus</i>
KPS	Koagülaz pozitif <i>Staphylococcus</i>
MHA	Mueller hinton agar
MRSA	Metisilin dirençli <i>S. aureus</i>
MSA	Mannitol salt agar
MSCRAMM	Matriks moleküllerini tanıyan mikrobiyel yüzey bileşenleri
NaCl	Sodyum klorür
PBP	Penisilin bağlayan protein
PVL	Panton-Valentine Lökosidin
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
QS	Quorum sensing
rRNA	Ribozomal RNA
SE	Stafilokokal enterotoksin
TBE	Trizma base-borik asit-EDTA
TSA	Triptik soy agar
TSB	Triptik soy broth
TSST-1	Toksik şok sendromu toksin-1
UV	Ultraviyole

1. GİRİŞ

Günümüzde gıda sanayisinin küreselleşmesi, nüfusun hızla artması, tarımda uygulanan üretim tekniklerinin değişmesi, gıda üretiminde ve işlenmesindeki teknolojik değişiklikler, iklimlerin değişmesi, insanların yaşam biçimi ve diyet demografisinin değişmesi, toplumun hastalıklara karşı duyarlılaşması, endikasyonlar ve antimikrobiyal direnç gibi etkenler gıda kaynaklı enfeksiyonların prevalansında değişikliklikleri ortaya çıkarmıştır. Gıda kaynaklı enfeksiyon ve zehirlenmeler küresel bir halk sağlığı sorunu olmuştur (Erol, 2016). Hastalık Kontrol ve Engelleme Merkezi'nin (CDC) açıkladığı raporlarda her sene yaklaşık 48 milyon insan, gıdalardan kaynaklanan bir enfeksiyona yakalandığını, bu rakamın 128.000'nin hastaneye sevk edildiği ve 3.000'nin de bu enfeksiyonlardan öldüğü tahmin edilmektedir. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) Amerika Birleşik Devletleri'nde gıda kaynaklı hastalıklara neden olduğu açıklanan ilk 5 bakteriden birisidir (CDC, 2017).

Stafilokokal gıda kaynaklı hastalıklar, Amerika Birleşik Devletleri'nde en yaygın üç gıda kaynaklı hastalık türünden biridir. Amerika Birleşik Devletleri'nden bildirilen raporlarda tüm gıda kaynaklı hastalıkların yaklaşık %25'i stafilokoklardan kaynaklanan intoksikasyonlar olduğu bildirilmiştir (Post, 1999).

Staphylococcaceae ailesinin en patojenik türü olan *S. aureus*, Gram (+), yuvarlak, hareket yeteneği olmayan, sporsuz, bazı suşları kapsüllü, fakültatif anaerobik, yeterli şartlar sağlandığında 7-48 °C aralıklarında çoğalabilen mezofil özellikli bir bakteridir. Etken, insan ve hayvanlarda deri, üst solunum sistemi organlarında, alt ürogenital sistem ve sindirim sistemi mukozalarında normal biyotada bulunmaktadır. Çevrede hava, toz, atık sularda, gıda ve gıda ekipmanları gibi geniş bir yayılım alanı vardır. Bu nedenle insan ve hayvanlarda çeşitli enfeksiyonlardan ve besin zehirlenmelerinden sorumlu görülen patojendir (Peacock, 2006).

S. aureus insan ve hayvanlarda enfeksiyonlara yol açan önemli bir gıda kaynaklı fırsatı kollayan bir patojen mikroorganizmadır (Lowy, 1998). *S. aureus* farklı gıda maddelerinde kolaylıkla çoğalabilmekte ve enteretoksinler üreterek gıda zehirlenmelerine yol açabilmektedir. *S. aureus* etkeni insanlarda sadece gıda zehirlenmesine değil, aynı zamanda

toksik şok benzeri sendrom, artrit, alerjik tepkiler ve bağışıklık sistemi hastalıklarına da sebep olmaktadır (Balaban, 2000).

S. aureus'un önemli virülans etmenlerinden biri olan biyofilm oluşumu, bu mikroorganizmalarda enfeksiyon yapabilme kabiliyetlerini artırır. *S. aureus*'lara ait bu özellik onların türleri arasında daha ayrıcalıklı patojenik mikroorganizma olmasına sebep olmuştur (Erdoğan ve Konak, 2019). Biyofilm, biyotik ve abiyotik yüzeylere yapışarak kendi kendilerinin ürettikleri polisakkarit bir matrixin içine gömülmüş vaziyette yaşayan mikroorganizma topluluğudur. Biyofilm varlığında mikroorganizmalar besin yokluğuna, pH değişimine, oksijen radikallerine, dezenfektanlara ve antibiyotiklere karşı planktonik halde yaşayan hücrelere göre daha direçli hale gelmektedirler. Biyofilm yapısının çoğunluğunu ekzopolisakkarit (EPS) oluşturur ve savunmada görevli önemli bir yapıdır. EPS, bakteri hücresinin bağışıklık sistemi elamanlarından kaçmasını ve antibiyotiklerin etkilerinden korunmasında rol oynar (Chae ve Schraft, 2000). Biyofilm içindeki oksijen konsantrasyonu, mikrobiyal direncin gelişimi için kritik öneme sahiptir. Oksijen biyofilmin yüzeyinde tüketilerek diplerde oksijenin olmadığı bir zemin oluşur. Bu durum bazı antibiyotiklerdeki etkinliğini azaltır ve antimikrobiyal direncin gelişmesine olanak sağlar. Ayrıca bakteri metabolizmasının bir sonucu olarak biyofilmlerde asidik atık ürünler üretilir ve bu maddeler pH'ı değiştirir. Bu değişiklik bazı antibiyotiklerde antagonistik etkilerin ortaya çıkmasını sağlar (Mah ve O'Toole, 2001).

Dünya genelinde antimikrobiyal direnç gün geçtikçe önem kazanan halk sağlığı sorunu olmuştur. İnsan ve hayvanlarda bakteriyel patojenlerin direnç kazanması, antibiyotiklerin yaygın olarak terapötik amaçlı kullanılmasıyla alakalı olduğu belirtilmiştir. Geçtiğimiz 50 yılda antibiyotikler, enfeksiyonları tedavi etmek amacıyla kullanılmış ve birçok faydası da görülmüştür. Ancak antibiyotiklerin çeşitli hayvan hastalıklarında ve yemlerde kullanılması, hayvansal kökenli gıdalarda bulunan simbiyotik ve patojenik mikroorganizmaların antibiyotiklere direnç geliştirmesine sebep olabilmektedir. Yine bu antibiyotiklerin hayvansal kökenli gıdalarda kullanılması, gıdaların vücuda alınmasından sonra insanlara geçecek dirençli bakterilerin oluşumuna zemin hazırlamıştır (Yurdakul, Erginkaya ve Ünal, 2013). *S. aureus*, farklı antibiyotik türlerine karşı çeşitli yollar ile direnç geliştirmektedir. Genetik yapısı itibariyle çok yönlülüğü bu direncin gelişmesine olanak sağlamıştır (Lina ve diğerleri, 1999). Bu direncin gelişmesinde bakteriyel plazmidler önemli olmakla birlikte

transformasyon, transdüksiyon veya transpozonlarla konjugasyon ve mutasyon gibi pek çok faktör etkili olduğu bildirilmiştir (Donham, 2010).

S. aureus'taki antimikrobiyal direnç, 1930'larda klinik olarak kullanılan ilk sülfonamid antibiyotiklerle başlamış ve günümüzde de linezolid ve daptomisin gibi daha yeni tür antibiyotiklere yayılmıştır. Penisilin G'nin 1941'de tanıtıldığında *S. aureus* enfeksiyonlarında önemli bir azalış gözlenmişti. Ama bu durum uzun sürmeden penisilinaz (beta-laktamaz) enzimi üreten izolatlar meydana çıkmış ve sonuç olarak penisilin direnci oluşmuştur (Stefani ve Goglio, 2010).

Penisilinaz enziminin üretilmesiyle meydana gelen direnç sorunu, 1960'ta penisilinaza dayanıklılık gösteren yarı sentetik penisilin olan metisilinin kullanıma sunulmasıyla kısa süreliğine çözülmüştür. 1961 yılına gelindiğinde İngiltere'de COL izolatı olarak tanımlanan ilk metisilin dirençli *S. aureus* bildirilmiştir. Metisilin antibiyotiğine direnç geliştiren *S. aureus*, β -laktam grubu antibiyotiklerin hepsine direnç geliştirdiği belirtilmiştir (Papadopoulos ve diğerleri, 2018).

Bugün tüm MRSA (Metisiline Dirençli *S. aureus*) dünya çapında nozokomiyal enfeksiyonların en önemli nedenlerinden biridir. Metisiline direnç geliştiren suşlar çoklu ilaca dirençlidir. Bu durum enfeksiyonların tedavilerini zorlaştırmıştır. Direnç geliştiren bu bakteriler, kontamine olmuş gıda maddelerinin tüketimiyle antibiyotiğe dirençli izolatların insanlara geçmesine zemin hazırlamaktadır. Bu sebeple kontamine olmuş gıda maddelerini insanlar için önemli bir risk kaynağıdır. Metisiline direnç geliştiren *S. aureus*'ların (MRSA) çoğalmasıyla tedavide farklı antibiyotik çeşitlerinin kullanılmasına neden olmuştur (Özpınar, 2011).

Yapılan literatür çalışmalarının genellikle klinik *S. aureus* izolatlarının direnç profilinin ve biyofilm oluşumunun belirlenmesine yönelik olduğu, gıdalarla yapılan çalışmaların sınırlı olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, bu çalışma kapsamında Amasya ilinde tüketime sunulan kıyma ve köfte örneklerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının antibiyotik direnç profilleri ve biyofilm oluşumunun fenotipik ve genotipik olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Stafilokokların Taksonomisi ve Bazı Biyokimyasal Özellikleri

İlk zamanlar *Micrococcaceae* familyasına dahil edilen *Staphylococcus*'lar hücre duvarının farklılığı, yapısında bulunan sitokromlar ve yağ asiti profilleri, alifatik hidrokarbonlar ve vitamin K2 gibi farklı bileşenlerden dolayı *Micrococcus* türlerinden ayrılmıştır (Bergdoll, 1989). Günümüzde gelişen moleküler yöntemler ile yapılan çalışmalarda, *Staphylococcus* spp. suşlarının *Bacilli* sınıfına ait *Bacillales* takımında ve *Staphylococcaceae* familyasına dahil olduğu belirtilmiştir. *Staphylococcus* cinsine dahil olan 57 türün güncel tanımlanması yapılmıştır (Kayılı, 2020). Stafilokoklara ait taksonomi Çizelge 2.1'de belirtilmiştir.

Çizelge 2.1. Stafilokokların taksonomisi (Todar, 1994)

Domain	Bacteria
Alem	<i>Eubacteria</i>
Şube	<i>Firmicutes</i>
Sınıf	<i>Bacilli</i>
Takım	<i>Bacillales</i>
Familiya	<i>Staphylococcaceae</i>
Cins	<i>Staphylococcus</i>
Tür (insanlar ve hayvanlar için önemli patojenik türler)	<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. saprophyticus</i> <i>S. haemolyticus</i> <i>S. lugdunensis</i>

Stafilokoklar; Gram pozitif, 0,5-1,5 µm çapına sahip, sporsuz, hareket yeteneği olmayan, fakültatif anaerop, patojenik türlerinin kapsüllü olduğu kok morfolojisinde bir bakteri türüdür. Mikroskoptaki görüntüsünde tekli, ikili, dörtlü koklar halinde görülebildiği gibi birkaç kok yan yana dizilerek kısa zincirler veya üzüm salkımına benzeyen şekiller oluşturmaktadır (İlgaz, Ak, Özgür ve İkiz, 2011; Horasan Yakan, 2021).

Stafilokoklar katı besiyerlerinde aerobik ve fakültatif anaerobik koşullarda kolaylıkla üreyebilmekte ve sıvı besiyerinde üremelerinde ise homojenize olmuş bulanıklık veya çöküntü oluşturmaktadırlar. Stafilokoklar ürettikleri katalaz enzimleri sayesinde hidrojen peroksit bileşiğini su ve oksijene dönüştürürler. Bu özellikleri sayesinde kolaylıkla streptokoklardan ayrılmaktadırlar (Holt, Krieg, Sneath, Staley ve William, 1994).

Stafilokoklar olumsuz çevre koşullarına (basınç, sıcaklık, tuzluluk, susuzluk) ve dezenfektan gibi ajanlara karşı en çok dayanıklılık gösteren bir bakteridir. Hazırlanan kültür örneklerinde 4 °C sıcaklıkta 2-3 ay, -20 °C sıcaklıkta 3-6 ay arasında yaşamaktadır ve 60 °C sıcaklık ve 30 dakika ısıtma işlem uygulamalarına dayanıklılık göstermektedir.

Bu bakteriler yüksek tuz konsantrasyonuna dayanıklılık göstererek %7,5 - %10 tuz içeriğinde bile üreme göstermektedirler. Optimum üreme gösterdikleri sıcaklık 37 °C'dir fakat bazı türlerinin 6-7 °C sıcaklıklarda bile üreyebildiği gözlemlenmiştir (Baran, Erdoğan, Turgut ve Adıgüzel, 2017). En belirgin stafilokok türlerine ait bazı biyokimyasal özelliklerin verildiği Çizelge 2.2 aşağıda belirtilmiştir.

Çizelge 2.2. Stafilokok türlerine ait bazı biyokimyasal özellikler (Seo ve Bohach 2013)

Biyokimyasal parametreler	<i>S. aureus</i>	<i>S. hyicus</i> subsp. <i>Hyicus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. saprophyticus</i>
Katalaz	+	+	+	+	+
Hemoliz	+	d	d	+	?
Glukoz	+	+	+	+	+
Termonükleaz	+	-	-	+	-
Hyaluronidaz	+	+	-	-	?
Koagülaz	+	d	-	+	-
Mannitol	+	-	-	-	d
Protein A	+	+	-	d	?
DNaz	+	?	-	?	-

(d: değişken, ? : belli değil)

2.2. *S. aureus*'a Ait Bazı Özellikler

Staphylococcus tabiri mikroskopta incelenen kendine özgün üzüm salkımı görünümü nedeniyle Yunancada üzüm salkımı manası taşıyan “staphyle” sözcüğünden oluşturulmuştur. Stafilokokların ilk defa ışık mikroskobunda görüntülenmesi 1878'de Robert Koch tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu etkenlerin ilk kez sıvı besiyerinde üremesinin sağlanması 1880'de Louis Pasteur'un aracılığıyla olmuştur.

Yine 1880 yılında İskoçlu cerrah Sir Alexander Ogston diz eklemlerinde meydana gelen cerrahi apsenin içindeki irini inceleyerek stafilokokları üzüm salkımına benzeyen kitleler olarak değerlendirmiştir. 1884 yılına gelindiğinde ise Rosenbach tarafından, irinli yaraların

incelenmesiyle oluşan kültürlerde elde edilen kolonilerin altın sarısı renklerinden dolayı *S. aureus* terimi verilmiştir. Bu zamandan sonra yapılan araştırmaların çoğunda *S. aureus*'un patojenik özellik taşımayan *Staphylococcus* türlerinden ayrılmasına başlanmış ve 1930'lardan sonra *S. aureus*'un diğer türlerden ayrılmasında koagülaz yöntemi kullanılmıştır. Farklı Stafilokok türlerini belirlemek amacıyla yapılan araştırmalar 1960 yılından sonra Baird Parker aracılığıyla başlamıştır (Rosenbach, 1884; Dafe, 2012; Horasan Yakan, 2021).

Katı besiyerindeki gözlenen koloniler yuvarlak, düzgün, parlak ve kabarıktırlar. *S. aureus*'lar karbonhidratları ürettikleri laktik asit sayesinde fermente ederler ve çoğunlukla beyaz renkten altın sarısı rengine kadar değişen koloniler oluştururlar (Brooks, Carroll, Butel ve Morse 2007; Hazımoğlu, 2011).

Ayırt edici besiyerleri içinde mannitol salt agarda yüksek konstrasyonlu tuz içeriğinde üreme gösteren stafilokok türleri içinden *S. aureus*, mannitolu fermente etmesiyle kolonilerin çevresinde sarı zonlar oluşturur ve böylece diğer türlerden ayırt edilirler. Farklı ayırt edici besiyerlerinde ve mannitol salt agarda üremenin gözlenmesi için 48-72 saat arasında inkübasyon gerekebilmektedir (Cengiz, 1999).

Günümüzde *S. aureus*'ların identifiye edilmesinde tüp koagülaz test yöntemi referans kabul edilmiştir. Tüpte ve lamda koagülaz yöntemleri dışında özgünlüğü ve hassasiyeti yüksek plazma ile kaplanmış latex parçacıklarının kullanıldığı latex aglünitasyon, fibrinojen ile hassaslaştırılan koyunların eritrositlerinin kullanıldığı pasif hemaglinitasyon gibi farklı koagülaz testleri de geliştirilmiştir (Forbes, Sahm ve Weissfeld, 2002; Hazımoğlu, 2011).

2.2.1. *S. aureus*'un virülans faktörleri

Stafilokok türleri arasında virülans özelliği en yüksek tür olan *S. aureus*'tur. Enfeksiyon oluşturup oluşturmayacağı bakterinin virülansına ve konak immün sistemin aralarında oluşturacakları ilişkiye bağlıdır. *S. aureus*'un virülans özellik kazanmasında hücre duvar yapıları, kapsül, yüzeye ait proteinler, enzim ve toksinleri gibi etkenler önemli bir yer tutmaktadır (Akan, 2006).

Stafilokoklar konak hücreye giriş yaptığında bağışıklık sistemi hücresi olan nötrofiller bu mikroorganizmaları yakalarlar. Bundan dolayı Stafilokokların virülans faktörleri çoğunlukla hücre içi ölümlerden veya fagositeden korunmadan sorumludur. Virülans faktörlerin birçoğu

klirik vakaların meydana gelmesinden sorumludur. Enfeksiyon esnasında farklı hastalıkların da varlığı stafilokokal hastalıkların patogenezi artırır (Peacock, 2006; Ilgaz, Ak, Özgür ve İkiz, 2011). Stafilokok türlerinin hücre duvar yapısı standart Gram (+) bakterilerin hücre duvar yapısıyla aynı olup, hücre duvarının ana elemanlarını peptidoglikan tabaka ve teikoik asit oluşturmaktadır (Ilgaz ve diğerleri, 2012).

Peptidoglikan tabaka; bakterinin kuru ağırlığının yarısını oluşturmaktadır. N-asetilglukozamin (NAGA) ve N-asetilmuramik asit (NAMA) polimerlerinin oluşturduğu bir disakkarit çeşididir. Peptidoglikan tabaka bakteri için ozmotik basıncı dengeleyerek bakteriye özgün şeklini verir, yapısındaki sertliği sağlar ve hücreyi lizis olayından korur. Ayrıca peptidoglikan tabakası makrofajlardan sitokin salınımını uyarak komplement aktivasyonuna ve trombosit agregasyonuna neden olmaktadır. Bir başka etki olarak monositlerden interlökin (IL)-1 salınımının uyarılması olarak belirtilmiştir (Peacock, 2006).

Teikoik asit; Gram pozitif bakterilere özgü olan ve ribitol veya gliserol fosfat polimerlerinin birbirlerine fosfodiester bağlarının bağlanması sonucunda oluşmaktadır. Bu eleman, peptidoglikan tabakanın içinde ve bakteride konak hücrenin adezyonunda görev almaktadır. Teikoik asit tek başınayken zayıf bir immunojen iken, peptidoglikan tabakayla birleşince spesifik antikor yanıtını oluşturacak kadar güçlü bir virulans faktörüne dönüşebilmektedir. *S. aureus* türünde iki çeşit teikoik asit bulunur. Bunlardan ilki peptidoglikan tabakaya kovalent bağlarla bağlanan hücre duvarı teikoik asididir. İkincisi ise stoplazmik membran glikolipitleriyle bağ kuran hücre zarı teikoik asididir (Peacock, 2006; Ilgaz ve diğerleri, 2012; Yılmaz, 2019).

Kapsül; Ekzopolisakkarit bir yapısı olan, bakterinin fagozite edilmesini koruyan ve bakterinin elverişli yüzey ortamlarına tutunmasını sağlayan bir yapıdır. *S. aureus*'un günümüze kadar tanımlanmış 11 çeşit kapsül serotipinin olduğu belirlenmiş ve bunlardan tip 5 ve tip 8 serotipleri insanlarda enfeksiyonlardan ve sığırlarda mastisitlerden sorumlu tutulmuştur (Sutra ve Poutrel, 1994; Yılmaz, 2019).

Protein A; *S. aureus* suşlarında farklı iki formu olan bir yüzey proteinidir. Birincisi peptidoglikan tabakaya kovalent bağ ile bağlanan hücre yüzeyine bağlı protein A, ikincisi ise etken üretilme esnasında ortama salınan protein A'dır. Protein A için önemli özellik immunglobulinlerin (IgG1, IgG2, IgG4, IgA2, bazı IgM), Fc (kristalize fragment)

reseptörlerine bağlanıyor olabilmesidir. Bu özellik sayesinde güçlü immunojenik yapıya sahip olan protein A komplemanı aktive ederek antifagositik, kemotaktik ve mitojenik etkileri meydana çıkarmaktadır. Hücrenin dışına salınan protein A fragment (Fc) reseptörleri ile birleşerek bakteriyi fagosite edilmekten korumaktadır (Peacock, 2006).

Slaym üretimi (Slime üretimi); slaymın üretiminin olması *S. aureus* için oldukça önemli bir patojenite faktörüdür. *S. aureus*'un konakçı hücreye kolonize olmasında ilk basamak yapışma olarak tanımlanır. Bakteriler yapışmayı matriks moleküllerini tanıyan mikrobiyel yüzey bileşenleri (MSCRAMM) molekülleriyle yapmaktadır. Fakat hedefe ulaşmak için farklı bir yol olarak biyofilm üretmektedirler. Bu yapının ince olması, hücre duvarından ayrık olması ve kolayca ayrılması halinde ise bu tabakaya slaym tabakası denilmiştir. Slaym tabakasının %97'sini su oluşturmakla birlikte %1-2 protein, %1-2 polisakkarit, %1-2 DNA ve iyonlar içermektedir. Bu bileşenlerin bazısının eksik olması halinde slaym tabaka oluşmamaktadır (Yüksekdağ ve Baltacı, 2013).

Slaym tabaka bakteriyi kaplayarak immun sistem elemanlarından ve ajanlardan korur. Bu tabakanın kemotaktik etkisinin olmasıyla birlikte slaym tarafından gönderilen polimorf çekirdekli lökositlerde miyeloperoksidaz salınımının yeterli olmadığı belirtilmiştir. Bu durum bakterinin, hücre içinde uzun süre kalmasına ve fagozite edilmeden korunmasına sebep olmaktadır. Ayrıca, slaym üreten mikroorganizmalarla oluşan enfeksiyonlarda antibiyotiklerin kullanılması yetersiz kalmakta ve kronik enfeksiyonların sıklığı artmaktadır (Christensen, Baldassari ve Simpson, 1994; Hazımoğlu, 2011).

2.2.2. Enzimler

Stafilokoklar konakçı hücrede kendileri için avantajlı çeşitli enzimleri üretme özelliğine sahiptir. Bu enzimler sayesinde Stafilokokların yayılması kolaylaşarak enfeksiyon patogeneğinde görev alırlar (Peacock, 2006).

Katalaz enzimi

Stafilokokların birçoğu oksijenin varlığında yaşamlarını devam ettirebilmeleri için katalaz enzimi üretmektedirler. Katalaz enzimi Stafilokokların çoğunluğu tarafından salgılanan hidrojen peroksidi (H_2O_2), oksijene ve suya ayırtıran bir enzimdir. Ayrıca

mikroorganizmalar, katalaz enzimi sayesinde fagositlerden kaçarak öldürülmelerine direnç gösterirler (Dalkılıç, 2016; Kayılı, 2020).

Koagülaz

Stafilokokların salgıladığı plazma pıhtılaşma proteini olan koagülaz, *S. aureus*'un bütün suşlarında pozitifdir. Koagülaz proteinini belirlemek için lam ve tüpte koagülaz testleri uygulanmaktadır. İki tür koagülaz bulunmaktadır bunlar; serbest koagülaz ve bağlı koagülazdır. Koagülaz negatif olan türlerin clumping faktörün (kümeleştirme faktörü) etkisiyle testin pozitif çıkabileceği de bilinmelidir. Günümüzde *S. aureus*'ların identifikasyonunda tüp koagülaz testi kullanılmaktadır. Koagülaz pozitif stafilokoklarda (KPS) gelişen kalın fibrin tabakası, bakteriyi fagositlerden koruyarak patojeniteyi artırmaktadır (Alen ve diğerleri, 2006).

Lipaz

S. aureus suşlarının tümünde ve koagülaz negatif stafilokoklarda %30'dan fazlasında üretilmektedir. Lipaz enzimi yağları hidrolize ederek stafilokok türlerinin yağ oranı fazla olan ortamlarda gelişmesini sağlamaktadır (Doğan, 2014; Yılmaz, 2019). Lipaz inhibitörlerinin *S. aureus* türünde biyofilm oluşumunu azalttığı belirtilmiştir (Bozan Bayrak, 2019).

Hiyalüronidaz enzimi

S. aureus suşlarının %90'ının ürettiği bu enzim yayılma faktörü olarak da tanımlanmıştır. Bu enzimin varlığı, konakçı bağ dokusunda var olan ve bağ dokunun koruyuculuğunu yapmakta olan hiyalüronik asiti ayrıştırarak mikroorganizmanın dokulara yerleşmesini ve dokularda kolayca yayılımını sağlamaktadır (Akan, 2006).

Deoksiribonükleaz (DNaz)

DNaz enziminin salınımı patojeniteyi etkileyen önemli bir özelliktir. Patojenik mikroorganizmalardan stafilokokların ayrılmasında oldukça önemlidir. *S. aureus* suşlarının %90'ından fazlasında bulunan bu enzim endo ve ekzonükleaz aktivitesine sahip, nükleik

asitleri parçalayan fosfodiesterazlardır. *S. aureus* izolatları DNA'nın olduğu besiyerinde DNaz enzimi sayesinde ortamdaki DNA'ları parçalar ve üreme gösteren kolonilerin çevresinde opak bir zon oluştururlar (Muratoğlu, 2010).

Lesitinaz

S. aureus'ların çoğunluğunun salgıladığı lestinaz enzimi, yumurta sarısı ve insan serumunda bulunan lipoprotein bileşimini ayrıştırma özelliği vardır (Muratoğlu, 2010).

Betalaktamaz (Penisilinaz)

Betalaktamaz, stafilokok türlerinin beta laktam grubu antibiyotiklere karşı kazandığı dirençte oldukça etkili olan bir enzim türüdür. Bu bakterilerin salgıladıkları betalaktamaz (penisilinaz) sayesinde, beta laktam grubundaki antibiyotiklerin β -laktam halkasının hidroksil grubu parçalanır ve antibiyotikler işlevsiz duruma gelirler (Akan, 2006).

Fibrinolizin (Stafilokinaz)

Stafilokokların salgıladıkları kinazlar, plazmada var olan plazminojeni aktif hale getirerek plazmin oluşturur. Fibrinolitik etkileri sayesinde fibrini parçalarlar ve organizmanın yayılmasına yardım ederler (Alen ve diğerleri, 2006).

2.3. Enfeksiyon Dozu ve Patajonitesi

S. aureus intoksikasyonlara neden olmasında etkili infeksi doz 10^6 - 10^7 kob/g^{ml} olması gerekmektedir. Mikroorganizma gıda maddesinde üreme ve gelişme göstererek bu doz seviyelerine çıkar. Bu seviyeye geldiğinde toksin, gıda maddesi üzerinde intoksikasyonlara neden olacak dozu üretmiş olur. *S. aureus* ile kontamine olmuş yiyecekleri yedikten sonra toksin emilir ve klasik gastroenteritin oluşmasına sebep olur. Mide mukozasındaki toksinler emetik merkezini uyarırken vagus siniri ve medullayı uyararak güçlü emetik etki bir durum yaratır. Ayrıca enterotoksinler bağırsak epitel hücrelerine zarar verir, bağırsak villuslarını yıkmaktadır. Stafilokokların intoksikasyonlarında semptomlar kusma hissi, karında ağrı ve mide bulantısıyla başlamaktadır. İntoksikasyonun daha ağır olduğu durumlarda kusuntuda ve dışkıda kana rastlanabilmektedir. İntoksikasyonlarda rastlanan, başta ağrısı, terleme,

titreme, halsiz olma, adelelerde kasılma, kalp hızında düşme ve şok gibi durumlar diğer semptomlardır. Vücut ısısının düşmesiyle birlikte sıvı kaybı da yükselmektedir. İntoksikasyonun semptomları gıda vücuda alınımını takiben ilk 6 saat aralığında ortaya çıkmaktadır. Genelde bu semptomlar 1-2 günde kendiliğinden geçmektedir (Sutherland ve Varnam, 2002).

Stafilokokal enterotoksinlerin etkileri kişiden kişiye değişmektedir. Aynı dozda toksin alan kişilerin kimisinde belirtiler görülmezken, kimilerinde hafif ya da çok ağır tablolarla karşılaşmaktadır. Süt çağındaki bebeklerde, ileri yaş düzeyinde ve bağışıklık sistemi düşük kişilerde bulaşma düzeyi düşük bile olsa yine sağlık problemleri görülmektedir. Stafilokokal enterotoksinlere karşı insanların, kedilerin ve maymunların daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (Bilgehan, 2000; Erol, 2007).

2.3.1. Enterotoksinler

1914 yılında ilk kez tanımlanan enterotoksinler, Barber'in stafilokokal mastitisli inekten sağılan sütün tüketimi sonucu mide bulantısı ile seyreden şikayetler sonucu fark edilmiştir. Enterotoksinler, birer ekzotoksin olup asıl gastrointestinal sistemi etkilediği için enterotoksin tanımı yapılmıştır (Marth ve Halpindohnalek, 1989).

Stafilokokal enterotoksinlerin en önemli özelliği ısıya karşı direnç göstermeleridir. Bu toksinler, ısı işleminden sonra da biyolojik aktivitelerine devam ederler. Stafilokokal enterotoksinlerine ısıya karşı gösterdikleri direnç ile yapılan araştırmalarda 100 °C sıcaklığa 30 dakika dayanabildikleri gözlemlenmiştir. Enterotoksinler; makrofaj ve yardımcı T hücrelerinden, sırasıyla IL-1 ve IL-2 salınımını yaparak sindirim kanalında süper antijen olarak görev yaparlar. Stafilokokal enterotoksinlerin adlandırılması keşfedilme sıralarına göre alfabetik olarak yapılmıştır. *S. aureus*'lar A, B, C, D, E, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, R ve U gibi çok çeşitli toksinler üretebilmektedir. Ancak gıda zehirlenmelerinden %95'ten fazlasında sorumlu görülen toksinler; stafilokokal enterotoksin olarak tanımlanan SEA, SEB, SEC, SED, SEE toksinlerdir (Pelisser, Klein ve Ascoli, 2009).

SEA toksini, bakterinin logaritmik evresinin ilk devresinde gerçekleştiği için çevre koşulları uygun olmasa bile intoksikasyon oluşturacak seviyeye çıkmaktadır. Bundan dolayı stafilokokal kaynaklı gıda intoksikasyonlarında en yaygın görülen toksini SEA toksinidir.

SEA'nın kodlanmasında görevli *entA* genini bir bakteriyofaj taşımaktadır. Bu faj sirkularizasyon ve ortak gen aktarımı neticesinde bakterinin kromozomuna dahil olmaktadır. *entA* geni fajın bağlantı noktasına yakın yerde yerleştiği belirlenmiştir. Bu geni 771 baz çifti oluşturmakta ve enterotoksin A prökürsörünün kodlanmasında 257 aminoasit kalıntısı ile olduğu açıklanmıştır (Balaban ve Rasooly, 2000).

SEB toksininin salgılanmasında görevli *entB* geni vardır. Bu genin şifreleme kısmına ait 900'e yakın nükleotit bulunmaktadır. *entB* geni bakterinin diğer suşlarında 750 kilobaz içeren bir plazmit aracılığıyla taşınmaktadır. SEB'e ait prekürsör protein yapılarını 267 aminoasit oluşturmakta ve 27 aminoasitten meydana gelen N-terminal sinyal peptidini bünyesine almaktadır (Erol ve İşeri, 2004).

SEC toksininin antijenik olarak SEC1, SEC2 ve SEC3 olacak şekilde 3 farklı alt birimi vardır. SEC toksininin hepsi 801 baz çiftinden ve 27 rezidülük bir sinyal peptitten oluşmaktadır. SEC1 ve SEC2 toksinlerinin sinyal peptidleri birbiriyle uyum içindedir. SEC3 ile SEC1 toksini arasında %98'lik bir nükleotid dizi benzerliği tespit edilmiştir (Erol ve İşeri, 2004).

SED toksini, gıda kökenli intoksikasyonlardan izole edilen toksinler arasında en sık görülen ikinci toksin türüdür. SED toksini sentezleyen *entD* genidir ve bu genin penisilinaz plazmidinde yer aldığı belirtilmiştir. *entD* geni 30 aminoasitlik sinyal peptidini barındıran 258 aminoasitin şifrelenmesini sağlar. 228 aminoasitlik ergin polipeptidler başka SE'lerin sıralanışına çok benzemektedir (Erol ve İşeri, 2004).

SEE, *entE* geni aracılığıyla 26 kDa molekül ağırlığı olan ergin proteinler tarafından sentezlenmektedir. DNA sekans analizlerinde, SEE, SED ve SEA toksinlerinin birbirlerine benzedikleri belirtilmiştir. SEE ile SEA arasında çok benzer bir dizilim bulunmaktadır. SEE toksinleri, stafilakokal gıda kaynaklı intoksikasyonlara çok sebep olmamaktadır (Balaban ve Rasooly, 2000).

Toksik şok Sendrom Toksin-1 (TSST-1), TSST-1 sistemik olarak salgılanan süper antijen olarak kendini gösteren protein yapıları bir toksindir. *S. aureus* suşlarının yaklaşık % 1'inin oluşturduğu Toksik Şok Sendromu Toksini (TSST-1), birden fazla T lenfositinin klonal oluşumu sağlayarak çok fazla sitokin salınımına sebep olurlar. Toksik şokun klinik belirtileri

bu sitokinin artmasıyla meydana gelir. Son zamanlarda koagülaz negatif stafilokokların da toksik şok sendromuna sebep oldukları bildirilmiştir (Alen ve diğerleri, 2006; Selçuk, 2018).

2.3.2. Toksinler

Stafilokoklar, konakçı hücrenin yapısını veya işlevini etkileyecek birçok ekstrasellüler toksin salgılayabilir. Bu toksinler sayesinde stafilokoklar inflamatuvar yanıtın çok olduğu alanlarda gelişimlerine devam edebilirler. Bunlar arasında en çok bilinenler hemolizinler ve lökosidinlerdir (Cengiz, 1999).

Hemolizinler

Hemolizinler, çeşitli hayvan eritrositlerinin hemolitik etki oluşturup oluşturmamalarına, hemoliz için gereken ısıya ve süreye, toksisite derecelerine göre farklılıklar gösterebilmektedir. Hemolizin grupları *S. aureus* suşlarının çoğunda vardır ve kromozom üzerinde kodlanmıştır. Bu toksinlerin dört tipi vardır. Bunlar alfa, beta, gamma ve delta hemolizinlerdir (Hazımoğlu, 2010).

Alfa Hemolizin

S. aureus türünün en özgün virülans faktörü olan α -hemolizin *hla* geni tarafından kodlanmaktadır. İlk kez 1990'da Krauss ve Clairmont tarafından tanımlanmıştır. Gözenek oluşturucu olarak bilinen ilk bakteriyel ekzotoksin türüdür. Kanlı agar besiyerinde üreyen *S. aureus* kolonilerinin çevresinde tam hemoliz oluşumunda görev alır. α -hemolizin eritrositler, lökositler, trombositler, epitel hücreler gibi birçok dokunun membranlarını parçalayabilmektedir. İnsanların makrofajları ve trombositleri üzerinde litik etki yaratmasına karşılık monositlere karşı etkileri yoktur (Muratoğlu, 2010).

Beta Hemolizin (Beta Toksin, Sfingomyelinaz C)

1935'te Glenny ve Stevens tarafından ilk kez tanımlanmış toksin türüdür. Hücre zarında var olan sfingomiyelin ile eritrositler, lökositler ve fibroblastlar üzerine etkili olan bir toksin çeşididir. α -toksinle beraber sfingomiyelini etkileyerek eritrositleri parçalayabilirler. Bu toksin için en önemli özellik sıcak-soğuk lizis yapabilmeleridir. Isı düşmesiyle birlikte

hemolitik aktivitesi artar. En kuvvetli litik etkisi sığır ve koyun eritrositlerinde görülmektedir. Sığırlarda mastitis vakalarında önemli bir rolü olan virülans faktördür (Muratoğlu, 2010; Al-Mebairik, El-Kersh, Al-Sheikh ve Marie, 2016).

Gama hemolizin (γ toksin)

1938’de Smith ve Price tarafından ilk defa tanımlanmıştır. Lökositinlerle beraber çalışan iki tamamlayıcı proteindir. Birlikte çalışarak duyarlı olan hücrelere zarar verirler. İnsan, tavşan ve koyunların eritrosinlerinde etkileri büyüktür. Gama hemolizin patojenitedeki etkisi tam belirlenememiş olup nötrofiller üzerinde sitotoksik etkisi enfeksiyonun ilk evreleriyle ilişkilendirilmektedir (Özpınar, 2011; Yılmaz, 2019).

Delta Hemolizin (Delta Toksin)

Hücre membranının bütünlüğünü bozar ve adenilat siklazı aktif hale getirerek CAMP salgımasına sebep olur. Bu aktivite sonucunda, Stafilokokal Toksik Şok Sendromu (TSSS) ve stafilokokal gıda intoksikasyonları meydana gelir. İnsan, tavşan ve maymunların eritrositlerinde etkisi vardır. Ayrıca, lökosit, makrofaj, lenfosit ve trombositler için hasara neden olur. Alfa ve delta toksinler insanlar için en çok enfeksiyona neden olan stafilokok suşlarıdır (Müştak ve Esendal, 2008).

Lökositinler

Stafilokokları fagosite edilmeye karşı koruyan, enfeksiyonların oluşmasında önemli bir rolü olan virülans faktörüdür. Lökositinler, fast (F) ve slow (S) olmak üzere iki komponentten oluşur. Bu komponentlerin litik etki yaratabilmesi için birlikte olmaları gerekir. *S. aureus* için en önemli toksin Panton-Valentine Lökositin (PVL)’dir. PVL, *S. aureus*’un salgıladığı birkaç hücre dışı sitotoksinden biridir. Bu toksini ilk kez Van de Velde (1894) tanımlamış olsada, 1932 yılında Panton ve Valentine tarafından lökositinin cilt ve yumuşak doku enfeksiyonuyla alakalı olduğu belirtilmiştir (Bien, Sokolova ve Bozko, 2011; Doğan, 2014).

Eksfoliyatif Toksin

Ekzotoksin yeterliliğinde lan protein yapısında bulunan bir toksindir. Antijenik olarak ET-A ve ET-B olarak iki türü vardır. A tipi (eta) kromozomal, B tipi (etb) plazmide bağlanan genler tarafından oluşturulmaktadır. Eksfoliyatif toksinlerin (ETs) etkisi en çok yenidoğan ve bebekler üzerinde olmuştur. Bu toksinler deri tabakalarının kayıp olmasına ve Staphylococcal haşlanmış deri sendromuna sebep olmaktadır. Bu durumda organizmanın toksine karşı oluşturduğu immun yanıt sonucu deri lezyonları oluşmaktadır (Ladhani, 2003).

2.4. *S. aureus*'un Etken Olduğu Enfeksiyonlar

S. aureus insan ve hayvanlarda farklı toksinler üretmesi nedeniyle birçok hastalığın görülmesinde etken olarak değerlendirilmiştir. *S. aureus* kaynaklı bazı enfeksiyonlar aşağıda Çizelge 2.3'te özet halinde verilmiştir (Murray, Rosenthal ve Kobayashi, 2002; Selçuk, 2018).

Çizelge 2.3. *S. aureus*'un etken olduğu enfeksiyonlar ve semptomları (Murray, Rosenthal ve Kobayashi, 2002)

Enfeksiyon	Semptomları
Gıda kaynaklı intoksikasyon	Isıya dirençli enterotoksinlerle kontamine olmuş gıdaların diyetinden sonra ortaya çıkmaktadır. Midede bulantı ve karında ağrı ile kendini belli eder.
Haşlanmış deri sendromu	Eksfoliyatif toksinlerin oluşturduğu bu hastalık, ağzın çevresinden başlayarak vücuda yayılan deri kızarıklığıyla kendini belli eder.
Toksik şok sendromu	TSST-1 üreten şuşların sorumlu olduğu bu sendrom, şiddetli kas ağrısı, yüksek ateş, kusma ve diyare ile belirir.
İmpetigo	Yüz ve el- ayak gibi vücudun açıkta kalan bölgelerinde oluşan iltihaplı lezyonlardır.
Folikülüt	Kıl kökünde oluşan lokalize, küçük kırmızı, ağrılı ve irinli enfeksiyonlardır.
Fronkül	Kıl kökündeki follikülütlerin bir araya gelmesiyle oluşur.
Karbonkül	Fronküller bir araya gelerek enfeksiyonun deri altına geçmesine neden olur.
Apse	Çevresi kırmızı üzeri püstül ile örtülmüş, dermis ve epidermiste biriken şişkinlik

Çizelge 2.3. (Devamı)

	oluşturan irinlerdir. <i>S. aureus</i> deri apselerinde %25 oranında sorumlu tutulmuştur.
Yara enfeksiyonları	Ameliyat veya travmadan sonraki günlerde ilerleyici şişlik, yara çevresinde kızarıklık ve şiddetli ağrı ile seyreden bir enfeksiyondur.
Osteomyelit	Ergenlik öncesi dönem çocuklarında görülen osteomyelitin çoğunluk etkeni <i>S. aureus</i> 'tur. Uzun kemiklerin metafizlerinde ateş ve ağrıya neden olur.
Bakteriyemi	Stafilokokların yol açtığı nazokomiyel kaynaklı bakteriyemilerde, kateterler ve invaziv giriş yolları etkindir. Enfeksiyon kana geçerek oluşur.
Endokardit	Kalpteki endotel tabakanın zarar görmesine bağlı, yüksek ateş, kalp üfürümü, miyokard apsesi, metastatik hastalıklar, bilinç kaybı, akut bakteriyel menenjit ve kalp yetmezliği belirtiler ortaya çıkar.
Pnomoni	<i>S. aureus</i> pnömonisi, influenza gibi alt solunum yolu enfeksiyonlarından sonra rastlanır.
Ampiyem	Plevral ampiyemin oluşmasında <i>S. aureus</i> en çok gözlenen etkenler arasındadır. Pnomoni belirtilerinin yanı sıra göğüste ağrı, ateş, zor nefes alma, hızlı kap ayımı ve taşikardi ve plörezi gibi semptomlar oluşur.
Septik artrit	Eklem bölgelerinde gerçekleşen tutulumla birlikte gelişen, eklemlerde şişlik, ısı artışı ve ağrılı enfeksiyonlardır.

2.5. Hayvansal Kökenli Gıda Ürünlerinde *S. aureus* Varlığı ve Bulaş Yolları

S. aureus burun ve faringeal boşlukları kaplayan mukozal dokularda yaygınca bulunur. Cilt üzerinde yüz, eller, kollar, insan veya hayvan dışkısında özellikle apse oluşturan yaralarda, akne ve irinlerde bol miktarda bulunur. Boğaz kültürünün bulunduğu bölgenin baskın florası arasında *S. aureus* 'a da rastlanmaktadır. Bu bölgeden elde edilen izolatların yaklaşık %20'sinde enterotoksinler bulunur. Genel manasıyla insan ve hayvanlarda stafilokokların birçoğu ve *S. aureus* olmak üzere doğal flora olarak bulunmakta ve bu mikroorganizmalara doğal yaşam alanı oluşturmaktadır (Uğur, Nazlı ve Bostan, 2001: 52-55).

S. aureus'un gıdalar ile kontaminasyonunda, insanlardan bulaş şekli direkt olarak temas ile ya da dökülen deri parçalarından ya da öksürük hapşırık gibi solunum yolundan çıkan damlacıklar vasıtasıyla olmaktadır. Hayvansal içerikli besinlerin hazırlık aşaması, muhafaza edilmesi gibi durumlarda kontaminasyon riski oluşmaktadır. Gıdaların hazırlık aşamasında kullanılan kesme tahtası, bıçaklar, et doğrayıcılar, saklama kutuları gibi malzemelerin yetersiz temizlik ve hijyen uygulamaları sonucu bu mikroorganizmanın bulaşmasına, gelişmesine neden olmaktadır (Uğur ve diğerleri, 2001; Erol 2007).

Yiyecekler, pişirme yoluyla rakip florayı kaybetmelerini takiben, pişirilmemiş yiyeceklere bulaşması insan teması veya yeniden kontaminasyon ile ilgilidir. Bu durum neticesinde uygun sıcaklıklarda *S. aureus* çoğalmasına kolaylık sağlar (Çelik, 2012).

Süt ve süttten elde edilen gıda maddelerinde *S. aureus* varlığı

Süt ve süt ürünlerinden yapılan gıdalar *S. aureus* üremesi için çok elverişli bir ortamdır. Çiğ sütte kendiliğinden bulunan *S. aureus*, yeterli pastörize edilmeyen sütlerde ve ekipman-personel kaynaklı kontaminasyon sonucu diğer süt ve süt ürünlerini de kontamine edebilmektedir. Özellikle mastitisli hayvanların sütlerinde enteropatojenik *S. aureus* suşlarının daha çok oldukları görülmüştür. *S. aureus* kaynaklı gıda intoksikasyonları süt ürünlerinden büyük oranda peynir ve süt tozu gibi ürünlerden kaynaklandığı belirtilmektedir (Erol, 2007).

Et ve etten elde edilen gıda maddelerinde *S. aureus* varlığı

Önemli bir kontaminasyon sebebi olan hayvanlar, hayvansal içerikli gıdaları kontamine edebilmekte ve bu etkenin yaşamasına uygun ortamlar oluşturmaktadır. Hayvanların derilerinden tüylerinden ve mukozalarından bu etken bulaşmaktadır. Kesimhanelerde etlerin kesimi sırasında derinin yüzülmesi esnasında karkasın kontamine olma riski çok yüksektir. Kesim aşamasında ihtiyaç olan bıçaklar, masatlar, karkasların takıldığı kancalar gibi aletlerin de önemli bir kontaminasyon kaynağı olduğu belirtilmiştir. Bu malzemelerin haricinde görevlilerin elleri ve giydikleri kıyafette bulaş riskini artırmaktadır (Koçak Kızanlık, 2019).

Kanatlı etlerinde *S. aureus* varlığı

Kanatlı etlerinin bu mikroorganizma ile kontamine olmasında, kanatlıların ayakları ve tüyleri, kesimde kullanılan malzemeler ve görevliler etkilidir. Kanatlıların kesimi sırasında tüyler yolunurken, tüy yolma makineleri ve karkaslar ile bu mikroorganizma arasında çapraz kontaminasyon oluşmaktadır. Bu makinalara ve aletlere yeterli temizlik yapılmadığı sürece etken bu ortamlara kolonize olur ve devam eden kesimleri de risk altına alır (Erol, 2007). Kanatlı etlerinde *S. aureus* yaygınlığı ile yapılmış birçok çalışma mevcuttur.

2.6. Biyofilmin Tanımı ve Yapısı

Uzun yıllardır mikrobiyoloji alanında bilim insanlarının çalışmalarında, bakterilerin soliter (plankton) ve antisosyal varlıklar olduğu biliniyordu. Ama bu popüler inanın aksine, doğal ortamda yaşayan bakterilerin bir ekstraselüler matriks üreterek biyofilm yapısı oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu yapı sayesinde kendi türleri arasında ve farklı bakteri türleriyle stresli koşullar ve antimikrobiyal ajanlara ve bağışıklık sistemine dirençli bir yaşam moduna geçmektedirler (Nadell, Bassler ve Levin, 2008).

Biyofilmler ilk defa 17. yy'da Hollandalı bir bilim insanı Van Leeuwenhoek'un kendi dış plağında varlığı kanıtlanmış ve "animacules" olarak isimlendirilmiştir. 1978 yılına gelinceye kadar biyofilmlerle ilgili çok fazla araştırma yapılmamıştır. Biyofilmlerin yapısındaki bakterilerin, belli bir yüzeye sınıksız bağlanmaları bir matriks içerisinde gelişim göstermeleri araştırmacıların bu alana yönelmelerine sebep olmuştur (Corcoran, 2013).

Biyofilmler; canlı ve cansız yüzeylere, arayüzeyler ve matrix kullanılarak birbirlerine geri dönüşümü olmayacak şekilde bağlanan, kendi kendilerine ürettikleri ekstraselüler polimerik matrikslere gömülü olarak bulunan, büyüme düzeyleri ve gen ifadelerinin kendi morfolojilerinden farklılık gösteren çok hücreli kompleks yapılardır (Donlan, 2002). Biyofilm yapısı sayesinde EPS'ye gömülü olarak hayatlarına devam mikroorganizmalar; bağışıklık sisteminin elemanları, antibiyotikler, patojenler tarafından üretilen antimikrobiyal ajanlardan fiziksel, kimyasal ve biyolojik strese karşı korumalıdır (Nouraldin, Baddour, Harfoush ve Essa, 2016).

Biyofilmin yapısı

Biyofilmler matrikslerinde yaşamlarına devam ederler. Bu matriksin yapısı ve yoğunluğu organizmanın türlerine göre değişkenlik gösterebilmektedir. Biyofilmlerin oluşabilmesi için gerekli mikroorganizmaya, glikokalikse ve yüzeye ihtiyaç vardır. Bu maddelerin herhangi birisinin eksikliği durumunda biyofilm oluşamaz (Donlan, 2002). Biyofilmin %97'lik büyük bölümünü su oluşturur. Matriksin diğer bileşenleri şunlardır; %1-2 EPS, %1-2 küresel glikoproteinler ve diğer proteinler, %1-2 nükleik asitler, lipitler, fosfolipitlerdir. Bununla birlikte, bu oranlar mevcut organizma türlerine bağlı olarak değişiklik gösterir (Allison, 2003).

EPS; bakterilerin yüzeylere bağlanması, hücreler arası etkileşimler, hayatta kalma ve genetik değişim gibi kritik süreçlerde görev alırlar. Özellikle de hücreler arası yakınlaşmayı sağlayan biyofilmler, plazmid transferinde temel mekanizma olan konjugasyonun gerçekleşmesine olanak sağlar (Harmsen, Yang, Pamp ve Nielsen, 2010). EPS viskoelastik özellikler sergiler ve proteinleri, Ca^{+2} iyonlarını ve polisakkaritleri bağlayarak biyofilm yapısını daha da güçlendirebilir. Hidrolazlar, liyazlar, glikosidazlar, esterazlar, vb. enzimler biyofilm bileşimini ve fiziksel özelliklerini etkileyebilir. Bu enzimlerin oluşturduğu düşük moleküler ağırlıklı bozunma ürünleri, biyofilm içerisinde yer alan mikroorganizmalara karbon ve enerji kaynağı olarak görev yaparlar (Hussain, Wilcox ve White, 1993).

EPS matriksi bir kalkan gibi biyofilm içindeki bakterileri elverişsiz şartlara karşı koruyuculuk etkisini sağlar. Biyofilmlerde meydana gelen bu EPS varlığı mikroorganizmaları tek hücreli durumlarına göre çevre koşullarına daha dirençli bir konuma getirdiği bilinmektedir (Heshmati, 2019).

2.6.1. Biyofilm oluşturma mekanizması

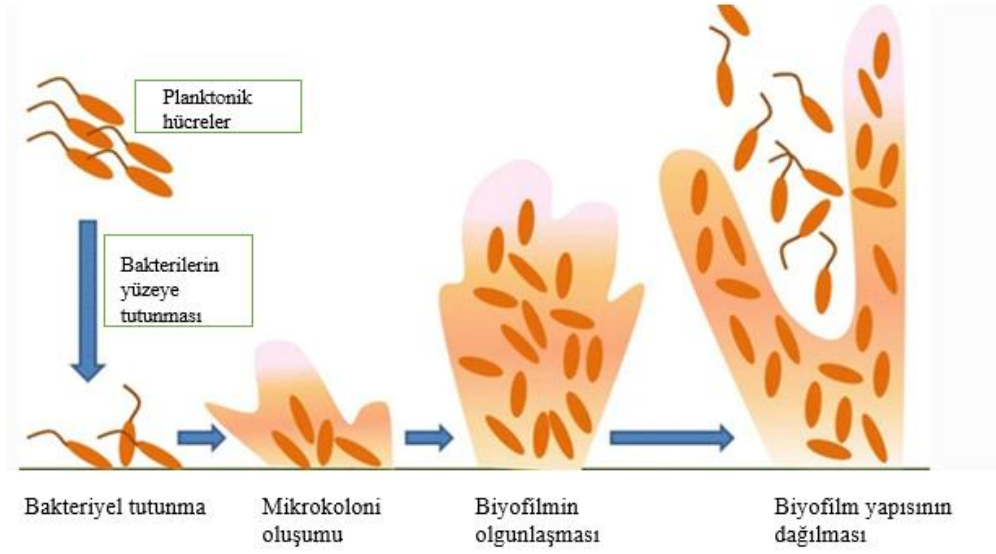
En basitinden bir biyofilm tabakası bile oldukça karmaşık yapılara sahiptir. Su kanallarından yiyecek ve oksijen akışı devam ettiği sürece biyofilm gelişmeye devam eder. Bununla birlikte, besin maddelerinin bitmesiyle yüzeylere bağlanma azalır ve bakteriler tek hücreli safhalarına geri dönerler. Biyofilm tabakası birbirini izleyen 5 aşamadan meydana gelir. Bunlar; dönüşümlü tutunma, dönüşümsüz tutunma, koloni oluşturma, biyofilmlerin olgunlaşması ve koparak ayrılmasıdır (Özer ve Ecem, 2014).

İlk adım bakteri hücresinin yüzeyle etkileşime geçerek yüzeye dönüşümlü olarak tutunmasıyla başlamaktadır. Burada biyofilm oluşturacak bakteriler yüzeyle tam bir temas kurmazlar. Bakteri hücreleri ve yüzey arasında uzun mesafede elektrostatik kuvvetler, hidrofobik etkileşimler Van der Waals kuvvetleri gibi olup zayıf etkileşim bağları kurulur. Yüzey ile ilk temasın kurulmasında hidrofobik interaksiyonların etkisi çok fazladır. Bakteri hücreleri bu aşamada, kolaylıkla yıkanılarak ve durulanarak uzaklaştırılabilirler (Gün ve Ekinci, 2009).

Bakteriler dönüşümsüz olarak tutunurken, hayatta kalmak için yüzeyde yeteri kadar besin maddesi arayışına çıkar. Yüzeye tutunmuş olan bakteri hücreleri hücre membranına bağlı proteinlerin uyarılması sonucunda EPS üretmeye başlar. Üretilen bu EPS'ler hücreleri birbirine ve yüzeye dönüşümsüz bir şekilde tutunmasını sağlar. Dönüşümsüz tutunma aşamasında dönüşümlü tutunmaya nazaran uzun mesafeli etkileşimler değil yüzeyle kısa mesafede etkileşimler sağlamaktadır. Bakteriyel hücreler, EPS oluşturmak için flagella ve fimbriae gibi organelleri içeren yüzeylere geri dönüşümsüz olarak bağlanır (Paulsen, 1999). Dönüşümsüz tutunma aşamasındaki biyofilm hücrelerini yüzeyden uzaklaştıran güçlü mekanik kuvvet, enzimler, dezenfektanlar, deterjanlar ve ısıtma uygulamaları gerekmektedir (Sinde ve Carballo, 2000).

Yüzeye tutunan bakteri hücreleri zamanla büyür ve gelişir. Daha sonra bölünerek biyofilmin yapıtaşını oluşturacak mikrokoloni birimlerini oluşturur. Hücrelerin ürettiği EPS, diğer tek başına yaşayan hücreleri de yakalayarak birlikte koloni oluştururlar (Paulsen, 1999). Bu safhada biyofilm hücreleri ortamdaki gıdaların da tesiriyle apartman ya da mantar şeklindeki yapılara dönüşürler. Bu yapılar, yüksek seviyelere kadar çıkar ve mikrokolonilerde su kanalları oluşturmaya başlar. Bu su kanalları sayesinde besin alışverişi ve atık ürünlerin uzaklaştırılması işlevi gerçekleştirilir (Chmielewski ve Frank, 2003)

Biyofilm oluşumunun son adımı olarak biyofilm hücrelerini yüzeyden koparak ayrılırlar. Bu aşamada hücreler tek başına yaşadıkları evreye geri dönerler (Sauer, Camper, Ehrlich, Costerton ve Davies, 2002). Bu koparak ayrılma dış kuvvetlerin etkisiyle de olabilir ya da biyofilmi oluşturan hücrelerin tek veya çoklu olarak kopmasıyla da oluşabilmektedir (Gün ve Ekinci, 2009). *S. aureus*'ta biyofilm oluşumunun mekanizmaları Şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1. *S. aureus*'ta biyofilm mekanizması (Gupta, Sarkar, Das, Bhattacharjee ve Tribedi 2016).

Biyofilm oluşum mekanizması, bakterilerin toplanıp bir yüzeye tutunmaları daha o yüzeye yapışmaları ve o yüzeyde var olan diğer türler ile beraber yaşadıkları şeklinde gerçekleşen tesadüfi bir olay değildir. Birçok canlı türü etkinliklerini koordine etmek amacıyla birbirlerine sinyal verirken küçük yayılabilecek molekülleri tercih ederler. Biyofilm oluşmasında önemli bir sistem olan “Quorum Sensing (QS), bakterilerin oluşturdukları sinyal moleküllerinin yoğunluğunu ölçebilmekte, etraflarındaki diğer bakterilerin miktarını hissedebilmekte ve elde ettikleri bu verileri diğerlerine iletmesine imkân sağlamaktadır. Bakteriler QS mekanizmaları sayesinde etraflarındaki bakteriyel popülasyonun yoğunluğunu belirler (Camara, 2007).

Quorum Sensing mekanizmalarının belirlenmesi ile bakteriler, sinyal moleküllerini kullanarak biyofilm oluşturdukları, antibiyotiklere karşı dirençli hale geldikleri kronik hastalıklara sebep oldukları belirlenmiştir (Bayrakal ve Baskın, 2018).

2.6.2. *S. aureus* ve biyofilm oluşumu

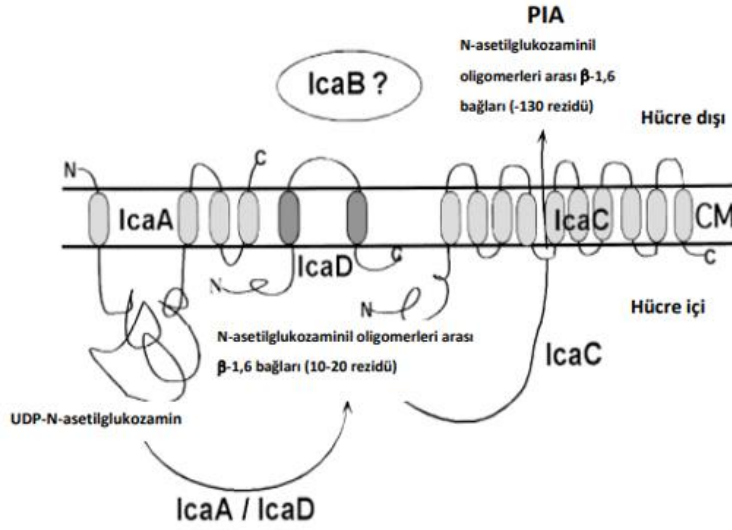
S. aureus'ta biyofilm oluşumunun gerçekleşmesi için, öncelikle hücrelerin bir yüzeye bağlanması gerekir daha sonra mikrokolonilerin de oluşumuyla biyofilm yapısına dönerler.

Biyofilm yapısının oluşması enerjik bir süreci kapsayan iki aşamadan meydana gelir. İlk aşamada bakteri hücrelerinin bir yüzeye tutunması ile gerçekleşir. Bu tutunmada MMSCRAMM'ler olarak bilinen yapışkan matriksleri tanıyan yüzey proteinleri görev alır (Foster ve Höök, 1998). MSCRAMM'ler hedef alınan yüzeye yayıldıktan sonra *S. aureus*'un değişik hücrelerine ve cansız yüzeylere yapışmasına yardım eder (Delmi, Vaudaux, Lew ve Vasey, 1994; Cucarella, Solano, Valle, Amorena, Lasa ve Penadés, 2001). İkinci aşamada ise hücreler arası yapışma gerçekleşmekte ve çok katmanlı hücre yığınları birikerek biyofilmi oluşturmaktadır (Patti, Allen, McGavin ve Hook, 1994).

S. aureus'ta biyofilm oluşmasından sorumlu *icaADBC* operonu bulunmaktadır. Bu operon poli-N-süksinil- β -1-6 glikozamin (PIA-PNSG) polisakkarit bağlanma matriksinin yapımından sorumlu tutulmaktadır. *icaADBC* operonunun ürettiği bu matriks biyofilm oluşumunun ikinci aşamasında hücreler arası yapışmayı sağladığı düşünülmektedir (Kiedrowski ve Horswill, 2011; Szczuka, Urbańska, Pietryka ve Kaznowski, 2013). Bundan dolayı *icaADBC* gen bölgesini bulunduran *S. aureus* suşlarının, biyofilm oluşturma şanslarının yüksek olduğu öngörülmektedir (Szweda, Schielmann, Milewski, Frankowska ve Jakubczak, 2012).

Bağlanmayı ve birikimi birkaç bakteriyel ve dışsal faktör etkilese de, polisakarit interselüler adezinler (PIA'lar) veya polimerik N-asetil-glukozaminler (PNAG'ler) olarak isimlendirilen hücre dışı polisakarit adezinlerin üretimi günümüzde stafilokoklar için en iyi bilinen biyofilm mekanizmasıdır (Mack ve diğerleri, 1996; Maira-Litran ve diğerleri, 2002).

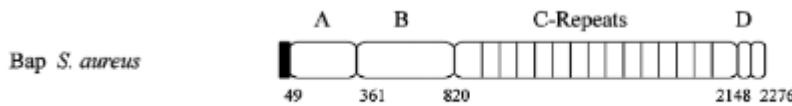
icaADBC operonunun *icaA* geni, PIA sentezlenmesinde lazım olan N-asetilglukozaminiltransferaz enziminin kodlanmasında görevlidir (Gerke, Kraft, Sussmuth, Schweitzer ve Götz, 1998). *icaA* geni tek başınayken düşük N-asetilglukozamin transferaz etkinliği göstermesine rağmen, *icaB* geni arasında yer alan *icaD* geninin sayesinde enzimatik aktivitede önemli bir yükseliş görülmüştür. *icaC* geni de deasetilasyon adımıyla hareket ederek PIA'ya özgü antiserumlarla reaksiyon verebilen oligomerlerin uzamasına katkıda bulunur. *icaB* geni deasetilasyon işlemi sırasında katalizör olarak çalışıp PIA'nın gelişiminden sorumludur (Jefferson, 2004; Götz, 2002). *İcaADBC* ve PIA sentezinin gerçekleştiği şekil Şekil 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.2. *icaADBC* ve PIA sentezi (Götz, 2002).

Biyofilm tabakalarının oluşmasında bazı yüzeyler proteinlerin önemli rol oynadığı bilinmektedir. *S. aureus* türlerinde farklı MSCRAMM'ler ile PIA ve biofilm associated protein *bap* gibi önemli diğer yüzey bileşenleri bulunmaktadır. *S. aureus* izolatlarından elde edilen *bap*, biyofilm tabakasının oluşmasında etkili bir proteindir (Cucarella ve diğerleri 2004).

bap, bakterinin yüzey kısmında oluşan, yüksek molekül ağırlığı olan, ardışık –C alanlarında bulunan biyofilm oluşturma yeteneği yüksek olan, 2276 aminoasitten oluşan bir proteindir. Enfeksiyon sürecinde de önemli bir rolü olması bu proteini öne çıkarır. *S. aureus*'a ait *bap* geninin şekli Şekil 2.3'te verilmiştir (Lasa ve Penades, 2006; Şahin, 2007).



Şekil 2.3. *S. aureus*'ta *bap* geni varlığı (Şahin, 2007)

Çalışmalar, cansız yüzeylere yapışmada ve hücreler arası adezyonda *bap* geninin işe yaradığını göstermiştir. Bu geni içeren *S. aureus* suşları diğer pozitif suşlardan daha güçlü biyofilmlere sahiptir (Cucarella ve diğerleri, 2004; Seixas, Santos, Bexiga, Vilela ve Oliveira, 2014).

2.7. Antibiyotikler ve Direnç

Antibiyotikler, mantar, bitki ve bakterilerin ürettiği, bazı mikroorganizmalara karşı inhibitör etkisi olan, enfeksiyonların etkilerinden korunmak için kullanılan, sentetik, yarı sentetik veya doğal yapılar olarak karşımıza çıkan kimyasal maddeler olarak açıklanmaktadır (Erdoğan ve Korukluoğlu, 2018).

Antibiyotikler, bakteriyel enfeksiyonlarla mücadelede kullanılan en yaygın ve güçlü bir etkidir (Catalán-Matamoros, Pariente ve Elias-Perez, 2019). Antibiyotikler, antibiyotiklerin keşfi ile 60 yılı aşkın bir süredir bakterilerle savaşmak için antibakteriyel ajanlar olarak kullanılmıştır. Ancak antibiyotiklerin ölçsüz veya şuursuz kullanımından kaynaklanan antimikrobiyal direnç artık global bir sağlık sorunu haline gelmiştir (Zang, 2019). Uzun süreli antibiyotik maruziyeti bakterinin hayatta kalmasına ve biyokimyasal ve fizyolojik olarak olumsuz durumlarda bile canlılığını devam ettirmesine olanak sağlamıştır (Yüce 2001, Abriouel, Knapp, Galvez ve Benomar, 2017).

Antibiyotik dirençliliği, mikroorganizmaların antimikrobiyal ajanların öldürücü ve büyümeyi inhibe edici etkilerine direnme yeteneği olarak tanımlanır (Erdoğan ve Korukluoğlu, 2018).

Mikroorganizmalar doğal direnç ve kazanılmış direnç olmak üzere iki tür antibiyotik direnci sergiler. Doğuştan gelen direnç veya birincil direnç olarak da bilinen doğal direnç, bakterilerin bir antimikrobiyal maddeye veya ilaca karşı duyarsız kalması olarak değerlendirilir ve genel olarak antimikrobiyal maddenin bakterinin hedef yapısını taşıyamaması veya ulaşamaması durumu olarak tanımlanır. Hücre duvar yapısı olmayan bakterilerde β -laktam sınıfındaki antibiyotiklere ve glikopeptidlere karşı direnç geliştirmesi veya Gram (-) bakterilerde vankomisine direnç gelişmesi doğal dirence örnek olarak verilebilir (Van Duijkeren, Schink, Roberts, Wang ve Schwarz, 2018).

Kazanılmış direnç ise, kromozomal, transpozon veya plazmit DNA'sındaki mutasyonlardan kaynaklanan direnç veya direnç genlerini başka bakterilerden taşıyan DNA dizilerinin transformasyon, transdüksiyon veya konjugasyon yoluyla edinilmesidir. Lincomycin, aminoglikozidler, eritromisin ve streptomisin direnci muhtemelen bu şekilde gelişir (Yüce 2001; Gür 2002).

2.7.1. Antibiyotiklerin etki mekanizmasına göre incelenmesi

Antibiyotikler, etki mekanizmalarına göre incelendiğinde beş grup karşımıza çıkmaktadır. Bunlar bakterinin hücre duvar sentezinin bozulması, azaltılmış hücre zarı geçirgenliği, protein sentezinde inhibe etkisi yaratanlar, nükleik asit sentezinin engellenmesi ve metabolik yolun bozulmasıdır (Reygaert, 2013).

Bakterinin hücre duvar sentezinin bozulması

Hücre duvarı sentezini tamamlamayan mikroorganizmalarda bu gruptaki antibiyotiklerin etkinliği yoktur. Mikroorganizmaların büyüme ve üreme fazında etkisi vardır. Peptidoglikan tabakanın polisakkarit zincirinde kros bağlanma aşamasında transpeptidasyon enzimlerine engelleyici etki oluşturarak hücre duvarı sentezine engel olurlar. Hem engelleyici hem de öldürücü etkileri vardır. Beta laktam grupları (karbapenem, sefalosporin, monobaktam, penisilin), glikopeptitler bu antibiyotiklerdendir.

Azaltılmış hücre zarı geçirgenliği

Antibiyotiklerin Etkisinin gerçekleşmesi için bu maddelerin bakteri hücrelerine nüfuz edebilmesi gerekmektedir. Antibiyotiklerin Gram (-)'lerde hücreye alınması dış zardaki porin vasıtasıyla gerçekleşmektedir. Dış zarda meydana gelen mutasyonlar geçirgenliğin azalmasına ve dirençli suşların gelişmesine neden olur. Lipopeptitler bu grup antibiyotiklere dahildir.

Protein sentezinde inhibe etki yaratanlar

Bazı antibiyotik grupları bakterinin 30S ya da 50S'lik ribozomal alt ünitelerine bağlanır ve protein sentezini engelleyici görev yaparlar. Aminoglikozitler, tetrasiklinler, kloromfenikol, linkozamid, makrolid, oksazolidinon ve streptogramin bu grup antibiyotiklerdendir.

Nükleik asit sentezinin engellenmesi

Nükleik asit sentezini engelleyerek bakteri hücrelerine hücum eden antibiyotiklerdir. Bu grup antibiyotikler kinolonlar ve florokinolonlardır.

Metabolik yolun engellenmesi

Mikrobiyal yolları engelleyen bileşiklerin kullanılmasıyla da etki mekanizması oluşmaktadır. Çoğunlukla aynı ilaçların kullanılması bakterilerde folat biyosentez yoluna odaklanmaya neden olur. Sülfanamid grubu bu yolun birazını engeller (Reygaert, 2013; Kayış, 2019).

2.7.2. Temel antibiyotik grupları ve direnç oluşumu

Beta- laktam direnci

Beta-laktam grubu antibiyotikler, bakteriyel hücre duvarı sentezi üzerinde antibakteriyel etkiler gösterir. β -laktam grubu antibiyotiklere karşı direnç oluşumunda iş başında olan iki önemli mekanizma vardır. İlk direnç mekanizması bakterilerin ürettiği penisilaz ve *blaZ* gibi enzimler tarafından hidrolize edilerek penisilin grubu bölünür ve beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı direnç oluşur. İkinci direnç mekanizması *mecA* geninden seztezlenen ve penisilin bağlayıcı proteinden kodlanan PBP (penisilin bağlayan protein), PBP2a proteinlerinin sentez aşamasında meydana gelen değişiklikler sayesinde direnç gelişmektedir.

PBP'deki değişiklikler, kromozomal mutasyonların bir sonucu olarak ortaya çıkar. Bu mutasyonlar, PBP'nin β -laktam antibiyotiklere direncinin azalmasına neden olur ya da afinitesi az olan PBP sentezlendirir (McCallum, Berger-Bachi ve Senn 2010; Keyvan, 2014).

Penisilin direnci

Penisilin antibiyotiklerine *S. aureus* direnci ilk kez 1941'de ortaya çıkmıştır. Bu direnç, penisilinin tedavi amaçlı kullanılmaya başlanmasından iki yıl sonra ortaya çıkmıştır. Penisiline dirençli izolatlar 1960 yılından sonra toplumsal ve klinik kaynaklı izolatların çoğunda saptanmıştır (Lowy, 2003).

S. aureus'lar penisilnaz oluşumu yoluyla penisilin direnci kazandıktan sonra, dönemin en sorunlu bakterilerinden birisi oldu. 1960 yılı itibariyle Penisilinaza dirençli yarı sentetik bir

penisilin türü olan metisilin piyasaya sürülmesiyle, MRSA suşları, Avrupa ülkelerinde de rastlanmaya başlamıştır (Lowy, 2003; Hartstein ve diğerleri, 2004)

S. aureus suşlarında penisilin direncinin β -laktamaz enzimi sentezleyen *blaZ* geninin varlığı sonucunda oluşmuştur. *blaZ* geninin reseptörü olan *blaI* regülatör geni ve antirepresörü olan *blaR1* genlerinin gözetimindedir. Bu enzim, β -laktam halkasının hidrolizi ile β -laktam antibiyotiklerini inaktive eden ve bu antibiyotiklere maruz kaldığında stafilokoklar tarafından sentezlenen ekstraselüler bir enzim olarak etkisini gösterir (Zetola, Francis, Nuermberger ve Bishai, 2005).

Metisilin direnci

Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA), enfeksiyonların başında gelen en önemli sebeplerden birisidir. Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'da elde edilen izolatların yarısında metisiline karşı direnç geliştiği gözlemlenmiştir. Metisilin dirençli stafilokokların sebep olduğu enfeksiyonlar, direnç geliştirmeyen suşlar ile kıyaslandığında daha fazla halk sağlığında harcamalara ve yüksek oranda morbidite ve mortaliteye yol açar. Yine metisilin dirençli stafilokoklardan kaynaklanan enfeksiyonlar, enfeksiyöz ajanlardan kaynaklanan ölümlerin önde gelen nedenlerinden biridir (da Silva, AC, Rodrigues, MX ve Silva, NCC 2020).

Amerika Birleşik Devletleri'nden bildirilen raporlarda her sene insan immün yetmezlik virüsünden (HIV) ölen insandan daha fazla insan metisilin dirençli stafilokok enfeksiyonlarından öldüğü bildirilmiştir. Bundan dolayı metisilin direnci insanlarda görülen enfeksiyonlarda ve hayvanlarda gözlemlendiğinde önemli bir sağlık sorunu oluşturur (Farias ve Frota, 2015).

MRSA'nın artık dünya çapında yaygın olması, antibiyotik direnç mekanizmaları edinme yeteneğiyle ilgili endişeleri artırmaktadır. MRSA çok kolay ve sıklıkla çoklu antibiyotiğe direnç gösterdiği için tedavi seçenekleri sınırlı kalmaktadır (Chambers ve DeLeo, 2009). MRSA enfeksiyonu başlangıçta hastane ortamında meydana gelmişti fakat klinik ortamlar dışında toplumsal kaynaklı vakalarda bildirilmiştir. Dirençli *S. aureus* prevalansının kanıtı, antibiyotiklerin yaygın olarak kullanıldığı hayvan çiftliklerinde ve hastanelerde görülüyor

olmasıdır. Böylece topluluklara ve çevreye kolayca yayılabilmektedir (da Silva, Rodrigues, ve Silva, 2020).

MRSA izolatlarının geneli beta laktam antibiyotikler başta olarak, aminoglikozit ve tetrasiklinlere de direnç geliştirmektedir. Beta laktam antibiyotikler bakterinin hücre duvarı yapısında bulunan PBP'yi öldürerek etkilerini ortaya çıkarırlar. Metisilinlere karşı dirençli ve direnç geliştirmeyen stafilokokların arasındaki esas fark penisilin bağlayıcı proteinlerden kaynaklanmaktadır. Metisilin direnci PBP-2 ya da PBP-2a proteinlerinin varlığıyla alakalıdır. Bu proteinler direnç göstermeyen türlerde rastlanmamaktadır (Witte, 1999).

S. aureus'arda metisilin direncinden sorumlu tutulan *mecA*, bu mikrobiyal sınıfın bütün beta-laktam antibiyotiklere dirençli olarak görülmesinin kanıtıdır. *S. aureus*'larda metisilin direncine, yeni bir penisilin bağlayıcı proteinleri (PBP), PBP-2a sentezleyen *mecA* geni kılavuzluk eder (Odalar, 2001).

PBP modifikasyonu ile ortaya çıkan metisilin direnci, beta-laktamlara karşı genel direnci yansıtır. Bu nedenle, metisiline dirençli stafilokokların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde beta-laktam antibiyotikler tercih edilmemektedir (Witte 1999).

Glikopeptid Direnci

Metisiline direnç geliştiren stafilokokların çoğu flourokinolon ve aminoglikozitlere de direnç geliştirdiği için enfeksiyonları tedavi etmek glikopeptid grubu antibiyotikler kullanılmaktadır. Vankomisin ve teikoplanin bu antibiyotik grubuna aittir (Bannerman, 2003).

Yalnız Gram (+) bakterilere karşı etkili olan vankomisin klinik olarak 1958'de kullanılmaya başlanmış fakat bu ilaca karşı uzun yıllar direnç tespit edilememiştir. Ancak 1989'da vankomisine dirençli enterokoklar (VRE) ilk olarak gözlenmiştir ve 2002'ye gelindiğinde vankomisine dirençli *S. aureus* izolatlarının varlığı rapor edilmiştir (Shorr, 2007).

Glikopeptid grubundaki antibiyotikler, hücre duvar yapısını inhibe ederek etkilerini ortaya çıkarırlar. Sentezlenmiş hücre duvarı bileşeni peptidoglikanın D-alanil-D-alanin ucuna bağlanarak transpeptidasyon adımını inhibe ederler (Shorr, 2007).

Aminoglikozid direnci

Aminoglikozid grubu antibiyotikler, *Streptomyces* ve *Micromonospora* türü toprak bakterilerinden elde edilirler ve çoğunlukla metisiline karşı duyarlı olan stafilokok türlerinde etkilidirler. Aminoglikozitler, genellikle glikopeptidler ve β -laktamlarla birlikte alfa hemolitik streptokok, stafilokok ve enterokoklardan kaynaklanan invaziv enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılan önemli antibakteriyel maddelerdir (Sundsfjord ve diğerleri, 2004).

Bakterisidal etkisi olan aminoglikozit, ribozomun 30S'lik alt birimine bağlanır ve tRNA'da translokasyonlara müdahale ederek mRNA tarafından taşınan genetik kodu yanlış okutturur ve protein sentezini engellemiş olur (Koçak Kızanlık, 2019). Bu gruptaki antibiyotiklere karşı direnç ribozomlara, enzimlere ve geçirgenliğe dayanır. *S. aureus* cinsinde ribozom ve geçirgenliğe bağlı direnç nadir de olsa, en çok gözlenen enzim direncidir. Plazmidler ve transpozonların sentezlediği asitiltransferaz, nükleotidiltransferaz ve fosforiltransferaz enzimleri sayesinde antibiyotiklerin yapısını değiştirerek devre dışı bırakırlar (McCallum ve diğerleri, 2010).

Tetrasiklin direnci

Tetrasiklin, geniş spektrumu olan bakteristatik etkisi olan antibiyotik grubudur. Hayvancılık sektöründe büyüme amaçlı, veterinerlikte ve insan sağlığında bakterilere karşı tedavi edici ve tarım sektöründe üretime destek olarak kullanılır. Bu şekilde yaygın kullanılmasından ötürü birçok bakteri tetrasikline karşı direnç geliştirmiştir (Ardic, Ozyurt, Sareyyupoglu ve Haznedaroglu, 2005).

Tetrasiklinlere direnç geliştirme özelliği kazandıran 15'ten fazla gen vardır. *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C-Q)*. Bu genler içinde en yaygın olanı ve birçok bakteride olanı *tet(M)* genidir (Yıldız ve Aygen, 2002). Tetrasiklinler ribozomun 30S'lik alt birimine bağlanarak tRNA'nın ribozomal komplekse erişmesine engeller ve böylece protein sentezini engellemiş olurlar. Stafilakoklarda tetrasiklin direncinin oluşumunda önemli olan mekanizma şu şekilde işlemektedir: Eflüks pompalarının aktive olmasıyla gerçekleşen direnç mekanizmasında, bakteri hücrelerine giren ilaç enerjiye bağlı pompa sistemi ile uzaklaştırılmaktadır. İlaçların

hedef bölgelere rekabetçi bağlanma mekanizmaları tarafından gelişen direnç mekanizmasında, ajan tarafından sentezlenen ribozom koruyucu proteini (ribozom koruyucu Protein-RPP), ilacın hedef bölgelerine bağlanır ve ilaç etkinliğini durdurur (Yüce, 2001; Reygaert, 2013).

Kinolon direnci

2000’li yılların başlamasıyla beraber, antibiyotiklerin kullanımının artmasına paralel olarak kinolon kullanımı da artış göstermiştir. Etki alanı fazla olan florokinolonlar yeni nesil ilaçların kullanımının artması ve mevcut ilaçların etkilerinin değerlendirilmesi ihtiyacı, kinolon gruplarına olan ilgiyi artırmıştır. DNA giraz ve topoizomeras IV enzimleri kinolonların hedef bölgesidir. Bu enzimleri sentezleyen bölgelerde oluşan mutasyonlar sonunda direnç oluşmaktadır (Cengiz, 2010).

S. aureus’ta kinolon direncine dahil olan üç gen vardır. Bunlar; *gyrA*, *norA* ve *flg* genleridir. *gyrA* geninin dizi analizi sonucunda, bu gende mutasyonlar olduğunu ortaya çıkardı. *S. aureus*’ta kinolon direncinin bu yönde geliştiği düşünülmektedir (Can, 2011). Kinolonlar yaygın olarak kullanılan bir sentetik antibakteriyel madde sınıfıdır. Kinolon antibiyotik ailesinin ilk üyesi olan nalidiksik asit, 1962’de klorokin sentezinde yan ürün olarak tanımlanmıştır (Hooper ve Jacoby 2015).

Klinik olarak kullanılan ilk kinolon olan nalidiksik asit, tek Gram (-) enterik özellikli bakterilerde etkilidir ve *S. aureus*’u etkilemez. İkinci nesil kinolon grupları Stafilokoklara karşı orta düzeyde aktiviteye sahiptir. Özellikle siprofloksasin ve ofloksasin ilk kullanım yıllarında *S. aureus*’a karşı çok iyi aktivite gözlemlendi, ancak bu yükseliş uzun sürmedi ve zamanla kinolon direnci ortaya çıktı (Ulusoy, Leblebicioğlu, Usluer ve Ulusoy, 2003).

Sülfonamid ve trimetoprim direnci

Sülfonamid grubu, antibakteriyel özellikleriyle tanınan en eski antibiyotiklerden birisidir. Sülfonamid grubunun bakterilerde oluşturduğu seçici özellik, canlılık için önemli bir koenzim olan folik asitin oluşması üzerinde engelleyici etkisinden kaynaklanmaktadır. Özellikle sülfonamid gruplarının para aminobenzoik aside yapı olarak benzemesi yönünden folik asitte bakteriyel oluşumuna karıştığı gösterilmiştir (Sköld, 2011). Sülfonamid grupları,

folik asit yapılarının taklidini yaparak bakteriyel enzimlere fırsatçı bağlanmaya onay verir. Böylece DNA, RNA ve protein üretiminde elzem olan tetrahidrofolat sentezini engelleyerek bakterinin çoğalma mekanizmasını bozmaktadır (Şen ve Özdemir 2016).

Sülfonamidler dünya genelinde enfeksiyonların tedavisinde kullanılan düşük maliyetli ve etkili ilaçlar olarak uzun süre kullanılmıştır. Şimdiye gelindiğinde ise etkili antimikrobiyallerin mevcudiyeti, birçok patojen bakterinin bu gruba karşı direnci ve alerjik yan etkilerin ortaya çıkması nedeniyle sınırlı bir kullanımı vardır (Sköld, 2011).

Trimetoprimler, ilk defa 1962’de İngiltere’de kullanılmaya başlamıştır. 1968 yılının başlangıcında sülfametoksazol ile beraber kullanılmıştır. Sülfonamid grubu tek kullanıldıklarında bakteriyostatik bir etkisi vardır ancak trimetoprim ile birlikte bakterisidal bir etki gözlemlenmektedir (Kayılı, 2020).

Oksazolidinon direnci

Oksazolidinonlar, Gram (+) bakterilere karşı yüksek aktiviteye sahip sentetik antimikrobiyal özellikli antibiyotiklerdir. Oksazolidinonların etki mekanizması günümüzde net olarak anlaşılamamıştır. Bu belirsizliğe rağmen protein sentezini engelledikleri belirtilmiştir. Oksazolidinonların diğer antibiyotiklerden ayırıcı özelliği, ribozom organelinde etkili olan farklı antibiyotiklerden daha önce bir adımda engelleyerek protein sentezini önlemeleridir (Kayılı, 2020).

Linezolid ve eperozolidin antibiyotikleri bu grubun üyeleridir. Linezolidler bütün önemli Gram (+) bakteriler için çok iyi in vitro aktivitesi vardır. Metisiline direnç geliştiren ve duyarlı olan *S. aureus*’larda etkisi vardır (Ulusoy ve diğerleri, 2003).

Makrolitler, linkozamitler ve streptogramin direnci

Makrolitler, linkozamitler ve streptograminler (MLS), yapı itibarıyla birbirlerinden çok farklı olmasına rağmen, etki mekanizmalarının benzerlik göstermesi ve direnç mekanizmalarının da benzer olması sebebiyle aynı gruba dahil edilirler. Ribozomun 50S’lik alt ünite de birebir eşleşen bağlanma noktalarını paylaştıkları için bir seri direnç geni çeşitli antibiyotik gruplarına direnç kazandırır. Bu grupta bulunan antibiyotikler bakterilerin

ribozomunda 50S'lik ribozomal alt birimi hedef alıp, protein sentezini engellerler (Van Duijkeren ve diğ erleri, 2018).

Son yirmi yılın verileri, hem Gram (+) hem Gram (-) bakterilerin, genellikle mobil elementlerle ilişkili yeni genler edinerek MLS'ye direnç kazanabileceğini açıkça göstermektedir. Buna ilaveten kazanılmış direnç mekanizmalarının arasında aktif dışa atım pompaları veya antibiyotiklerin etkilerini inhibe edici değişik genler mevcuttur (Schwarz ve diğ erleri, 2016).

S. aureus'larda makrolid gruba karşı oluşan direnç mekanizmaları  u şekildedir; hücre duvarının geçirgen özelliğinin azalması, aktif dışa atım pompa sistemleri ve ribozomun 50S'lik alt birimindeki 23S'lik ribozomal RNA'da adenin metilasyonundaki hedef bölgenin değişikliği olarak sayılabilir. En çok karşılaşılan direnç mekanizması hedef bölgenin değişikliği olanıdır (Ozansoy, Cevahir ve Kaleli, 2014).

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kıyma ve köfte örneklerinin temini

Bu tez çalışmasında Amasya il merkezinde bulunan market, şarküteri ve kasaplardan satın alınan toplamda 60 adet (30 adet kıyma ve 30 adet köfte) numune materyal olarak kullanılmıştır. Köfteler tüketicinin kullanımına hazır olarak sunulan tezgahlardan alınmıştır. Kıymaların bir kısmı kıyma olması için hazırlanan etlerden çektilirdi, diğer kalan kısmı ise tüketicinin hazır alacağı şekilde sunulmuş tezgahlardan alınmıştır. Tüketicie sunulan şekliyle alınan bu numuneler soğuk muhafazası altında laboratuvara getirilmiştir.

3.1.2. Kullanılan antibiyotik diskleri

Bu çalışmada kapsamında disk difüzyon yöntemi için kullanılmış olan antibiyotik diskleri levofloksasin (LEV; 5 µg, ASD04800), tobramisin (TOB; 10 µg, ASD09201), gentamisin (CN; 10 µg, ASD04405), imipenem (IPM; 10 µg, ASD04500), piperasilin-tazobactam (PTZ; 100/10 µg, ASD07620), penisilin (P; 10 µg, ASD07400), metisilin (ME, 5 µg, ASD05430), eritromisin (E; 15 µg, ASD03700), kloromfenikol (C; 30 µg, ASD02800) Bioanalyse Ltd., Türkiye firmasından temin edilmiştir.

3.1.3. Mikrobiyolojik ve moleküler analizler için kullanılan kimyasallar

Bu tez kapsamında mannitol salt agar base (MSA, HiMedia, India- REF-M118), baird parker agar base (BPA, Biolife, Milano, Italya-NL6209), brain heart infusion broth (BHI, Biolife, Milano, Italya-REF-4011162), bakteriyolojik pepton (Biolife, Milano, Italya-4122592), triptik soy agar (TSA, Merck, Darmstadt, Germany- 105458), triptik soy broth (TSB, Merck, Darmstadt, Germany-105459), bakteriyolojik agar (No:1 LabM), mueller hinton agar (MHA, Biolife, Milano, Italya- 4017402500) egg yolk tellurite emülsiyon (Merck, Darmstadt, Germany-K95798185), coagulase tes tubes (Fluka-74226-3ML-F) agaroz (biomax), NaCl (ZAG kimya), Gram boyama seti (Norateks, 311002103), dNTP karışımı (Thermo Fisher Scientific, R0191), Taq DNA polimeraz (İnvitrogen, 2429888) ve DNA jel

yükleme boyası (Amplicon), primer (oligomer biotechnology) 100 bç DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, 0068853) trizma base (Sigma, T1503), borik asit (Sigma, B6768), etilen diamin tetra asetik asit (EDTA, Sigma, 60- 00-4) marka kimyasallar kullanılmıştır.

3.1.4. Mikrobiyolojik ve moleküler analizlerde kullanılan besiyerleri ve çözeltilerin hazırlanışı

Bu araştırmada kullanılan çözelti ve besiyerleri aşağıdaki yazıldığı şekliyle hazırlanmıştır.

Peptonlu su

Hazır haldeki besiyerinden 1 g tartılarak 1000 mL distile suyun içinde eritildi ve pH-değeri yaklaşık 7,2'ye ayarlandı. Hazırlanan peptonlu su 9 ml olacak şekilde tüplere aktarıldı, 121 °C 15 dk otoklavlanarak steril hale getirildi.

Serum fizyolojik

NaCl 0,9 g/L olacak şekilde distile suda çözündürülmüş ve 121 °C sıcaklıkta ve 15 dakikada otoklavlanmıştır.

Baird-parker agar

Hazır haldeki besiyerinden 58 g tartılarak 1000 mL distile suyun içinde eritildi ve pH-değeri yaklaşık 6,8'e ayarlandıktan sonra sıcak su banyosunda tamamen çözdürüldü. 121°C sıcaklık ve 15 dk süre ile otoklavda steril edildi. Daha sonra 50°C sıcaklığa kadar soğutma işlemi tamamlandı. İçerisine 50 mL/950 mL egg yolk tellürite emülsiyon eklendi ve steril haldeki petri kutularına dökülerek hazır hale getirildi.

Brain Heart Infusion Broth

Hazır haldeki besiyerinden 37 g tartılarak 1000 mL distile suyun içinde eritildi ve pH 7,2±0,2'e ayarlandı. Daha sonra bu besiyeri tüplere dökülerek 121°C sıcaklık ve 15 dk süre ile otoklavlanarak steril hale getirildi.

Mueller-Hinton Agar

Hazır haldeki besiyerinden 38 g/L tartılarak, 1000 mL distile suyun içinde yarım saat erimesi için bekletildi. pH değeri yaklaşık $7,2\pm0,2$ 'ye ayarlandı. Daha sonra 121°C sıcaklık ve 15 dakika süreyle otoklavlanarak steril edilmiş ardından petrilere dökülmüş ve donması sağlanmıştır.

Triptik Soy Agar

Hazır haldeki besiyerinden 40 g/L tartılarak, 95 °C'lik su banyosu içinde yarım saat erimesi için bekletildi. pH değeri yaklaşık $7,1\pm0,2$ 'ye ayarlandı. 121 °C sıcaklık ve 15 dakika süreyle otoklavlanarak sterilize edilmiş ardından petrilere dökülmüş ve donması sağlanmıştır.

Triptik Soy Broth

Hazır haldeki besiyerinden 30 g/L tartılarak, 95 °C'lik su banyosu içinde yarım saat erimesi için bekletildi. pH değeri yaklaşık $7,1\pm0,2$ 'ye ayarlandı. Daha sonra 121°C sıcaklık ve 15 dakika süreyle otoklavlanarak sterilize hale getirildi.

Kongo kırmızısı agar

İçerik	Miktar (g/L)
Sakkaroz	50
Agar	10
Brain Heart Infüzyon Broth	37
Kongo kırmızısı	0,8

Hazırlanan içeriği distile suda çözündürerek, pH değeri $7,2\pm0,2$ 'ye ayarlandı. 121 °C sıcaklık ve 15 dakika süreyle otoklavda steril edildi. 50-55 °C'lik su banyosu içinde soğutularak steril petrilere dökülmüştür.

Kristal viyole çözeltisi

Kristal viyole 0,25 g, alkol (%95) tamamen çözdükten sonra toplam hacmi 100 mL'ye getirmek için distile su eklendi. Bir gece beklenerek whatman filtre kağıdından süzülerek hazırlandı.

%1'lik Agaroz

%1'lik agaroz jel hazırlamak için, 1 gr agaroz tartılmıştır. Erlenmayerde 1X TBE'den 100 mL olacak şekilde karıştırılarak mikrodalga fırına konulmuştur. Mikrodalgada erimesi sağlandıktan sonra 55 °C sıcaklığa gelmesi için beklenmiştir. Hazırlanan karışım elektroforez kasetine dökülerek dondurulmuştur.

Primerler

Tez kapsamında kullanılan primerler (Çizelge 4) 100 µM olacak şekilde sulandırıldı ardından çalışmada kullanılan konsantrasyonu elde edebilmek için 1/10 oranında seyreltilerek kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan primerler

Primer adı	Primer dizisi (5'-3')	Amplikon uzunluğu (bp)	Kaynak
16SrRNA 756F 750R	AACTCTGTTATTAGGGAAGAACA CCACCTTCCTCCGGTTTGTGTCACC	756	(McClure ve diğerleri, 2006)
Nuc R F	GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC	279	(Zhang ve diğerleri, 2004)
icaA R F	CCTAACTAACGAAAGGTAG AAGATATAGCGATAAGTGC	1315	(Vasudevan ve diğerleri, 2003)
icaD R F	AAACGTAAGAGAGGTGG GGCAATATGATCAAGATAC	381	(Vasudevan ve diğerleri, 2003).

Trizma Base-Borik Asit-EDTA Tamponu (TBE-10X)

Bileşim	Miktar (g/L)
Trizma base	108
Borik asit	55
EDTA (pH 7,5-7,8)	7,5

Kullanılan kimyasal maddeler distile suyla eritilerek hazır hale getirilmiştir. Çalışma aşamasında çözelti 1X'e kadar dilüe edilerek kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. *S. aureus*'un izolasyonu

Aseptik şartlar altında bir spatül yardımıyla kıyma ve köfte örneklerinden 10 g tartılarak steril numune poşetlerine aktarıldı. 90 mL tamponlanmış peptonlu su eklenerek stomacher cihazıyla homojenize hale getirildi. Daha önceden hazırlanan %0,1 oranında peptonlu su içeren tüplerde 10^{-3} 'e kadar desimal dilüsyonları yapıldı. Steril pipet yardımıyla 0,1 mL alınarak drigalski yardımıyla egg yolk–tellurite emülsiyon eklenen baird parker agar besiyerine yayma plak yöntemi ile yayıldı. Ekim işlemi tamamlanan petri plakları 37 °C'de 24-48 saat aerobik şartlarda inkübasyon için inkübatöre konuldu. Bu işlemin ardından BPA besiyerinde üreme gerçekleştiren 2-3 mm çapında düzgün kenarlı konveks gri-siyah renkli lestinaz pozitif ya da lestinaz negatif olan koloniler şüpheli *S. aureus* olarak değerlendirildi (Halkman, 2005). Şüpheli koloniler TSA besiyerine aktararak 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen kültürler %20 gliserol içeren BHI besiyerine aktararak daha sonra gerçekleştirilecek olan fenotipik testler (katalaz, Gram boyama, koagülaz ve mannitol salt agarda fermentasyon) ve genotipik testler için -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.2. *S. aureus* izolatları için uygulanan fenotipik testler

3.2.2.1. Katalaz testi

İzolatlar TSA agara inoküle edilerek aerobik koşullarda 37 °C'de 24 saat inkübasyon sonucu gelişen kolonilerden alınarak lam üzerine bırakılmıştır. Üzerine birkaç damla %3 oranında H_2O_2 damlatılıp karıştırılmıştır. Katalaz enzimi bulunduran hücreler H_2O_2 'yi oksijen ve suya ayrıştırarak, ortamda oksijen çıkışını sağlar. Oksijen çıkışının varlığında ortamda gaz çıkışı gözlemlenir. Gaz çıkışı gözlenen koloniler katalaz pozitif olarak yorumlanmıştır (Winn ve diğerleri, 2006).

3.2.2.2. Gram boyama

İzolatların 24 saatlik taze kültürlerinden temiz bir lamın üzerine %0,9'luk NaCl ile homojen hale getirilmiştir. Hazırlanan preparat tam olarak kurutulduktan sonra bek alevinden 3 kez geçirilerek fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Preparat 1 dakika boyunca kristal viyole

çözeltisiyle boyanmış daha sonra boyası dökülerek distile suyla 45° açıda yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından lügol çözeltisi damlatılarak yine 1 dakika süre geçmiştir. Lamın üzerindeki boya dökülerek yıkama işleminin ardından %96 etil alkol ile 10-15 saniye boyanın uzaklaştırılması sağlanmıştır. Lamın üstündeki etil alkolün arındırılması amacıyla distile suyla yıkanmıştır. Son aşamada safranin boyasıyla 1 dakika daha beklenerek lam distile su ile yıkanarak kurutmaya bırakılmıştır. Kurumuş lamın üzerine immersiyon yağı damlatılarak, mikroskopta 100X objektife alınarak gözlemlenmiştir. Mor renkli ve üzüm salkımına benzeyen yuvarlak düzensiz küme halindeki mikroorganizmalar Gram pozitif olarak değerlendirilmiştir (Winn ve diğerleri, 2006).

3.2.2.3. Koagülaz testi

S. aureus suşlarında koagülaz enzim varlığının belirlenmesi için tüpte koagülaz metodu kullanılmıştır. Bu amaçla öncelikle *S. aureus* izolatları BHI broth içerisine inoküle edilerek 37 °C’de 24 ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kültürlerden 0,1 mL alınarak 0,3 ml tavşan plazması içeren tüplere inoküle edilerek 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlemin ardından 6 saatlik ilk sürede, her 30’ar dakikada kontrolleri yapıldı. Tüpün içinde pıhtılaşma jelimsi bir kıvam varsa koagülaz testi pozitif olarak kabul edildi. Pıhtı ve jelimsi kıvam gözlenmeyen tüp negatif olarak kabul edildi (Koneman ve diğerleri, 2006).

3.2.2.4. Mannitol salt agarda fermentasyon testi

S. aureus diğer stafilokok türlerine nazaran mannitolü fermente edebilme özelliği vardır. Bu fermentasyondan sonra besiyerinin bileşimindeki fenol kırmızısı indikatörünü sarıya dönüştürür. MSA, *S. aureus*’lar için seçici ve ayırt edici bir besiyeridir. Ayrıca MSA içeriğindeki tuz miktarının fazlaca olması nedeniyle yarışçı florayı baskılayarak *S. aureus*’un gelişmesini destekler (Bilgehan, 2002).

Mannitol Salt Agar besiyerinin üzerine taze kültürlerden alınarak ekimi yapılmıştır. Aerobik şartlar gözetilerek 37 °C sıcaklıkta ve 24-48 saatte inkübasyona bırakılmıştır. İşlemin ardından besiyerinde rengi parlak sarı olan kolonileri *S. aureus* pozitif, rengi değişmeyen koloniler *S. aureus* negatif olarak kabul edildi.

3.2.3. *S. aureus* izolatlarının genotipik olarak polimeraz zincir reaksiyonu ile doğrulanması

3.2.3.1. İzolatlardan total DNA izolasyonu

S. aureus izolatlarından total DNA izolasyonu kaynatma yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (Nalça ve Timur, 2021). Öncelikle izolatlar TSA'ya inoküle edilerek aerobik koşullarda 37 °C'de 24 saat inkübasyon sonucu gelişen saf kültür kolonilerden birkaç koloni alınarak steril 500 µL dH₂O içeren mikro tüp içerisinde süspanse hale getirilmiştir. Ardından süspansiyonlar 95-100 °C'ye ayarlanmış kuru blok üzerinde 15 dk bekletilerek 10.000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant steril bir mikro tüp içerisine aktarılacak kalıp DNA olarak kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.3.2. Cins spesifik ve tür spesifik genlerinin belirlenmesi

16S rRNA gen bölgesinin belirlenmesi

İzolatların cins düzeyinde *S. aureus* olarak doğrulanması için 16S rRNA gen varlığı PZR ile analiz edildi. 16S rRNA gen bölgesinin çoğaltılması için McClure ve diğerleri, (2006) yönteminde küçük değişiklik yapılarak gerçekleştirilmiştir. Karışımın toplam 25 µL hacimde olacak şekilde (son konsantrasyonları 1X Taq tamponu, 3 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP mix, 0,2 pmol primer, 1 U/µl Taq DNA polimeraz ve 2 µL kalıp DNA) olacak şekilde hazırlanmıştır. Amplifikasyonun sağlanması amacıyla Çizelge 3.2'de belirtilen koşullar sağlanmıştır.

Çizelge 3.2. 16S rRNA geni için PZR koşulları

Amplifikasyon aşamaları	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	94	10 dk	1
Denatürasyon	94	45 sn	10
Bağlanma	55	45 sn	
Uzaman	72	75 sn	
Denatürasyon	94	45 sn	25
Bağlanma	50	45 sn	
Uzama	72	75 sn	
Son uzama	72	10 dk	1

nuc gen bölgesinin belirlenmesi

İzolatların tür düzeyinde *S. aureus* olarak doğrulanması için *nuc* gen varlığı PZR ile analiz edildi. *nuc* genin varlığının belirlenmesi için Zhang ve diğerleri, (2004) gerçekleştirilen yöntemde küçük değişiklik yapılmıştır. PZR karışımının toplam hacmi 25 µL olacak şekilde son konsantrasyonları 1X Taq tamponu, 3 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP mix, 0,2 pmol primer, 1 U/µL Taq DNA polimeraz ve 5 µL kalıp DNA olacak şekilde hazırlanmıştır. Amplifikasyonun sağlanması amacıyla Çizelge 3.3'te belirtilen koşullar sağlanmıştır.

Çizelge 3.3. *nuc* geni için PZR koşulları

Amplifikasyon aşamaları	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü
Ön denatürasyon	94	2 dk	1
Denatürasyon	94	15 sn	} 25
Bağlanma	55	30 sn	
Uzama	72	30 dk	
Son uzama	72	10 dk	1

3.2.4. Antibiyotik duyarlılık testleri

S. aureus izolatlarından alınarak antibiyotik duyarlılık testinin yapılması için disk difüzyon metodu CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) kriterleri dikkate alınarak yapılmıştır. Teste tabi olacak bakteri kolonileri %0,9'luk NaCl içinde homojenize edilmiştir. Daha sonra bulanıklığı 0,5 McFarland'a ayarlanarak sterilize edilmiş eküvyon çubuğuyla 100 µl alınıp Mueller-Hinton agar yüzeyini yayma ekim yapıldı. Daha sonra antibiyotikler arasındaki mesafe 2.5 cm ve petri köşelerinden 2 cm uzaklıkta olacak şekilde yerleştirilerek 35°C sıcaklıkta 18-24 saat arasında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işlemi bittikten sonra antibiyotik disklerinin çevresinde meydana gelen inhibisyon zonlarının çapları bir kumpas aracılığıyla ölçülmüştür. Elde edilen veriler CLSI (2012) kriterlerine duyarlı (S), orta duyarlı (I) ve dirençli (R) olarak değerlendirilmesi yapılmıştır. Testte kullanılan antibiyotik diskleri ve CLSI'nin (2012) belirlediği sınırlar Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.4. Antibiyotik duyarlılık testinde kullanılan antibiyotikler ve zon çaplarının değerleri

Antibiyotiklerin adı	Disk içeriği (µg)	Zon çapları		
		Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli
Gentamisin (CN)	10	≥15	13-14	≤12
Tobramisin (TOB)	10	≥15	13-14	≤12
Levofloksasin (LEV)	5	≥19	16-18	≤15
Piperasilin-Tazobaktam (TPZ)	100/10	≥18	-	≤17
İmipenem (IPM)	10	≥16	14-15	≤13
Kloramfenikol (C)	30	≥18	13-17	≤12
Penisilin (P)	10	≥29	-	≤28
Metisilin (MET)	5	≥14	10-13	≤9
Eritromisin (E)	15	≥23	14-22	≤13

3.2.5. Biyofilm oluşumu

3.2.5.1. Biyofilm oluşumunun kongo kırmızısı agar metoduyla belirlenmesi

S. aureus olarak tanımlanan izolatlar biyofilm oluşturduğunun belirlenmesi için Kongo kırmızısı agar metodu kullanılmıştır. Bu amaç doğrultusunda kolonilerden seçilerek ekim yapılan Kongo kırmızısı agar besiyerine tek koloni olacak şekilde çizgi ekim yapıldı. Petriler 37 °C sıcaklık ve 24 saat süreyle inkübasyon işlemine bırakıldı. Bu aşamadan sonra parlak koyu siyah renkli gözlemlenen izolatların biyofilmi pozitif, pembe renkli, düz ya da renk oluşturmayan kolonilerin ise biyofilm oluşturması negatif olarak kabul edilmiştir (Rozanska ve diğerleri, 2017).

3.2.5.2. Mikrotitrasyon plağı yöntemi

S. aureus izolatlarının biyofilm üretme yeteneklerinin biyofilm oluşumu için kullanılan bir diğer yöntem mikrotitrasyon plağı metodudur. Bu amaç doğrultusunda kanlı agar besiyerinde üremiş taze kolonilerin bulanıklık seviyesi 0,5 McFarland'a getirildi. İzolatlara %0,25 glukoz bulunan triptik soy buyyonda (TSB) 1/50 oranında dilüsyon işlemi yapıldı. Hazır hale getirilen süspansiyonlardan 150 µL'si 96 kuyulu polistiren mikrotitrasyon plakalarının oyuklarına yerleştirildi ve 37°C sıcaklık ve 24 saat süre ile inkübasyon işlemi yapıldı. İnkübasyon işleminden sonra kuyulardan sıvı besiyerini boşaltılarak, kuyular sterilize fosfat tamponuyla çok sarsmadan üç defa yıkandı. Plakayı ters çevirerek kuyuların kuruması sağlandı. Kuyulara %99 oranında metanol eklenip 15 dakika beklenerek

kuyulardaki biyofilm katmanı sabitlenmiştir. Bu sürenin ardından metanol kuyulardan boşaltıldı ve kurutuldu. Biyofilmdeki bakteri hücrelerinin boyanması amacıyla kuyulara 150 µL %0,1 oranında kristal viyole çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyonda beklenmiştir. İnkübasyondan sonra biyofilm katmanı zarar görmeyecek şekilde kuyulardan boya boşaltılarak üç defa distile suyla yıkanıldı. Plaka ters çevrilerek kuyular kurutuldu. Oluşan biyofilm katmanını çıkarmak için kuyulara 150 µL etanol-aseton eklenip 15 dakika beklemeye bırakıldı. Her bir numune birbirini takip eden üç kuyu olarak çalıştırıldı. Mikroplaka analiz cihazına yerleştirilen plaka, dalga boyu 570 nm'ye ayarlanarak ölçümü yapıldı (Christensen ve diğerleri, 1985).

3.2.5.3. *S. aureus* izolatlarının biyofilm üretme özelliklerinin moleküler olarak değerlendirilmesi

S. aureus izolatlarının biyofilm üretiminden sorumlu genler olan *icaA* ve *icaD*'nin varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) metodu ile incelenmiştir.

icaA genin tespit edilmesi

icaA geninin belirlenmesi amacıyla Vasudevan ve diğerleri, (2003) kullandıkları yöntem küçük değişiklikler yapılarak uygulanmıştır. Karışımın toplam hacmi 25 µL olacak şekilde son konsantrasyonları 1X PZR tamponu, 4 mM MgCl₂, 0,4 dNTP, 0,2 pmol primer, 1 U Taq DNA polimeraz olarak hazırlanmıştır. Amplifikasyon sağlanması amacıyla Çizelge 3.5'te belirtilen koşullar sağlanmıştır.

Çizelge 3.5. *icaA* geni için PZR koşulları

Amplifikasyon aşamaları	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	93	4 dk	1
Denatürasyon	93	90 sn	30
Bağlanma	52	30 sn	
Uzama	72	60 sn	
Son uzama	72	7 dk	1

icaD geninin tespit edilmesi

icaD geninin belirlenmesi maksadıyla amacıyla Vasudevan ve diğeri, (2003)'nin ele aldıkları yöntemde küçük değişiklikler yapılarak uygulanmıştır. Karışımın toplam hacmi 25 µL olacak şekilde son konsantrasyonları 1X PZR tamponu, 4 mM MgCl₂, 0,4 dNTP, 0,2 pmol primer, 1 U Taq DNA polimeraz olarak hazırlanmıştır. Amplifikasyon sağlanması amacıyla Çizelge 3.6'da belirtilen koşullar sağlanmıştır.

Çizelge 3.6. *icaD* geni için PZR koşulları

Amplifikasyon aşamaları	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	94	4 dk	1
Denatürasyon	94	90 sn	30
Bağlanma	54	45 sn	
Uzaman	72	60 sn	
Son uzama	72	7 dk	1

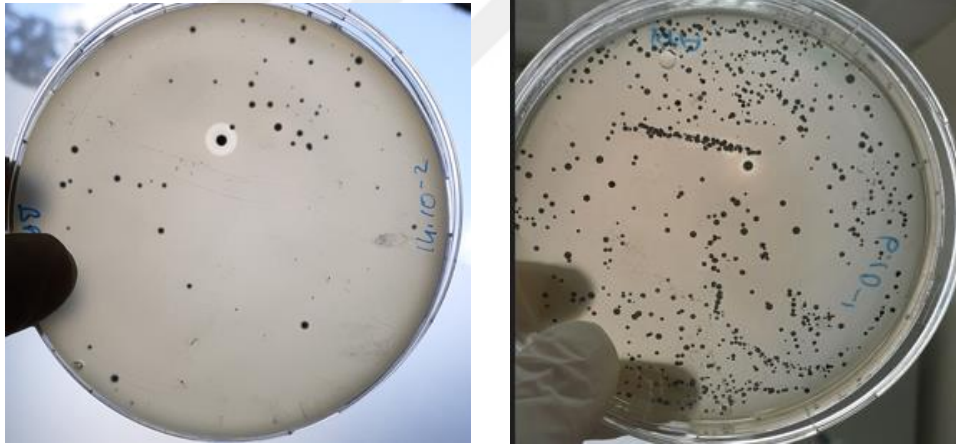
PZR işleminden sonra çalışmamızda kullanılan bütün genlere ait amplifikasyon ürünleri DNA jel yükleme boyası (Amplicon) eklenmiş %1'lik agaroz jelde 90 V akımda 90 dk elektroforezde yürütülmesi sağlanmıştır. Bu aşamadan sonra 100 bp DNA ladder (Thermo Fisher Scientific) ile UV transilüminatörde görüntüsü alınmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmamızda Amasya ilinden toplanan 60 örneğin (30 köfte, 30 kıyma) 50'sinde üreme gözlemlenmiştir. Üreme olan örneklerden 3-6 koloni seçilerek 297 *Staphylococcus* sp. izolatu elde edilmiştir. Elde edilen *Staphylococcus*'ların 58'i fenotipik ve genotipik testler sonucu *S. aureus* olarak tespit edilmiştir.

4.1. *S. aureus* İzolasyon ve İdentifikasyonu

Laboratuvara getirilen örnekler, *S. aureus*'lar için önerilen izolasyon metodu uygulandıktan sonra ilgili besiyerine ekimi yapılarak 37 °C'de 48 saat inkübe edildi. Bu işlemin ardından BPA besiyerinde üreme gerçekleştiren 2-3 mm çapında düzgün kenarlı konveks gri-siyah renkli koloniler şüpheli *S. aureus* olarak değerlendirildi. Şekil 4.1'de BPA'da gözlemlenen *S. aureus* koloni görüntüsü verilmiştir.



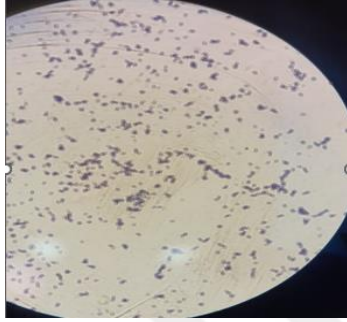
Şekil 4.1. Baird Parker Agar besiyerindeki *S. aureus*'a ait koloni görünümü

Şüpheli *S. aureus* kolonileri TSA besiyerine aktarılarak 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen kültürler %20 gliserol içeren BHI besiyerine aktarılarak daha sonra gerçekleştirilecek olan testler için -20 °C'de saklanmıştır.

4.2. *S. aureus* İzolatları İçin Uygulanan Fenotipik Testler

4.2.1. Gram boyama

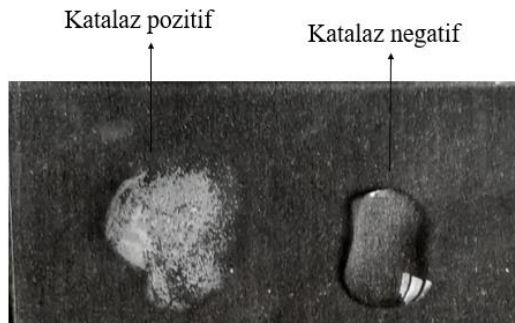
Gram boyama yöntemi için Kristal Viyole, logol, etil alkol ve safranin kullanıldı. İmmersiyon yağı damlatılarak mikroskopta objektif 100X'de görüntüye bakıldı. Mor renkli ve üzüm salkımına benzeyen koloniler *S. aureus* olarak değerlendirildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. *S. aureus*'un Gram boyama görüntüsü (100X)

4.2.2.Katalaz testi

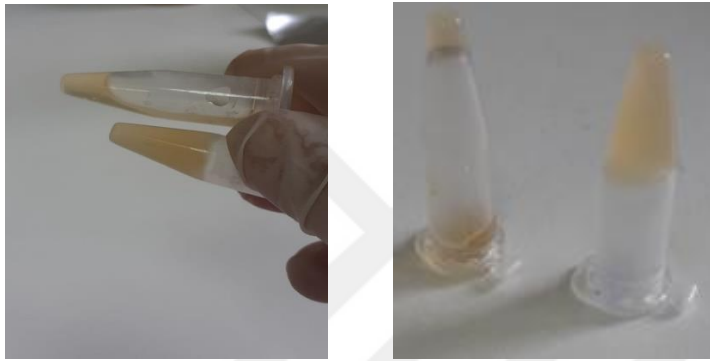
İzolatların TSA agara inoküle edilerek 37 °C'de 24 saat inkübe edilmesinin ardından, gelişen kolonilerden alınarak lam üzerine bırakılmıştır. Üzerine birkaç damla %3 oranında H₂O₂ damlatılıp karıştırılmıştır. Gaz çıkışı gözlenen koloniler katalaz pozitif olarak yorumlanmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Şüpheli *S. aureus* izolatlarına katalaz testi yapıldığı görüntüsü

4.2.3. Koagülaz testi

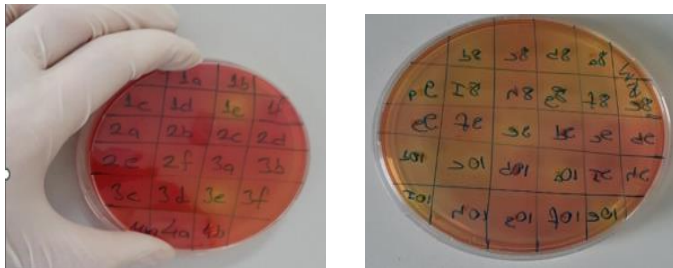
S. aureus, koagülaz tepkimesinin pozitif değer çıkmasıyla diğer stafilokok türlerinden ayrılmaktadır. Koagülaz enzimi, fibrinojeni fibrine çeviren yüksek sıcaklıklara dayanaklı olan bir enzimdir. Fibrine dönüşen yapı, pıhtılaşma veya jelimsi bir tabaka olarak gözlemlenir. *S. aureus* olarak tanımı yapılan İzolatların koagülaz enziminin varlığını belirlemek için tüpte koagülaz test yöntemi kullanıldı. *S. aureus* izolatlarının koagülaz testinin pozitif çıktığı görüntü Şekil 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.4. Tüpte koagülaz test yönteminin görüntüsü

4.2.4. Mannitol salt agarda fermentasyon testi

Mannitol Salt Agar besiyerinin üzerine taze kültürlerden alınarak ekimi yapılarak 37°C sıcaklıkta ve 24- 48 saatte inkübasyona bırakılmıştır. İşlemin ardından besiyerinde rengi parlak sarı olan kolonileri *S. aureus* pozitif, rengi değişmeyen koloniler *S. aureus* negatif olarak kabul edildi. Şekil 4.5'te mannitol salt agar besiyerinde parlak sarı renkteki kolonilerin *S. aureus* olarak tanımlaması yapılmıştır.



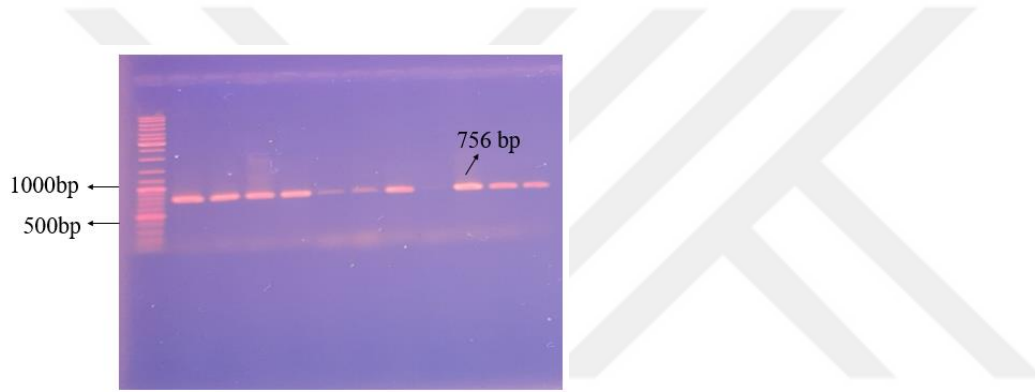
Şekil 4.5. Mannitol salt agar besiyerinde *S. aureus* görüntüsü

4.3. *S. aureus* İzolatlarının Genotipik Olarak PZR ile Doğrulanması

İzolatların cins ve tür düzeyinde *S. aureus* olarak doğrulanması amacıyla 16S rRNA ve *nuc* genlerinin varlığı PZR ile analiz edildi.

4.3.1. *Staphylococcus* için cins spesifik 16S rRNA gen varlığının belirlenmesi

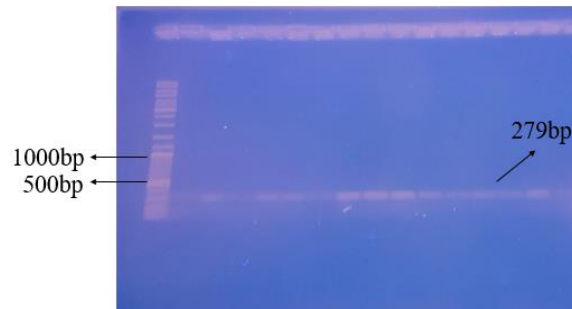
Staphylococcus için cins spesifik 16S rRNA gen profillerinin belirlenmesi için yapılan jel elektroforezi sonucunda 297 izolat pozitif olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.6. 16S rRNA PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

4.3.2. *S. aureus* izolarında *nuc* geninin tanımlanması

Yapılan bu çalışmada 58 izolatın ise *S. aureus* için tür spesifik olan *nuc* geni taşıdığı belirlenmiştir.



Şekil 4.7 *S. aureus* izolatlarında *nuc* geninin PZR görüntüsü

4.4. *S. aureus* İzolatlarının Antibiyotiklere Olan Direnç ve Duyarlılığı

S. aureus izolatlarında antibiyotik duyarlılık testinin yapılması için disk difüzyon metodu kullanıldı. Antibiyotik direnç ve duyarlılığın belirlenmesi için 9 farklı antibiyotik diski kullanılmıştır. Gentamisin, tobramisin, levofloksasin, piperasilin-tazobaktam, imipenem, kloramfenikol, penisilin, metisilin, eritromisin diskleri kullanılmıştır. İnhibisyon zon çapları bir kumpas aracılığıyla ölçülmüştür (Şekil 4.8.). Elde edilen veriler Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI)'nün belirlediği sınırlara göre yorumlanmıştır. Disk difüzyon testiyle ortaya çıkan antimikrobiyal duyarlılık sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.8. *S. aureus* izolatlarının antibiyotik duyarlılığı

Çizelge 4.1. *S. aureus* izolatlarının disk difüzyon sonuçları (n=58)

Antibiyotik isimleri	R	I	S
C	10 (%17,24)	-	48 (%82,75)
CN	5 (%8,62)	1 (%1,72)	52 (%89,65)
E	21 (%36,20)	3 (%5,17)	34 (%58,62)
İPM	-	-	100 (%100)
LEV	1 (%1,72)	-	57 (%98,27)
MET	3 (%5,17)	22 (%37,93)	33 (%56,89)
P	34 (%58,62)	-	24 (%41,37)
TOB	3 (%5,17)	1 (%1,72)	54 (%93,10)
TPZ	-	-	100 (%100)

R: Dirençli, I: Orta derece duyarlı, S: Duyarlı, CN: Gentamisin, TOB: Tobramisin C: Kloromfenikol, İPM: İmipenem, LEV: Levofloksasin, TPZ: Piperasilin-tazobaktam, P: Penisilin, MET: Metisilin, E: Eritromisin

Disk difüzyon testi sonucunda numunelerin %17,24 (58/10) oranında kloromfenikole, %8,62 (58/5) oranında gentamisine, %36,20 (58/21) oranında eritromisine, %1,72 (58/1)

oranında levofloksasine, %5,17 (58/3) oranında metisiline, %58,62 (58/34) oranında penisiline ve %5,17 (58/3) oranında tobramisine direnç tespit edilmiştir.

Test edilen numunelerin %82,75'i (58/48) kloromfenikole, %89,65 (58/52) oranında gentamisine, %58,62 (58/34) oranında eritromisine, %98,27(58/57) oranında levofloksasine, %56,89 (58/33) oranında metisiline, %41,37 (58/24) oranında penisiline, %93,10(58/54) oranında tobramisine duyarlı tespit edilmiştir. Numunelerin %100'ü imipenem ve piperaccillin tazobaktam antibiyotiklerine duyarlı tespit edilmiştir. Metisiline orta düzeyde direnç geliştiren %37,93 (58/22), eritromisine %5,17(58/3), gentamisine %1,72 (58/1) ve tobramisine %1,72 (58/1) oranında orta düzey direnç geliştiren izolat tespit edilmiştir. Çalışma kapsamında kullandığımız örnekler kıyma ve köfte olarak sınıflandırıldığında, antibiyotiklere dirençli *S. aureus* izolatları Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Kıyma ve köfte örneklerindeki antibiyotik dirençli izolat sayısı

Örnek çeşidi	Antibiyotik isimleri								
	C	CN	E	IPM	LEV	MET	P	TPZ	TOB
Kıyma	6	2	10	-	1	14	17	-	2
Köfte	4	4	14	-	-	11	17	-	2

4.5. *S. aureus* İzolatlarında Biyofilm Oluşumu

4.5.1. Kongo kırmızısı agar metodu

Güncel olarak kullanılmakta olan Kongo kırmızısı agar metodunda besiyerindeki Kongo kırmızısı mikroorganizmaların hücre dışı polisakarit yapılarındaki biyofilm etmeniyle birleşerek koyu renklerin oluşmasına neden olur. Bu çalışmada *S. aureus* izolatlarının biyofilm üretme kapasiteleri Kongo kırmızısı agar metoduyla belirlenmiştir.

S. aureus izolatlarının taze kültürlerinden seçilerek kongo kırmızısı agar besiyerine tek koloni olacak şekilde çizgi ekim yapılmış ardından petriler 37 °C sıcaklık ve 24 saat süreyle inkubasyon işlemine bırakıldı. Bu aşamadan sonra parlak siyah renkli koloni oluşturduğu gözlemlenen izolatların biyofilmi pozitif; pembe renkli, düz ya da renk oluşturmayan kolonilerin ise biyofilm oluşturması negatif olarak kabul edilmiştir (Şekil 4.9.) Kongo

kırmızı agar metoduyla biyofilm oluşturan ve oluşturmeyan izolatların sayısı ve çeşidi (Çizelge 4. 3 - 4.4)’te verilmiştir.



Şekil 4.9. Kongo kırmızısı agarda *S. aureus* izolatlarının biyofilm oluşum görüntüsü

Çizelge 4.3. Kongo kırmızısı agarda biyofilm oluşturan ve oluşturmeyan izolat sayısı

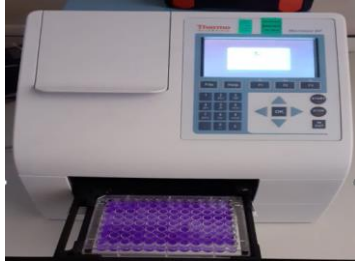
Örnek çeşidi	Biyofilm oluşturmeyan izolat sayısı	Zayıf biyofilm (+)	Orta güçlükte biyofilm (++)	Kuvvetli biyofilm (+++)
Kıyma	11	5	1	9
Köfte	13	5	5	9

Çizelge 4.4. Kongo kırmızısı agarda biyofilm oluşturan izolatların yüzdesi

Bakterinin adı	Toplam izolat	CRA ile biyofilm oluşturma yüzdesi
<i>S. aureus</i>	58	%58,62 (34/58)

4.5.2. Mikrotitrasyon plağı yöntemi ile biyofilm oluşumunun belirlenmesi

S. aureus izolatlarının biyofilm üretme yeteneklerinin kantitatif olarak tayini için mikrotitrasyon plağı metodu kullanılmıştır. İzolatların biyofilm oluşturan tabakası kristal viyole ile boyanmış, plaklar dalga boyu 570 nm olan mikroparka analiz cihazıyla (Multiscan GO, Thermo Scientific) okutulmuştur (Şekil 4.10). Kuvvetli bir biyofilm üreticisi olan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692, pozitif kontrol olarak kullanılmış ve gıda izolatları ile kıyaslandırılarak biyofilm üretimi yorumlanmıştır (Şekil 4.11.)

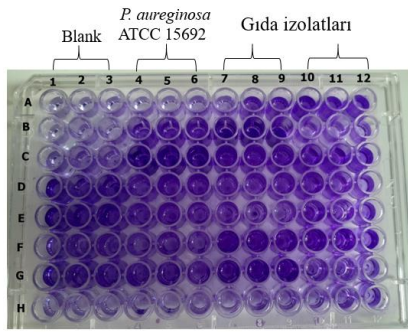


Şekil 4.10. Mikrotitrasyon plağının analiz cihazında okutulması

Mikrotitrasyon plak yöntemi ile biyofilm oluşumunu belirlerken, her gıda izolatını birbirini tekrar eden üç kuyucuk çalışılmış ve kuyucukların ortalama değeri hesaplanıp biyofilm oluşumu bu değere göre yorumlanmıştır. Mikrotitrasyon plağında yapılan ölçümler neticesinde *S. aureus* izolatlarından 24 tanesinin biyofilm oluşturmadığı, 34 tanesinin (%58,62) biyofilm oluşturduğu tespit edilmiştir. Mikrotitrasyon plak yöntemiyle biyofilm oluşturan izolatların sayısı Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.5. Mikrotitrasyon plak yöntemiyle biyofilm oluşturan izolatlar

Bakterinin adı	Toplam izolat	Biyofilm oluşturma yüzdesi
<i>S. aureus</i>	58	34 (%58,62)



Şekil 4.11. *S. aureus*'un mikrotitrasyon plağında biyofilm oluşturma

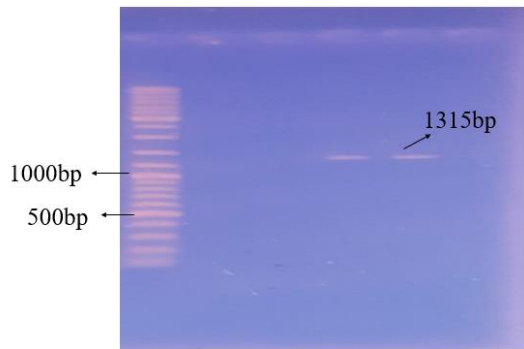
4.5.3. *S. aureus* izolatlarının biyofilm üretme özelliklerinin moleküler olarak değerlendirilmesi

S. aureus izolatlarının biyofilm üretiminden sorumlu tutulan genler olan *icaA* ve *icaD*'nin varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) metodu ile incelenmiştir.

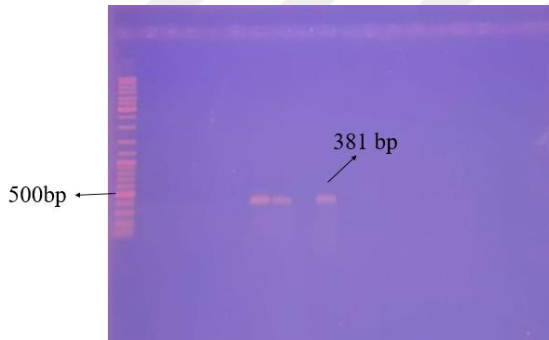
4.5.4. *icaA* ve *icaD* gen varlığının PZR ile araştırılması

S. aureus izolatlarında *icaA* gen varlığının tespiti için Vasudevan ve diğerleri, (2003) kullandıkları metod düzenlenerek uygulanmıştır.

icaA (Şekil 4.12) ve *icaD* (Şekil 4.13) genlerinin tespit edildiği elektroforez görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4.12. PZR sonrası elektroforezde *icaA* gen varlığının görüntüsü



Şekil 4.13. PZR sonrası elektroforezde *icaD* gen varlığının görüntüsü

Çizelge 4.6. PZR ile elde edilen *icaA* ve *icaD* genlerinin sonuçları

	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	Toplam
Pozitif	2	3	5
Negatif	56	55	53

S. aureus varlığının belirlenmesi, antibiyotik direnç profillerinin ve biyofilm oluşumunun tespit edilmesi amacıyla tez çalışmamız kapsamında *S. aureus* olarak tanımının yapılabilmesi için *16S rRNA* ve *nuc* genlerinin varlığı PZR ile analiz edilmiştir. *S. aureus*'un

için virülans faktörlerinden biri olan biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi amacıyla kantitatif metodlardan biri olan CRA ve mikrotitrasyon plak metodu uygulanmıştır. İzolatların moleküler düzeyde biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi amacıyla *icaA* ve *icaD* genlerinin varlığı incelenmiştir. *S. aureus*'un antimikrobiyal direncinin belirlenmesi için disk difüzyon testi kullanılmıştır. Test sonucunda izolatlar dirençli, orta dirençli ve duyarlı olarak değerlendirilmiştir. Orta direnç grubuna dahil olan izolatlar, dirençli gruba dahil edilerek yorumlanmıştır. Çizelge 4.7'de tez sürecinde yapılan analizler ve sonuçları verilmiştir.



Çizelge 4.7. *S. aureus* izolatlarına ait biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi, PZR sonuçları ve antibiyotik duyarlılık sonuçları

Örnekler		Biyofilm oluşumu				PZR		Antibiyotik isimleri								
ÖRNEK NUMARASI	ÖRNEK ÇEŞİDİ	CRA	Mikrotitrasyon	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	<i>nuc gen</i>	16S rRNA	C	CN	E	IPM	LEV	MET	P	TPZ	TOB
1	Kıyma	+	-	-	-	+	+	R	S	R	S	S	S	S	S	S
2	Kıyma	+	-	-	-	+	+	R	S	R	S	S	R	S	S	S
3	Kıyma	-	-	-	-	+	+	R	S	R	S	S	S	S	S	S
4	Kıyma	-	-	-	-	+	+	R	R	R	S	S	R	R	S	R
5	Köfte	+++	+	-	+	+	+	S	S	S	S	S	R	R	S	S
6	Kıyma	-	-	-	-	+	+	R	S	R	S	S	R	R	S	S
7	Kıyma	+	+	-	-	+	+	R	R	R	S	R	R	R	S	R
8	Kıyma	+++	+	-	-	+	+	S	S	S	S	S	R	S	S	S
9	Kıyma	-	+	-	-	+	+	S	S	R	S	S	R	R	S	S
10	Kıyma	-	+	-	-	+	+	S	S	S	S	S	R	S	S	S
11	Kıyma	-	-	-	-	+	+	S	S	R	S	S	S	S	S	S
12	Kıyma	+++	+	-	-	+	+	S	S	S	S	S	R	R	S	S
13	Kıyma	+++	+	-	-	+	+	S	S	S	S	S	R	R	S	S
14	Kıyma	+++	+	-	-	+	+	S	S	S	S	S	R	R	S	S
15	Köfte	+	-	-	-	+	+	R	R	R	S	S	S	R	S	S
16	Köfte	+++	+	-	-	+	+	S	R	R	S	S	S	S	S	R
17	Köfte	++	+	-	-	+	+	S	S	R	S	S	S	S	S	S
18	Köfte	-	-	-	-	+	+	S	S	S	S	S	R	R	S	S
19	Köfte	-	+	-	-	+	+	S	S	S	S	S	R	R	S	S
20	Köfte	+++	+	-	-	+	+	S	R	R	S	S	R	R	S	S
21	Köfte	+++	+	-	-	+	+	S	S	R	S	S	R	R	S	S
22	Köfte	+	+	-	-	+	+	R	S	R	S	S	R	R	S	S
23	Kıyma	-	+	-	-	+	+	S	S	S	S	S	S	S	S	S
24	Kıyma	-	+	-	-	+	+	S	S	S	S	S	S	S	S	S
25	Kıyma	+	+	-	-	+	+	S	S	R	S	S	R	R	S	S
26	Köfte	+	+	-	-	+	+	S	S	S	S	S	S	R	S	S
27	Köfte	++	+	-	-	+	+	S	S	R	S	S	S	R	S	S
28	Kıyma	+++	+	-	-	+	+	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Çizelge 4.7. (Devamı)

29	Köfte	-	+	-	-	+	+	S	S	S	S	S	S	S	S	S
30	Köfte	-	+	-	-	+	+	R	S	R	S	S	R	R	S	S
31	Köfte	-	+	-	-	+	+	R	S	R	S	S	S	S	S	S
32	Köfte	-	+	-	-	+	+	S	S	R	S	S	S	S	S	S
33	Köfte	++	+	-	-	+	+	S	S	R	S	S	S	S	S	S
34	Köfte	+++	+	-	-	+	+	S	S	S	S	S	S	S	S	S
35	Köfte	+++	+	-	-	+	+	S	S	S	S	S	S	S	S	S
36	Kıyma	+++	+	-	-	+	+	S	S	S	S	S	S	R	S	S
37	Kıyma	+++	+	+	+	+	+	S	S	S	S	S	S	R	S	S
38	Kıyma	+++	+	-	-	+	+	S	S	S	S	S	S	R	S	S
39	Kıyma	-	+	-	-	+	+	S	S	S	S	S	R	R	S	S
40	Köfte	-	+	-	-	+	+	S	S	S	S	S	R	R	S	S
41	Köfte	-	+	-	-	+	+	S	S	S	S	S	R	S	S	S
42	Köfte	+++	+	-	-	+	+	S	S	S	S	S	R	S	S	S
43	Köfte	--	+	-	-	+	+	S	S	S	S	S	S	S	S	S
44	Köfte	-	+	-	-	+	+	S	S	S	S	S	S	S	S	S
45	Köfte	+++	+	-	-	+	+	S	S	R	S	S	R	R	S	S
46	Köfte	+	+	-	-	+	+	S	S	S	S	S	S	R	S	S
47	Kıyma	-	+	-	-	+	+	S	S	S	S	S	S	R	S	S
48	Kıyma	+++	+	-	+	+	+	S	S	S	S	S	R	R	S	S
49	Kıyma	+	+	-	-	+	+	S	S	S	S	S	S	R	S	S
50	Kıyma	-	+	-	-	+	+	S	S	S	S	S	S	R	S	S
51	Köfte	++	+	-	-	+	+	S	S	R	S	S	S	R	S	S
52	Köfte	++	+	-	-	+	+	S	S	S	S	S	S	R	S	S
53	Köfte	+	+	-	-	+	+	S	S	S	S	S	S	R	S	S
54	Köfte	+++	+	+	-	+	+	S	R	R	S	S	S	R	S	R
55	Köfte	-	+	-	-	+	+	S	S	S	S	S	S	S	S	S
56	Köfte	-	+	-	-	+	+	S	S	S	S	S	S	S	S	S
57	Köfte	-	+	-	-	+	+	S	S	S	S	S	S	S	S	S
58	Kıyma	++	+	-	-	+	+	S	S	R	S	S	R	R	S	S

5. TARTIŞMA

S. aureus gıda kökenli önemli patojenik mikroorganizmalardan birisidir. Hafif deri enfeksiyonlarının yanı sıra pnömöni ve sepsis gibi pek çok enfeksiyona neden olan insanlarda ve hayvanlarda çok yönlü bir patojendir (Zaher ve diğerleri, 2023).

Çiğ et ve et ürünleri, süt ve süt ürünleri, deniz ürünleri ve yumurta gibi gıdalar çok yaygın olarak *S. aureus* kontaminasyonuna maruz kalmaktadır (Can, Elmalı ve Karagöz, 2017). *S. aureus*'un kontamine ettiği gıda ürünleri bu bakterinin insanlara bulaşmasında aracı olarak görülmüştür. *S. aureus*'un gıdalara bulaşmasında, gıda değeri taşıyan hayvanlar, gıda sektöründe görevli personel, gıda ürünlerinin temas ettiği yüzey, gıda işletmesinde kullanılan ekipmanlar, hava ve toz kaynak olarak belirtilmiştir. Gıdaların kontaminasyonunda *S. aureus* taşıyıcısı olan gıda işleyicisinin elle teması veya vücut salgıları temel kaynak olarak ele alınmıştır. İncelenen çeşitli gıda maddeleri arasından et ve et orjinli ürünler, *S. aureus*'ların ortak ana rezervuarlarıdır. Et ve et ürünlerinde mikrobiyal kontaminasyon, kesme, haşlama, iç organlarının temizlenmesi, kıyma, dağıtma ve muhafaza etme gibi herhangi bir aşamada oluşabilmektedir (Şanlıbaba, 2022)

Bizim tez çalışmamız kapsamında 60 adet et örneğinden (30 kıyma ve 30 köfte) 297 *Staphylococcus* sp. elde edildi ve bu izolatlardan 58'i (%19,52) *S. aureus* olarak doğrulandı. Bu amaç doğrultusunda birçok araştırmacı tarafından yapılan çalışmalarda (Andrew ve diğerleri, 2011; Bozan Bayrak, 2019; Buyukcangaz ve diğerleri, 2013; Devren, 2004; Güven, Gülmez ve Kamber, 1997; Haghi, Zeighami, Hajiloo, Torabı ve Derakhshan, 2021; Jackson, Davis ve Barrett, 2013; Kanaan, 2018; Kımıran Erdem, Sağlam, Özer ve Özçelik, 2014; Koluman ve diğerleri, 2011; Normanno ve diğerleri, 2007; Pourbabae, Hadadi, Hooshyar, Pourbabae ve Nazari-Alam, 2020; Siriken, 2004; Şanlıbaba, 2022; Titouche ve diğerleri, 2020; Zehra, Gulzar, Singh, Kaur ve Gill, 2019) değişik oranlarda *S. aureus* varlığı tespit edilmiştir.

Buyukcangaz ve diğerleri, (2013)'nin Kuzey Dakota'da yaptıkları çalışmada çiğ et örneklerinin %47,6'sında (n=69); Titouche ve diğerleri, (2020) Cezayir'deki çalışmalarının %17'sinde (51/300); Haghi ve diğerleri, (2021)'nin İran'da et örnekleriyle ilgili yaptıkları çalışmada örneklerin %34,5'inde (31/90); Koluman ve diğerleri, (2011)'nin Ankara'daki gıda ürünlerini inceledikleri çalışmalarında örneklerin %37,3'ünde (112/300); Zehra ve

diğerleri, (2019) Hindistan'daki perakende etlerin %21,81'inde (89/408); Kanaan, (2018) Irak'ta yaptıkları çalışmada örneklerin %54,2'sinde (39/72); Pourbabaee ve diğerleri, (2020) İran-Kashan'da analiz ettikleri etli hamburgerlerin %9,86'sında (9/71); Normanno ve diğerleri, (2007) inceledikleri hayvansan ürünlerin %12.8'inde (209/1634); Andrew ve diğerleri, (2011) Amerika'dan bildirdikleri çalışmada sığır eti örneklerinin %37'sinde (14/38); Jackson ve diğerleri, (2013) Gürcistan'dan bildirdikleri çalışmada sığır eti örneklerinin %63'ünde (63/100); Güven ve diğerleri, (1997) analiz ettikleri Kars ilindeki kıyma örneklerinin %46,25'inde (n=80); Kımıran ve diğerleri, (2014) İstanbul'dan bildirdikleri araştırmada kıymaların %96,6'sında (58/60); Siriken, (2004) Aydın ve Afyon illerinden topladıkları örneklerin %21,4'ünde (n=70); Devren, (2004) Kütahya ve Eskişehir'deki et ve et ürünleriyle yaptığı çalışmasında örneklerin %48,7'sinde (n=413); Bozan Bayrak, (2019) tarafından Diyarbakır'da et ürünlerinin incelendiği araştırmada örneklerin %57,2'sinde (186/325); Şanlıbaba, (2022) Ankara'dan temin edilen çiğ et örneklerinin %21,23'ünde (96/452) *S. aureus*'un varlığını tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Et ve et ürünlerindeki *S. aureus* kontaminasyon oranının %9,86-%96,6 aralığında olduğu görülmüştür. Bu oranlar ile bizim çalışma kapsamında bulduğumuz oranla kıyaslandığında verilerin kısmen uyum içerisinde olduğu görülmüştür. Çalışmamız boyunca literatürden derlediğimiz araştırma verileri incelendiğinde ülkemizde ve farklı ülkelerdeki et ve ürünleri örneklerindeki *S. aureus* varlığının değişik oranlarda olduğu görülmektedir. Bu değişikliğin coğrafik yapıların farklı olması, toplanan numune sayısı ve numunenin toplandığı sezondan, numunelerin toplanma yönteminden, doğrulama yöntemlerinden ve et ürünlerinin üretimden tüketim aşamasına kadarki süreçte çapraz kontaminasyona uğraması gibi birçok olası etkenden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tüketilmeye hazır köfte örneklerinin incelendiği araştırmalar diğer et ürünlerine nispeten daha az olduğu literatür incelemelerinde gözlemlenmiştir. Sığır karkaslarının et ve et ürünlerine dönüşümü aşamasında kıyma ve köfte haline gelene kadar çapraz kontaminasyon riski daha da artmaktadır. Bizim araştırma verilerimizde köftelerdeki *S. aureus* varlığı %55,17 (32/58); kıymalarda %44,82 (26/58) oranında tespit edilmiştir. Bu konu ile ilgili bazı çalışmalar şunlardır: Aydın'ın Çine ilçesine özgü çine köftelerinin mikrobiyolojik kalitesi incelenmiş ve *S. aureus* sayımını 1.6×10^3 ve 4.3×10^5 kob/g olarak bulduklarını bildirmişlerdir (Kök, Keskin ve Büyükyörük, 2007). Bursa ilinden toplanan çeşitli köfte örneklerinin kalitesi incelenmiş ve araştırma sonucunda İnegöl ve hamburger köftelerinden %66,6'sı, kaşar içeren köftelerin %58,3'ü, Adana köftelerinin %33,3'ünde ve kasap

köfterinin yarısında *S. aureus* varlığı tespit edilmiştir (Soyutemiz, 1999). Mısır'da et ve ürünlerindeki *S. aureus* varlığının incelendiği çalışmada köfte örneklerinin %28'inin *S. aureus* ile kontamine olduğu bildirilmiştir (Tawab, Maarouf ve El-Rais, 2018). Köftelerdeki *S. aureus* kontaminasyonun yüksek olması, ham madde dışında köftelerin daha çok işlem görmesi, köftenin içeriğine eklenen baharat ve katkılardan oluşabilecek çapraz kontaminasyondan kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

1910 yılında arsenik bazlı bir madde olan salvarsanın kullanıma girmesinden itibaren antibiyotikler insanlar ve hayvanlarda bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde oldukça önemli bir rol oynadı. Günümüze kadar antibiyotikler enfeksiyonların önlenmesi ve tedavisinde, hayvan yemlerinde, büyümeyi hızlandırıcı olarak tarım ve hayvancılıkta kullanılmıştır. Bu şekilde sağlık ve tarımda antibiyotik kullanımının artması, dünya genelinde antibiyotik dirençli mikroorganizmaların oluşmasına zemin hazırlamıştır. Bakteriler antibiyotiklere karşı kromozomal mutasyonlar ve integronlar, plazmidler gibi mobil genetik elementlerin değişimi ile direnç oluşturmaktadırlar. Gıda kökenli *S. aureus* suşları, özellikle metisilin olmak üzere birçok antibiyotiğe karşı direnç oluşturduğu bilinmektedir (Can ve diğerleri, 2017; Hutchings Truman ve Wilkinson, 2019; Şanlıbaba, 2022).

Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), insan sağlığı için dünya genelinde bir tehdit olarak görülmektedir. MRSA'lar küresel antibiyotik direnç krizlerine sebep olan, sağlık hizmetleriyle alakalı enfeksiyonlarda önemli bir etiyolojik etkidir. MRSA, tedavi edilmesi zor enfeksiyonlara yol açabilecek olması kaygı verici olarak görülmektedir (İgbinosa ve diğerleri, 2023). MRSA'lar birçok beta-laktam grubu antibiyotiğe direnç geliştirmiştir. Bundan dolayı antibiyotiklerle engellenen penisilin bağlayıcı proteinlerin (PBP'ler) aktivitesi, bu ilaçlar için düşük bağlanabilme özelliği olan edinilmiş bir PBP'nin (PBP2a) işlevi ile değiştirilir. PBP2a'lar, stafilokokal kromozomal kasetler (SCC mec) olarak tanımlanan mobil genetik elementlerin taşıdığı mecA veya mecC genlerinden sentezlenmektedir (Bernier-Lachance ve diğerleri, 2020). Bu çalışma kapsamında izolatların antibiyotik direnci analiz edildiğinde %43,10 oranında metisiline direnç tespit edildi. Bizim çalışma verimize benzer ülkemiz ve farklı ülkelerdeki araştırmacıların metisilin duyarlılığı %1-%87,5 arasında (De Boer ve diğerleri, 2009; Ge ve diğerleri, 2017; Gündoğan, Citak, Yucel ve Devren, 2005; Hanson ve diğerleri, 2011; Lazano ve diğerleri, 2009; Lim ve diğerleri, 2010; Lopez ve diğerleri, 2012; Momtaz, Dehkordi, Rahimi, Asgarifar ve Momeni,

2013; Van Loo ve diğerleri, 2007; Tang ve diğerleri, 2019; Tawab, Maarouf ve El-Rais, 2018; Tegege ve diğerleri, 2021) değişiklik göstermiştir.

Hanson ve diğerleri, (2011)'nin Iowa eyaletinden bildirdikleri çalışmada et örneklerinin %7'sinde (2/27); Lim ve diğerleri, (2010)'nin Kore'de 5 yıllık süreçte topladıkları sığır eti örneklerinin %1'inde (9/890); Lazano ve diğerleri, (2009)'nin İspanya'daki çalışmalarında hayvansal kökenli numunelerin %1,6'sında (n=318); Van Loo ve diğerleri, (2007)'nin Hollanda'daki et ürünlerindeki çalışmasında örneklerin %2,5'inde (2/36); Ge ve diğerleri, (2017) Amerika'dan bildirilen et örneklerinin %1,9'unda (66/982); Tawab ve diğerleri, (2018) Mısır'da et ve ürünlerinden elde edilen izolatların %87,5'inde; Lopez ve diğerleri, (2012) Kolombiya'dan bildirilen çalışmada İzolatların %3'ünde (5/149); Momtaz ve diğerleri, (2013) İran'da et kökenli *S. aureus* suşlarının %75.60'ında, Tegege ve diğerleri, (2021) Çek Cumhuriyeti'nden bildirilen çalışmada perakende etlerin %35,4'ünde (23/65); Tang ve diğerleri, (2019) Danimarka'dan bildirilen çalışmada etlerin %13'ünde; Gündoğan ve diğerleri, (2005) ülkemizden bildirilen çalışmada izolatların %67,5'inde (54/80); De Boer ve diğerleri, (2009) ise et örneklerinin %11,9'unda (264/2217) metisilin direnci tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Dirençli tespit edilen bu çalışmaların aksine, bazı çalışmalarda (Çelik, 2010; Pesavento, Ducci, Comodo ve Nostr, 2007) metisilin direnci tespit edilememiştir. Pesavento ve diğerleri, (2007) İtalya'da çiğ et örnekleri ile yaptıkları çalışmada (n=176) izolatların hepsi metisiline duyarlı bulunmuştur. Çelik, (2010)'nin yaptığı çalışmada örneklerinin hepsinin metisiline duyarlı olduklarını bildirmişlerdir. Yapılan çalışmalar kıyaslandığında ortaya çıkan farklılıklar direnç oluşumundaki antibiyotik kullanım sıklığına bağlanmaktadır.

Penisilin β -laktam antibiyotikler grubuna dahil olan ve enfeksiyonları tedavi etmek amacıyla oldukça sık tercih edilen önemli bir antibiyotiktir. Enfeksiyonlara neden olan bakterilerin büyümesini önleyen veya inhibe eden yıkıcı (bakterisidal) bir etki mekanizması vardır. Geniş etki spektrumlarının olması, uygun ve kolay ulaşılabilir olması, diğer antibiyotik çeşitlerine göre toksisitesinin düşük olması gibi etkenler penisilin antibiyotiğini değerli kılmıştır. Bunların yanı sıra bütün bakteri çeşitlerinde etki göstermemesi ve birtakım bakterilere direnç mekanizması oluşturmaları bazı sorunları da beraberinde getirmiştir (Bayar, 2014). Penisilin, bakteride hücre duvarı sentezlenirken, bu aşamadan sorumlu transpeptidaz enziminin, PBP'lerle (penisilin bağlayan protein) etkileşimi neticesinde peptidoglikan sentezini inhibe ederek hücre duvarının yapısını bozar. Penisilinlerin,

peptidoglikan tabakanın bağlantı bitiş yerindeki D-alanil-D-alanin yapısına benzerliği, PBP'lerin bir çeşit substrat olarak görev yapmasını sağlar (Soares ve diğerleri, 2012). *S. aureus* izolatlarının penisilin direncinin incelendiği çalışmamızda %58,62 oranında direnç tespit edilmiştir. Penisilin direncinin analiz edildiği çalışmalarda %26-%94 aralığında değerler bulunmuştur (Abdalrahman, Wells ve Fakhr, 2015; Bounar-Kechih, Taha Hamdi, Aggad, Meguenni ve Cantekin, 2018; Çelik, 2010; Hızlısoy ve diğerleri, 2018; Mahros, Samir Elghany ve Selam, 2021; Osman, Amer, Badr ve Saad, 2015; Thwala ve diğerleri, 2022)

Kelman ve diğerleri, (2011)'nin ABD'den bildirdikleri çalışmada et örneklerinin %26'sı; Thwala ve diğerleri, (2022)'nin Güney Afrika'daki et ve et ürünlerinin %38'i; Abdalrahman ve diğerleri, (2015)'nin ABD'nin Tulso eyaletinde örneklerin %36.1'i (79/219); Bounar-Kechih ve diğerleri, (2018) Cezayir'deki yapılan araştırmada sığır eti örneklerinin %72'si; Mahros ve diğerleri, (2021) Mısır'da etli sandviçlerin %73,7'si; Çelik, (2010) ülkemizde sığır etlerinden topladığı örneklerin %57,1'i; Hızlısoy ve diğerleri, (2018) Kayseri'de hayvansal kökenli gıdalardan elde ettikleri izolatların %81,1'i; Osman ve diğerleri, (2015) Mısır'da çiğ etlerin %94'ünü penisiline dirençli bulmuşlardır. Penisiline olan direncin yüksek düzeyde olması, insan ve hayvan sağlığında terapotik amaçla bu antibiyotiğin çok yaygın kullanılmasından kaynaklı olabileceği düşünmekteyiz (Gündoğan ve diğerleri, 2005).

Eritromisin makrolidler grubuna dahil olan antibiyotiktir. Bakterinin protein sentezini inhibe edici etkisi vardır. Stafilakokal enfeksiyonların tedavisinde sıkça kullanımından dolayı bu antibiyotiğe direnç geliştiren patojenik suşların ortaya çıkmasına neden olmuştur (Ali ve diğerleri, 2017). Eritromisin genellikle penisiline alerjik reaksiyon gösteren hastaların stafilokok enfeksiyonlarını tedavi etmek amacıyla kullanılmaktadır (Nossair, İbrahim, Khalifa ve Yussef, 2018). Bu tez kapsamında eritromisinin direnç profili incelenmiş ve izolatların %41,37'si eritromisine dirençli tespit edilmiştir.

Thwala ve diğerleri, (2022)'nin Güney Afrika'da yaptıkları çalışmada et ve et ürünlerinin %23,07'si; Bounar ve diğerleri, (2018)'nin sığır etleri orjinli çalışmalarında örneklerin %51'inde; Hızlısoy ve diğerleri, (2018)'nin çalışmalarında %17,9'unda; Gündoğan ve diğerleri, (2005)'nin yaptıkları çalışmada et numunelerinin %7,5'inde; Hasanpour ve diğerleri, (2017)'nin İran'dan bildirdikleri çalışmada çiğ etlerden izole edilen *S. aureus* izolatlarının %37,5'inde; Zaher ve diğerleri, (2023)'nin Mısır'daki çalışmalarının

%31,6'sında eritromisin direnci tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Dirençli bildirilen çalışmaların yanı sıra Topçu, (2006) incelediği örneklerin (n=23) hepsinin eritromisine duyarlı olduğunu açıklamıştır. Bizim çalışmamız kapsamında bulunan eritromisin direnci diğer araştırmacıların buldukları değerden yüksek olduğu görülmüştür. Bu direnç gelişiminin nedenini eritromisin antibiyotiğinin hayvan hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmasına bağlamaktayız.

Kloramfenikol, protein sentezini engelleyen fenikoller antibiyotik grubunun bir üyesidir. Bulunabilirliği ve düşük maliyeti nedeniyle 1950'lerden beri sağmal ve besi hayvanlarında tedavi amaçlı kullanılmıştır. İnsan vücudunda aplastik anemiye neden olma ihtimalinin yüksek olmasından dünya genelinde bazı ülkelerde gıda hayvanlarında kullanımı yasaklanmıştır. Ülkemizde ise 2002 yılı itibarıyla bu antibiyotiğin kullanılması durdurulmuştur (Şanlıbaba ve Şentürk 2018). Tez çalışmamız sonucunda izolatların %17,24'ünde (10/58) kloromfenikol direnci gözlemlenmiştir. Bu konu ile ilgili diğer araştırmacılar Amerika'da Abdalrahman ve diğerleri, (2015)'nin yaptıkları çalışmada sığır eti ve ürünlerinden elde edilen izolarda %4,1 (9/219); Tshipamba, Lubanza, Adetunji ve Mwanza, (2018) Güney Afrika'da yaptıkları çalışmada et örneklerinin %50'si; Savariraj ve diğerleri, (2018) Hindistan'da yaptıkları çalışmada %4.35 (4/92); Momtaz ve diğerleri, (2013) İran'dan bildirilen araştırmada %20.70; Keyvan ve Özdemir, (2016) Ankara'dan bildirdiği çalışmada %9 (2/120); Can, Elmalı ve Karagöz, (2017) Hatay'da yaptıkları çalışmada %2,5 oranında kloramfenikol direnci bulduklarını bildirmişlerdir. Bu bilgilerden farklı olarak İslam ve diğerleri, (2019) yaptıkları çalışmada (n=35) kloromfenikole dirençli izolat tespit edemediklerini bildirmişlerdir. Ülkemizden elde edilen direnç oranlarının düşük olmasında kloromfenikolün yasaklı antibiyotikler arasında olmasının etkili olduğunu düşünmekteyiz. Farklı ülkelerdeki antibiyotik kullanım mevzuatının farklı olması da direnç oranlarında değişikliğe sebep olmaktadır.

Gentamisin, aminoglikozidler grubunun üyesi olan, Gram (-) bakterilerde ve *Staphylococcus* türlerinin neden olduğu enfeksiyonlarda terapötik amaçla kullanılan bakterileri öldürmede etkili olan antibiyotik türüdür (Kılıç, 2017). Tez çalışmamız kapsamında elde edilen izolatların gentamisin direnci %10,34 (6/58) olarak bulunmuştur. Benzer şekilde diğer araştırmacılar Akgün, (2012) ülkemizde yaptıkları çalışmada örneklerin %8,2'sinin (n=19); Abd El Tawab, Maarouf ve El-Rais, (2018) Mısır'dan bildirdikleri raporda örneklerin %8,3'ünün; Keyvan ve Özdemir, (2016) Ankara ilindeki sığır karkaslarından elde edilen

izolatların %45,5'inin (n=1); Kim, M., Kim, H.S., Kim, Y.H. ve Kwak, (2020) Kore'de perakende etlerin %4.2'sinin (33/777); Wu ve diğerleri, (2018) Çin'de et ve et ürünlerinin analiz edildiği çalışmalarında %19,4'ünün (169/868) gentamisine dirençli olduklarını bildirmişlerdir. Bu verilerin aksine Topçu, (2006) ve Ed-Dra ve diğerleri, (2018) yaptıkları çalışmalarda gentamisine dirençli izolat tespit edilmediğini bildirmişlerdir.

İmipenem, karbapenemler antibiyotik grubuna dahil olan bir çok patojenik mikroorganizmaya karşı etki alanı çok geniş bir antimikrobiyal ajanlardan biridir. Değişik enfeksiyonların tedavisinde klinik vakalarda sıklıkla tercih edilmektedir (Silva, A., Silva, Igrejas ve Poeta, 2020). Sunduğumuz çalışmada izole edilen örneklerde imipeneme karşı direnç gelişimi gözlenmemiştir. Bizim verilerimizle aynı sonuç alan bazı çalışmalar mevcuttur. Cebeci ve Gündoğan, (2021) Giresun ve Trabzon illerinde yaptıkları çalışmada sığır eti örneklerinin hepsinin (n=30); Osada ve diğerleri, (2022) Japonya'da yapılan çalışmada izolatlarının hepsinin (n=10) imipeneme duyarlı olduklarını bildirmişlerdir. Duyarlı bildirilen çalışmaların yanı sıra Islam ve diğerleri, (2019) Bangladeş'in Dakka kentinde yaptıkları çalışmada gıda örneklerinin %6'sının (2/35) imipeneme dirençli olduğunu tespit etmişlerdir. Ülkemizden bildirilen çalışmalarda gıda orjinli araştırmalarda imipenem antibiyotiğinin sınır sayıda kullanıldığı ve bu antibiyotikle ilgili çalışmaların daha çok klinik kaynaklı olduğu görülmüştür.

Aminoglikozitler grubu antibiyotiklerden olan tobramisin protein sentezini inhibe ederek etkisini göstermektedir. Tobramisin, önemli stafilokok enfeksiyonlarına karşı kullanılan en etkili antibiyotikler arasındadır. Bu çalışma kapsamında tobramisine %6,89 (4/58) oranında direnç tespit edilmiştir. Bu amaç doğrultusunda; Guran, Bozan Bayrak, Alali ve Yesiloglu, (2022) tarafından Diyarbakır'da MRSA izolatlarının antimikrobiyal direncinin incelendiği çalışmada %100 (n=4); Komodromos ve diğerleri, (2022)'nin Yunanistan'dan bildirdikleri çalışmada %13,6 (n=160); Bernier-Lachance ve diğerleri, (2020) Kanada'da MRSA izolatlarının %6,66 (1/15) oranında tobramisine direnç bulmuşlardır. Bu bilgilerin aksine Guran ve Kahya, (2015) Diyarbakır ilindeki kıyma örneklerinin (n=85) hepsini tobramisine duyarlı bulmuşlardır. İmipenem ve tobramisine karşı direnç oluşmaması ve düşük oranda direnç tespit edilmesinde stafilokokal enfeksiyonlara karşı hayvanları tedavi etmek için daha az kullanılıyor olduğu düşünülmektedir.

Florokinolon grubu antibiyotiklerden olan levoflaksasin, çeşitli bakterilere karşı etki mekanizması oldukça geniş olan bir antibiyotiktir. Klinik amaçlı *Mycobacteriaceae* enfeksiyonlarını tedavi etmek amacıyla ve tüberkülozun tedavisinde kullanılan bir antibiyotiktir. Toksik etkilerinin yüksek olması nedeniyle günümüzde kullanımı çok tercih edilmemektedir (Kayılı, 2020). Bu çalışma kapsamında levoflaksasine %1,72 (1/58) oranında düşük direnç tespit edilmiştir. Bizim verilerimizin aksine yüksek oranda direnç tespit edilen çalışmalar vardır. Beshiru, Igbinosa E.O. ve Igbinosa I.H., (2021) tarafından Nijerya'dan bildirilen çalışmada %41,5 (22/53); Igbinosa ve diğerleri, (2023) tarafından perakende etlerin antibiyotik direncinin incelendiği çalışmada %76,4 (84/110); Torki-Baghbaderani, (2020) tarafından İran'dan bildirilen çalışmada et örneklerinden izole edilen *S. aureus* suşlarında %22,91 (11/48) oranında levofloksasine direnç tespit edilmiştir. Bu verilerin aksine Kelman ve diğerleri, (2011) ABD'de et örneklerini inceledikleri çalışmada örneklerin Levofloksasine dirençli suş tespit edilmediğini bildirmişlerdir. Levoflaksasine düşük oranlarda gelişen direncin, yüksek toksisitesi olması sebebiyle kullanımının sınırlı olduğunu düşünmekteyiz.

Tez kapsamında kıyma ve köftelerdeki piperasilin-tazobaktam antibiyotiğinin antibiyotik profili incelendiğinde, izolatların piperasilin-tazobaktama karşı direnç oluşturmadığı tespit edilmiştir. Litaratür çalışmaları incelendiğinde yapılan çalışmaların çoğunlukla klinik örnekler üzerinde olduğu görülmüştür. Kıyma ve köfte örneklerinde ve diğer gıda örneklerinde bu antibiyotiğin antimikrobiyal duyarlılığına rastlanmamıştır. Bu yönden çalışmamız gelecekteki araştırmalara bilgi vermesi açısından önem arz etmektedir.

Bizim çalışma sonucumuz ve diğer araştırmacıların sonucu arasında farklılıkların görülmesi, reçete edilen antibiyotik türlerinin ve antibiyotik fiyatlarının farklı olması, antibiyotik kullanımını kısıtlayan düzenlemelerin uygulanabilirliği gibi etkenlerden kaynaklı olabilmektedir. Yapılan araştırmalar, antibiyotiklere direnç geliştiren *S. aureus* izolatlarının sadece hastane kaynaklı değil, gıda maddelerinde de bulunabileceğini göstermiştir. Antimikrobiyal direncin insanlara ve çevreye yayılmasında gıda maddelerinin çok önemli bir aracı olduğu neticesi ortaya çıkmıştır. Et ve et ürünlerinde *S. aureus* varlığının tespit edilmesi ve test edilen bazı antibiyotiklere karşı direnç gelişimi, gıda ürünleri ve halk sağlığı açısından risk olarak görülmektedir.

Biyofilm tabakası, mikroorganizmayı konakçının immun sistem elemanlarından, antibakteriyel ajanlardan, değişik kimyasal maddelerden ve dezenfektan etkisinden koruyan ekzopolisakkarit yapılı bir kalkandır. Gıda sanayisinde bakteriyel biyofilm oluşturma önemlidir. Mikroorganizmanın gıdaların üretildiği ortamlarda tutunarak biyofilm oluşturması gıdalar için bir tehdittir. Biyofilm tabakası sayesinde patojenik bakterilerin ya da gıda maddelerinde bozulmaya neden olan bakterilerin gıdalarda kontaminasyonu kaçınılmaz olmaktadır (Gündoğan ve Ataol, 2012). Biyofilm, gıda sanayisinde herhangi bir matriste veya herhangi bir yüzey tipine yapışarak oluşabilmektedir. *S. aureus*'lar, et veya et ürünlerinin temas ettikleri yüzeylerde biyofilm tabakası oluşturarak mikrobiyal kontaminasyona neden olabilir (Abbasi, Tajbakhsh ve Momtaz, 2021)

Bu tez kapsamında kıyma ve köfte örneklerinde biyofilm üretimi fenotipik bir değerlendirme olan kongo kırmızı agar (CRA) metoduyla incelenmiştir. Kongo kırmızı agar metodunda izolatların %58,62'sinin (34/58) biyofilm ürettiği tespit edilmiştir. Biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi için kantitatif bir yöntem olan mikrotitrasyon plak yönteminde izolatların %58,62'sinin (34/58) biyofilm üreticisi olduğu tespit edilmiştir. 24 adet izolatta ise biyofilm üretimi tespit edilememiştir. Bu iki yöntemden elde edilen sonuçların uyumlu olduğu görülmüştür. İzolatların genotipik olarak doğrulanması için yapılan PZR analizinde 3 izolatta *icaD*, 2 izolatta ise *icaA* geni pozitif olarak değerlendirilmiştir. Bu konuyla ilgili olarak diğer araştırmacıların çalışmaları mevcuttur.

Gündoğan ve Ataol, (2012) tarafından Ankara'da et ve et ürünlerinden *S. aureus* izolatlarının biyofilm üretmesi incelendiğinde kıyma numunelerinin %50'si, tavuk etlerinin %41,5'i biyofilm üreticisi olarak bildirilmiştir. Gündoğan, Çıtak ve Turan, (2006) yaptıkları çalışmada kongo kırmızısı agar yöntemiyle *S. aureus* izolatlarında %52,7 (n=180) oranında biyofilm pozitif izolat tespit etmişlerdir. Çıtak, Varlık ve Gündoğan, (2007) tarafından çiğ süt numunelerindeki biyofilm oluşumu kongo kırmızı agar yöntemiyle araştırılmış ve izolatlarının %5,1'inde biyofilm oluşumu tespit edilmiştir. Özpınar, (2011)'ın yaptığı çalışmada Erzincan'a özgü tulum peynirlerindeki biyofilm oluşumu araştırılmış ve %60,65 (n=35) oranında biyofilm oluşturan izolat tespiti yapılmıştır. Igbiosa ve diğerleri, (2023) et ürünleri orjinli yaptıkları çalışmada izolatların %76,36 (84/110) oranında biyofilm oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Abbasi ve diğerleri, (2021) tarafından bildirilen bir başka çalışmada izolatların %91,8 (56/61) oranında biyofilm oluşturduğu gözlemlenmiştir.

Kaya, (2016)'nın biyofilm oluşumunu mikrotitrasyon plak yöntemi kullanılarak yaptığı çalışmasında izolatların %97,6'sının (n=42) biyofilm üreticisi olduğu, sadece bir izolatın biyofilm üretmediği bildirilmiştir. Biyofilm üreten suşların 42'sinde *icaA* ve *icaD* genlerinin varlığı saptanmıştır. Eskici, (2018) tarafından yapılan bir çalışmada kongo kırmızı agar metoduyla incelenen örneklerin %52,2 oranında biyofilm pozitif olduğu, kristal viyole metoduyla incelenen örneklerin %90,9'unda biyofilm oluştuğu tespit edilmiştir. İzolatlarda *icaA* ve *icaD* gen varlığı %95,4 oranında (44/42) tespit edilmiştir. Vasudevan ve diğerleri, (2003) *icaA* ve *icaD* genlerinin belirlenmesi amacıyla yaptıkları çalışmada, %91,46 (32/35) izolatın CRA'da biyofilm oluşturduğu ve %100 oranında *icaA* ve *icaD* gen varlığı tespit edilmiştir. Dhanawade, Kalorey, Srinivasan, Barbuddhe ve Kurkure, (2010) tarafından yapılan çalışmada izolatların CRA metoduyla %48,03 oranında, tüp metoduyla %36,27 oranında biyofilm üreticisi olduğu tespit edilmiştir. İncelenen izolatların %35,29'unda (36/102) *icaA* ve *icaD* genlerinin tespiti yapılmıştır. Derviş ve Asfour, (2013) yaptıkları çalışmada izolatlarının CRA metoduyla %32,5 mikrotitre plaka metoduyla %52,5 oranında biyofilm oluşumu, *icaA* geninin varlığı %15, *icaD* geninin varlığı %62,5 oranında tespit edilmiştir.

Litaratür çalışmaları incelendiğinde ve bizim çalışma sonucumuzda biyofilm oluşumunda farklılıklar görülmüştür. Bu durum mikroorganizmanın üretildiği ortamın ve laboratuvar koşullarının farklı olması, konakçı doku koşullarındaki farklılık, in vitro deneylerin besiyeri bileşimi, glukozun olması ve yoğunluğu, pH gibi etkilerden kaynaklı olabileceği belirtilmiştir (Dhanawade ve diğerleri, 2010).

Çalışmamız sonucunda *S. aureus* izolatlarında bakteriyel tutunmayı sağlayan biyofilm üretiminin CRA ve mikrotitrasyon plak yönteminde orta güçlükte olduğu tespit edilmiştir. *icaA* ve *icaD* genlerini taşımayan izolatlarında CRA ve mikrotitrasyon plak yönteminde biyofilm ürettiği görülmüştür. Bu nedenle *icaA* ve *icaD* genlerinin tek başına biyofilm üretiminde yeterli olmadığı düşüncesine varılmıştır. Biyofilm üretiminde *icaA* ve *icaD* genlerinin varlığından farklı olarak, çevresel etkilerin, farklı genetik faktörlerin ve etkisi incelenmeyen genlerin de var olması biyofilm üretiminde etkilidir.

6. SONUÇ

Tez araştırmamız kapsamında Amasya ilinden toplanan 60 adet (30 kıyma ve 30 köfte) et ürünlerinden 297 *Staphylococcus* sp. elde edildi ve bu izolatlardan 58'i (%19,52) *S. aureus* olarak doğrulandı. 58 örneğin hepsinde 16S *rRNA* ve *nuc* gen varlığının tespiti yapılmıştır. Yapılan antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarına göre örneklerinin hepsi (%100) imipenem ve piperasilin-tazobaktam antibiyotiğine karşı duyarlılık tespit edildi. Bunun aksine metisiline %43,10 (25/58), eritromisine %41,37 (24/58), penisiline %58,62 (34/58), gentamisine %10,34 (6/58), kloramfenikole %17,24 (10/58), tobramisine %6,89 (4/58) ve levoflaksasine %1,72 (1/58) oranında direnç tespit edildi. CRA'da biyofilm oluşumu %58,62 (34/58), mikrotitrasyon plak yönteminde biyofilm oluşumu %58,62 (34/58) olarak tespit edildi. PZR analizinde 3 izolatta *icaD*, 2 izolatta ise *icaA* geni pozitif olarak değerlendirildi.

Litaratür incelemeleri sonucunda yapılan çalışmalar çoğunlukla *S. aureus*'un yüksek oranda direnç geliştirdiği antibiyotiklere yoğunlaşmıştır. Et ve et ürünlerinden *S. aureus*'un piperasilin-tazobaktom, imipenem ve tobramisin gibi antibiyotiklere karşı direnç oluşturması hakkında yeterli bilgi bulunamamıştır. Bu nedenle elde ettiğimiz sonuçlar gelecekte yapılacak araştırmalar için kaynak olarak görülmektedir.

Halkın tüketimine sunulan et örneklerinden *S. aureus* izole edilmesi, bu mikroorganizmanın gıda üretiminin herhangi bir basamağında gıda maddesini kontamine edebildiğini göstermektedir. Bu suşların biyofilm oluşturma yeteneklerinin olması insan sağlığı için tehlike oluşturabilmektedir. Gıda maddelerin bozulmasına ve kullanılamaz hale gelmesine neden olarak maddi kayıplara yol açabilir. Bu sebeple gıda maddelerinin üretim aşamasından sofraya gelene kadarki süreçlerde temizlik ve hijyen kurallarının uygulanması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Abbasi, K., Tajbakhsh, E., and Momtaz, H. (2021). Antimicrobial resistance, virulence genes, and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* strains isolated from meat and meat products. *Journal of Food Safety*, 41(6).
- Abd El Tawab, A. A., Maarouf, A. A. and El-Rais, E. M. (2018). Bacteriological and molecular studies on antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* isolated from meat and its products in Qaliobaya, Egypt.
- Abdalrahman, L.S., Wells, H. and Fakhr, M.K. (2015). *Staphylococcus aureus* is More Prevalent in Retail Beef Livers than in Pork and other Beef Cuts. *Pathogens* 28;4(2):182-98.
- Abriouel, H., Knapp, C.W., Galvez, A. and Benomar, N. (2017). Antibiotic resistance profile of microbes from traditional fermented foods. *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*, Chapter 29, 675-704.
- Akan, M. (2006). *Staphylococcus aureus Enfeksiyonları*, ed. Aydın, N., Paracıklioğlu, J. Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). Ankara: İlke-Emek Yayınları.
- Alen, S., Koneman, E., Janda, W., Schreckenberger, P., Winn, W., Woods, G. et al. (2006). The Gram-positive cocci: Part 1: *Staphylococci* and related organism. In: *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5th Ed, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 539- 576.
- Ali, Y., Islam, A., Muzahid, N.H., Sikder, O.F., Hossain, A. and Marzan, L.W. (2017). Characterization, prevalence and antibiogram study of *Staphylococcus aureus* in poultry. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(3): 253-256.
- Allison, D.G. (2003). The biofilm matrix. *Biofouling*, 19 (2): 139-150.
- Al-Mebairik, N.F., El-Kersh, T.A., Al-Sheikh Y.A. and Marie, M.A.M. (2016). A review of virulence factors, pathogenesis, and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Reviews in Medical Microbiology*, 27: 50-56.
- Andrew, E., Waters, Contente-Cuomo, T., Buchhagen, J., Liu, C.M., Watson, L. et al. (2011). Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* in US Meat and Poultry, *Clinical Infectious Diseases*, 52, 10.
- Ardıç, N., Ozyurt, M., Sareyyupoglu, B. ve Haznedaroglu, T. (2005). Investigation of erythromycin and tetracycline resistance genes in methicillin-resistant *staphylococci*. *Internatiol Journal Antimicrobial Agents*, 26: 213–218.
- Balaban, N. And Rasooly, A. (2000). Staphylococcal enterotoxins. *Internatiol Journal Food Microbiology*, 61, 1–10.
- Baran, A., Erdoğan, A., Turgut, T. ve Adıgüzel, M.C. (2017). A review on the presence *Staphylococcus aureus* in cheese. *Türk Doğa ve Fen Dergisi*, 6 (2):100-105.

- Bayar, İ. (2014). *Hayvansal Gıda Örneklerinde Penisilin Grubu Bazı Antibiyotik Kalıntılarının Belirlenmesine Yönelik Kitosan Bazlı Sorbentlerin Hazırlanması*, Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Bayrakal. V. ve Baskın, H. (2018). Quorum Sensing ve Biyofilm. *Biyofilm Enfeksiyonları*. Ankara: Türkiye Klinikleri.
- Bennerman, T.L. (2003). *Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase-Positive Cocci That Grow Aerobically In Manual of Clinical Microbiology*. 8 Ed. Murray PR., Baron EJ., Jorgensen Jh., Pfaller Ma., Tenover Fc., Tenover Fc., ed, ASM press, Washington U.S.A.
- Bergdoll, M.S. (1989). *Staphylococcus aureus*. *Journal- Association of Official Analytical Chemists*, 74(4), 706-710.
- Bernier-Lachance, J., Arsenault, J., Usongo, V., Parent, É., Labrie, J., Jacques, M. et al. (2020). Prevalence and characteristics of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) isolated from chicken meat in the province of Quebec, Canada. *PLoS One*, 15(1).
- Beshiru, A., Igbinosa, I.H. and Igbinosa, E.O. (2021) Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from ready-to-eat seafood (RTES). *LWT* 135:110042.
- Bien, J., Sokolova, O. and Bozko, P. (2011). Characterization of virulence factors of *Staphylococcus aureus*: novel function of known virulence factors that are implicated in activation of airway epithelial proinflammatory response. *Journal of Pathogens*, 13p.
- Bilgehan, H. (2002). *Klinik mikrobiyolojik tanı*. İzmir: Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi.
- Bounar-Kechih, S., Taha Hamdi, M., Aggad, H., Meguenni, N. and Cantekin, Z. (2018). Carriage methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in poultry and cattle in Northern Algeria. *Veterinary medicine international*. 4636121,5.
- Brooks, G.F., Carroll, K.C., Butel, J.S. and Morse, S.A. (2007). The *Staphylococci*. In: *Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology*, New York.
- Buyukcangaz, E., Velasco, V., Sherwood, J.S., Stepan, R.M., Koslofsky, R.J. and Logue, C.M. (2013). Molecular typing of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) isolated from animals and retail meat in North Dakota, United States. *Foodborne Pathogenes Disases* 10, 608–617.
- Camara, M. (2007). Quorum sensing: A cell-cell signalling mechanism used to coordinate behavioural changes in bacterial populations International Workshop on Membrane Computing, 4361: 42-48.
- Can, H.Y., (2011). *Farklı Tip Peynirlerde Staphylococcus Aureus'un Enterotoksin Oluşturma Yeteneği İle Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- Can, H.Y., Elmalı, M. ve Karagöz, A. (2017). Molecular typing and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk, cheese, minced meat, and chicken meat samples. *Korean journal for food science of animal resources*, 37(2), 175.
- Catalán-Matamoros, D., Pariente, A. and Elias-Perez, C. (2019). What we know about media communication on antibiotics and antimicrobial resistance: A systematic review of the scientific literature. *Patient Education and Counseling*, 102: 1427-1438.
- Cebeci, T. ve Gündoğan, N.(2021). Et örneklerinden izole edilen *Staphylococcus Aureus*'un enterotoksin üretimi ve antibiyotik direnç profili. *Hitit Medicine Journal*, 21;3(2):13-19.
- Cengiz, A.T. (1999). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ed. Ustaçelebi, S. Güneş Kitabevi, Ankara, 339-348.
- Cengiz, M. (2010). Bakterilerde Kinolon Direncinin Genetiği. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 29(1), 55-60.
- Chae, M. S. and Schraft, H. (2000). Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. *Internatiol Journal Food Microbiol*, 5;62(1-2): 103-111.
- Chambers, H.F. and DeLeo, F.R. (2009). Direnç dalgaları: Antibiyotik çağında *Staphylococcus aureus*. *Nature Review Microbiology*, 7 (9), 629-641.
- Chmielewski, R. A. N. and Frank, J. F. (2003). Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2: 22-32
- Christensen, G.D., Baldassari, L. and Simpson, W.A. (1994). Colonization of medical devices by coagulase-negative staphylococci. In: Bisno A, Waldvogel FA (editors). Infections Associated with Indwelling Medical Devices. *American Society Microbiology*, USA.
- Corcoran, M. (2013). *Salmonella enterica*-Biofilm Formation and Survival of Disinfection Treatment on Food Contact Surfaces. *National University of Ireland Galway*. PhD Thesis.
- Cucarella, C., Tormo, M.A, U'beda, C, Trotonda, M.P, Monzo'n M, Peris, C., Amorena, B., Lasa, I. and Penades, J. (2004). Role of Biofilm-Associated Protein Bap in the Pathogenesis of Bovine *Staphylococcus aureus* Infection And immunity, 72, 2177–2185.
- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I. and Penadés, J.R. (2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal Bacteriology*, 183:2888-96.

- Çelik, Ç. (2010). *Gıdalardan İzole Edilen Staphylococcus Aureus Suşlarının Çeşitli Antibiyotiklere Karşı Duyarlılıklarının Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Çelik, P. (2012). *Kanatlı Eti (Hindi Eti Ve Tavuk Eti) Ve Kırmızı Et Karışımı İle Elde Edilen Köftelerin Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- Çıtak, S., Varlık, Ö. ve Gündoğan, N. (2007). Slime production and DNase activity of *staphylococci* isolated from raw milk. *Journal of Food Safety*, 23. 281 - 288.
- da Silva, A.C., Rodrigues, M.X. and Silva, N.C.C. (2020). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food and its prevalence in Brazil: a review. *Brazilian journal of microbiology: [Brazil Society of Microbiology publication]*, 51 (1), 347–356.
- Dafe, A. (2012). *Tavuk Etlerinde Staphylococcus Aureus İzolasyonu, PCR Yöntemi ile Enterotoksin Tiplendirilmesi ve Meca, Tetm, Tetk, Erma, Ermc Genlerinin Saptanması*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Dalkılıç, E. (2016). *Klinik Staphylococcus aureus izolatlarında metisilin, makrolidlinkozamid-streptogramin B ve vankomisin direncinin araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Darwish, S. F. and Asfour, H. A. (2013). Investigation of biofilm forming ability in *Staphylococci* causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. *The Scientific World Journal*, 2 :378492.
- De Boer, E., Zwartkruis-Nahuis, J. T. M., Wit, B., Huijsdens, X. W., De Neeling, A. J., Bosch, T. et all. (2009). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. *International journal of food microbiology*, 134(1-2), 52-56.
- Delmi, M., Vaudaux, P., Lew, D. P. and Vasey, H. (1994). Role of fibronectin in staphylococcal adhesion to metallic surfaces used as models of orthopaedic devices. *Journal of orthopaedic research*, 12(3), 432-438.
- Deniz, G.Y. ve Ulukanlı, Z. (2012). Ağrı İli Merkezinde Hazır Olarak Satışa Sunulan Kıyma Örneklerinin *Salmonella* spp. Yönünden İncelenmesi. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 1(2), 86-95.
- Devren, A. (2004). *Çeşitli Et Ürünlerinden İzole Edilen Staphylococcus aureus 'un Gelişimi Üzerine pH, NaCl ve Potasyum Sorbat'ın Etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Dhanawade, N. B., Kalorey, D. R., Srinivasan, R., Barbuddhe, S. B. and Kurkure, N. V. (2010). Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production, in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Veterinary Research Communications*, 34: 81-9.

- Doğan, S.Ş. (2014). *Koagülaz Pozitif Ve Koagülaz Negatif Stafilocokların Glikopeptid Antibiyotiklere Duyarlılıklarının Otomatize Yöntem, Disk Difüzyon Ve E-Test Yöntemleriyle Araştırılması*. Uzmanlık Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kahramanmaraş.
- Donham, K.J. (2010). Community and occupational health concerns in pork production. *Journal Animal Science*, 88: 102-111.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 8(9), 881.
- Ed-Dra, A., Rhazi Filali, F., Bouymajane, A., Benhallam, F., El Allaoui, A., Chaiba, A. et all. (2018). Antibiotic Susceptibility profile of *Staphylococcus aureus* isolated from sausages in Meknes, Morocco, *Veterinary World*, 11(10): 1459-1465.
- Erdoğan, Ç.ve Korukluoğlu, M. (2018). Antibiyotik dirençli *Staphylococcus aureus* ve gıda güvenliği açısından önemi. *Gıda ve Yem Bilimi Teknoloji Dergisi*, 19: 9-15.
- Erdoğan S.F. ve Konak, S. (2019). Determination of the Biofilm Production Capabilities of *Staphylococcus* spp. and the Effects of Some Antibiotics on These Isolates. *Fresenius Environmental Bulletin*, 7: 5253-5259.
- Erol, İ. (2007). Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi. Ankara, Pozitif Matbaacılık, 135-144.
- Erol, İ. (2016). Yeni Ve Yeniden Önem Kazanan Gıda Kaynaklı Bakteriyel Zoonozların Epidemiyolojisi. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 87(2): 63-67.
- Erol, İ. ve İşeri, O. (2004). Stafilocokal enterotoksinler. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 51: 239-245.
- Eskici, B. (2018). *Süt Ürünlerinden İzole Edilen Staphylococcus Aureus Suşlarında İcaa ve icaD Genlerinin Ve Biyofilm Üretiminin Tespiti*, Yüksek Lisans Tezi, Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Farias, A. L. N. and Frota, C. C. (2015). *Staplylococcus aureus* (MRSA and CA-MRSA strains) in South America: comparative review to emergence of strains in North America and worldwide. *Review Medicine*, 55(2), 39-45.
- Forbes, B.A., Sahm, D.F. and Weissfeld, A.S. (2002). Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology 11th edition.
- Foster, T. J. and Höök, M. (1998). Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends in microbiology*, 6(12), 484-488.
- Freeman, D.J., Falkner, F.R. and Keane, C.T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal Clinical Pathology* 42, 872-874.

- Ge, B., Mukherjee, S., Hsu, C. H., Davis, J. A., Tran, T. T. T., Yang, Q. et al. (2017). MRSA and multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in US retail meats, 2010–2011. *Food microbiology*, 62, 289-297.
- Gerke, C., Kraft, A., Sussmuth, R., Schweitzer, O. and Götz, F. (1998). Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin (PIA). *Journal Biology Chemistry*, 17;273(29): 18586-93.
- Götz, F. (2002) *Staphylococcus* and biofilms. *Molecular Microbiology*, 43(6), 1367-78.
- Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S. and Tribedi, P. (2016). Biofilm, pathogenesis and prevention--a journey to break the wall: a review. *Archives Microbiology*, 198(1):1-15.
- Guran, H.S. ve Kahya, S. (2015), Perakende Kıyma Etlerinden İzole Edilen Stafilocokların Tür Çeşitliliği ve Feno- ve Genotipik Antibiyotik Direnç Modelleri. *Gıda Bilimi Dergisi*, 80.
- Guran, H.S., Bozan Bayrak, A.R., Alali, W.Q. and Yesiloglu, C. (2022). Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from retail raw meats in Turkey. *International Food Research Journal* 29(5): 1089 -1100.
- Gün, İ. ve Ekinci, F.Y. (2009). Biyofilmler : Yüzeylerdeki Mikrobiyal Yaşam Biofilms : *Microbial Life on Surfaces*, (34): 165–173.
- Gündoğan N, Ataol Ö. (2012). Et örneklerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* ve koagülaz negatif stafilocok'ların biyofilm üretimi ve DNaz aktivitelerinin belirlenmesi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 69(3): 135-42.
- Gündoğan, N., Citak, S. and Turan, E. (2006). Slime production, DNase activity and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk, pasteurised milk and ice cream samples. *Food Control*, 17. 389-392.
- Gür, D. (2002). Topçu, A.W. Bakterilerde Antibiyotiklere Karşı Direnç. İçinde *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji Sistemlere Göre Hastalıklar*, İstanbul; Nobel Tıp Kitabevleri Limited Şirketi.
- Haghi, F., Zeighami, H., Hajiloo, Z. Torabi, N. and Derakhshan, S. (2021). High frequency enterotoxin encoding genes of *Staphylococcus aureus* isolated from food and clinical samples. *Journal Health Population Nutriotion*, 40, 27.
- Halkman, A.K. (2005). Ed: Başak, A. *Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları*. Ankara: Anonymus Matbaacılık Limited Şirketi.
- Hanson, B. M., Dressler, A. E., Harper, A. L., Scheibel, R. P., Wardyn, S. E., Roberts, L. K. et al. (2011). Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on retail meat in Iowa. *Journal of infection and public health*, 4(4), 169-174.

- Harmsen, M., Yang, L., Pamp, S.J. and Nielsen, T.T. (2010). An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance and dispersal. *FEMS Immunology Medicine Microbiology*, 59, 253-268.
- Hartman, B.J. and Tomasz, A. (1984). Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 158:513-6.
- Hartstein, A.I., Sebastian, T.J. and Strausbaugh, L.J. (2004). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, Mayhall CG (ed): *Hospital Epidemiology and Infection Control*. Lippincott Williams and Wilkins.
- Hasanpour, D.A, Khaji, L., Sakhaei Shahreza, M.H. Mashak, Z., Safarpour Dehkordi, F., Safae, Y. et al. (2017). One-year prevalence of antimicrobial susceptibility pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* recovered from raw meat. *Tropical Biomedicine*, 34(2):396–404.
- Hazımoğlu, Ş. (2011). *Staphylococcus Aureus* Suşlarında Panton-Valentine Lökosidin (PVL) Genlerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Heshmati, B. (2019). *Bakteriyofajların Bazı Gıda Ve Klinik Örneklerden İzole Edilen Salmonella Spp. Ve Salmonella Biyofilmi Üzerine Etkisi*, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Hizlisoy, H., Ertas Onmaz, N., Karadal, F., Al, S., Yildirim, Y., Gonulalan, Z. and Kilic, H. (2018). Antibiotic resistance gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from foods of animal origin. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 24 (2): 243-249.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. and Williams, S. T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Hooper, D.C. and Jacoby, G.A. (2015). Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1354 (1), 12-31.
- Horasan Yakan, A. (2021). *Afyonkarahisar'da Satışa Sunulan Kaymaklardan İzole Edilen Staphylococcus aureus Suşlarında Metisilin Ve Pantonvalentine Lökosidin Genlerinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar.
- Hussain, M., Wilcox, M. and White, P. (1993). The slime of coagulase-negative staphylococci: Biochemistry and relation to adherence. *FEMS Microbiology*, 10,191-207.
- Hutchings, A., Truman, A.W. and Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future, *Current Opinion in Microbiology*, 51, 72-80.

- Igbinosa, E.O., Beshiru, A., Igbinosa, I.H., Ogofure, A.G., Ekundayo, T.C. and Okoh, A.I. (2023). Prevalence, multiple antibiotic resistance and virulence profile of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in retail poultry meat from Edo, Nigeria. *Front Cell Infection Microbiology*.
- Ilgaz, A., Ak, S., Özgür, Y. ve İkiz, S. (2011). *Veteriner Hekimlik Mikrobiyolojisi, Hayvan Hastalığı Etkeni Olan Bakteriler Ve Mantarlar*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.
- Ilgaz, A., Ak, S., Özgür, Y. ve İkiz, S. (2012). *Veteriner Hekimlik Mikrobiyolojisi*, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
- Islam, M.A., Parveen, S., Rahman, M., Huq. M., Nabi, A., Khan, Z.U.M. et all. (2019). Occurrence and Characterization of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* in Processed Raw Foods and Ready-to-Eat Foods in an Urban Setting of a Developing Country *Front Microbiology*.
- Jackson, C.R., Davis, J.A. and Barrett, J.B. (2013). Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from retail meat and humans in Georgia. *Journal Clinical Microbiology*, 51(4):1199-207.
- Jefferson, K. K., Pier, D. B., Goldmann, D. A. and Pier, G. B. (2004). The teicoplanin-associated locus regulator (TcaR) and the intercellular adhesin locus regulator (IcaR) are transcriptional inhibitors of the ica locus in *Staphylococcus aureus*. *Journal Bacteriology*, 186:2449–2456.
- Kanaan, M.H.G. (2018). Antibacterial effect of ozonated water against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* contaminating chicken meat in Wasit Province, *Iraq Veterinari World*, 11(10):1445-1453.
- Kaya, F. (2016). *Süt İşletmelerinden İzole Edilen Staphylococcus Aureus Suşlarında icaA ve icaD Genleri Ve Biyofilm Üretiminin Tespiti*, Yüksek Lisans Tezi, Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Kayılı, E. (2020). *Beyaz Peynirlerde Koagülaz Pozitif Staphylococcus Aureus Varlığının Araştırılması Ve Antibiyotik Dirençlilik Düzeyinin Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Kayış, U. (2019). Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları. *Aydın Sağlık Dergisi*, 5 (1) , 1-12.
- Kelman, A., Soong, Y. A., Dupuy, N., Shafer, D., Richbourg, W., Johnson, K. et all. (2011). Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* from retail ground meats. *Journal of food protection*, 74(10), 1625-1629.
- Keyvan, E. (2019). Çiğ süt örneklerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* izolatlarında antibiyotik direnç özelliklerinin tespiti. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 90(1): 9-14.
- Keyvan, E. Ve Özdemir, H. (2016). Sığır karkaslarında *Staphylococcus aureus*'un varlığı, enterotoksijenik özellikleri ve antimikrobiyal dirençliliği, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 63, 17-23.

- Kılıç, A.S. (2017). Bursa’da Satışa Sunulan Dana ve Piliç Etlerinde Farklı Grup Anabolizan ve Antimikrobiyal Kalıntılarının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Kımıran Erdem, A., Sağlam, D., Ozer, D. ve Özcelik, E. (2014). Microbiological Quality of Minced Meat Samples Marketed in Istanbul, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 25 (3), 67 – 70.
- Kiedrowski, M.R. and Horswill, A. (2011). New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. *Annals New York Academy Sciences*, 1241:104-21.
- Kim, Y.H., Kim, H.S., Kim, S., Kim, M. and Kwak, H.S. (2020). Prevalence and Characteristics of Antimicrobial-Resistant *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Retail Meat in Korea. *Food Science Animal Resourse*, 40, 758–771.
- Kitai, S., Shimizu, A., Kawano, J., Sato, E., Nakano, C., Kitagawa, H. et all. (2005). Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* and enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in retail raw chicken meat throughout Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 67(3), 269-274.
- Koçak Kızanlık, P. (2019). *Çeşitli Kaynaklardan İzole Edilen Staphylococcus Aureus’un Bazı Virulens Özelliklerinin Belirlenmesi*, Doktora Tezi, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Koluman, A., Unlu, T., Dikici, A., Tezel, A., Akcelik, E. N. and Burkan, Z. T. (2011). Presence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in different foods. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17, 55-60.
- Komodromos, D., Kotzamanidis, C., Giantzi, V., Pappa, S., Papa, A., Zdragas, A. et all. (2022). Prevalence, Infectious Characteristics and Genetic Diversity of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Two Raw-Meat Processing Establishments in Northern Greece. *Pathogens*, 17;11(11):1370.
- Koneman, E.W., Winn, W.C., Allen, S.D., Janda, W.M., Procop, G.W., Schreckenberger, P.C. et all. (2006). Medical Bacteriology: Taxonomy, Morphology, Physiology, and Virulence; Staphylococci and Related Gram- Positive Cocci. USA In: *Koneman’s Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*.
- Kök, F., Keskin, D. ve Büyükyörük, S. (2007). Çine köftelerinin mikrobiyolojik kalitelerinin İncelenmesi. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 4(1):29-33.
- Ladhani, S. (2003). Understanding the mechanism of action of the exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 39, 181-189.
- Lasa, I. and Penadés J.R. (2006). Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. *Research in Microbiology*, 157 99–107.

- Lim, S. K., Nam, H. M., Park, H. J., Lee, H. S., Choi, M. J., Jung, S. C. et al. (2010). Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in raw meat in Korea. *Journal of microbiology and biotechnology*, 20(4), 775-778.
- Lina, G., Quaglia, A., Reverdy, M. E., Leclercq, R., Vandenesch, F. and Etienne, J. (1999). Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins among *Staphylococci*. *American Society Microbiology, Antimicrob Agents Chemotherapy*, 43:1062-1066.
- Lopez, M.C.V., Moreno, J.E., Rueda, V.R., Chirivi, J.S., Garzón, A., Arévalo, S.A. et al. (2012). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolated from Colombian Foods. *BIO*; 2, 61-67.
- Lowy F.D. (1998). *Staphylococcus aureus* Infections, *The New England Journal of Medicine*, 20, 520-31.
- Lozano, C., López, M., Gómez-Sanz, E., Ruiz-Larrea, F., Torres, C. and Zarazaga, M. (2009). Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in food samples of animal origin in Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(6), 1325-1326.
- Mack, D., Fischer, W., Krokotsch, A., Leopold, K., Hartmann, R., Egge, H. et al. (1996). The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *Journal Bacteriology*, 178: 175-183.
- Mah, T.F.C. and O'Toole, G.A. (2001). Mechanisms of Biofilm Resistance to Antimicrobial Agents. *Trends in Microbiology*, 9:34-39.
- Mahros, M.A., Elghany, S.A. and Sallam, K.I. (2021). Multidrug-, methicillin-, and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from ready-to-eat meat sandwiches: An ongoing food and public health concern, *International Journal Of Food Microbiology*, 346.
- Maira-Litran, T., Kropec, A., Abeygunawardana, C., Joyce, J., Mark, G., III, Goldmann, D. A. et al. (2002). Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. *Infection Immunity*, 70: 4433-40.
- Marth, E. H. and Halpindohnalek, M. I. (1989). Growth and production of enterotoxin-A by *Staphylococcus aureus* in cream. *Journal of Dairy Science*, 72: 2266-2275.
- McCallum, N., Berger-Bachi, B. and Senn, M.M. (2010). Regulation of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 300, 118-129.
- McClure, J. A., Conly, J. M., Lau, V., Elsayed, S., Louie, T., Hutchins, W. et al. (2006). Novel multiplex PCR assay for detection of the staphylococcal virulence marker Pantone-Valentine leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin-susceptible from resistant staphylococci. *Journal Clinical Microbiology*, 44: 1141-1144.

- Momtaz, H., Dehkordi, F.S., Rahimi, E., Asgarifar, A. and Momeni, M. (2013). Virulence genes and antimicrobial resistance profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from chicken meat in Isfahan province, Iran. *Journal Applied Poultry Research*, 22(4):913–921.
- Muratoğlu, K. (2010). *Gıdalardan İzole Edilen Staphylococcus Aureus Suşlarının Toksikjenik Özellikleri ve Antibiyotiklere Duyarlılıkları Üzerine Bir Araştırma*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S. and Kobayashi, G.S. (2002). *Staphylococcus* and related organisms. Louis: Medical Microbiology.
- Müştak, H.K. ve Esendal, Ö.M. (2008). *Staphylococcus aureus* ekzotoksinleri. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 19: 69-74.
- Nadell, C.D., Bassler, B.L. and Levin, S.A. (2008). Observing bacteria through the lens of social evolution. *Journal of Biology*, 7(7), 27.
- Nalça, A. ve Timur, G. (2021). Mastitisli Sığırlardan İzole Edilen *Staphylococcus aureus* İzolatlarının Virülens Gen Profillerinin Belirlenmesi. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 10(12), 144-152.
- Normanno, G., la Salandra, G., Dambrosio, A., Quaglia, N. C., Corrente, M., Parisi, A. et al. (2007) Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *Internatiol Journal Food Microbiology*, 115, 290-296.
- Nossair, M.A., İbrahim, H.A., Khalifa, E. and Yussef, H.A. (2018). *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat products and food processors: prevalence, antimicrobial susceptibility and molecular characterization. *Life Science Journal*, 15, 6; 14 – 21.
- Nouraldin, A.A.M., Baddour, M.M., Harfoush, R.A.H. and Essa, S.A.M. (2016). Bacteriophage-antibiotic synergism to control planktonic and biofilm producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Alexandria Journal Medicine*, 52, 99-105.
- Odalar, H.F. (2001). *Staphylococcus aureus*'un değişen epidemiyolojisi, *Emerging Infectious Diseases*. 7 (2).
- Osada, M., Aung, S.S., Urushibara, N., Kawaguchiya, N., Ohashi, N., Hirose, N. et al.(2022). Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative *Staphylococcus/Mammaliicoccus* from Retail Ground Meat: Identification of Broad Genetic Diversity in Fosfomycin Resistance Gene *fosB*, *Pathogens*, 11, 4, (469).
- Osman, K.M., Amer, A.M., Badr, J.M. and Saad, A.S. (2015). Prevalence and antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus* species in chicken and beef raw meat in Egypt. *Foodborne pathogens and disease*, 12(5), 406-413.

- Ozansoy, A., Cevahir, F. ve Kaleli, İ. (2015). Klinik Örneklerden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarında Makrolid, Linkozamid ve Streptogramin B Direncinin Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle Araştırılması, *Mikrobiyoloji Bülteni*, 49(1): 1-14.
- Özer, K. ve Ecem, A. (2014). Biyofilm oluşum mekanizması ve biyofilmlerin gıda güvenliğine etkisi. *Gıda ve Yem Bilimi - Teknolojisi Dergisi*, 14:42-51.
- Özpınar, N. (2011). *Erzincan Tulum Peynirinden İzole Edilen Staphylococcus Aureus İzolatlarında Antibiyotik Direncinin ve Biyofilm Oluşturma Özelliğinin Fenotipik Ve Genotipik Olarak Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
- Padera, R. F. (2006). Infection in ventricular assist devices: the role of biofilm. *Cardiovascular Pathology*, 15(5), 264–270.
- Papadopoulos, P., Papadopoulos, T., Angelidis, A., Boukouvala, E., Zdragas, A. and Papa, A. (2018). Prevalence of *Staphylococcus aureus* and of MethicillinResistant *S. Aureus* (MRSA) Along the Production Chain of Dairy Products in North-Western Greece. *Food Microbiology*, 69, 43-45.
- Patti, J.M., Allen, B.L., McGavin, M.J.and Hook, M. (1994). MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissue. *Annual Review Microbiology*, 48: 585–617.
- Peacock, S. (2006). Ed: Gillespie, S.H., Hawkey, P.M., John Wiley. *Staphylococcus aureus*. England: *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*.
- Pelisser, M., Klein, C.and Ascoli, K. (2009). Ocurrence of *Staphylococcus aureus* and Multiplex PCR Detection of Classic Enterotoxin Genes in Cheese and Meat Products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 145–148.
- Pesavento, G., Ducci, B., Comodo, N. and Nostro, A. L. (2007). Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: A research for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Food control*, 18(3), 196-200.
- Post, D. E. (1999). Foodborne pathogens (*Staphylococcus aureus*). England: Monograph number 6. Oxoid.
- Poulsen, L.V. (1999). Microbial biofilm in food processing. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 32 (6): 321- 326.
- Pourbabaee, M., Hadadi, M. R., Hooshyar, H., Pourbabaee, P. and Nazari-Alam, A. (2020). Prevalence of *Staphylococcus aureus* in raw hamburgers from Kashan in 2017. *International Archives of Health Sciences*, 7(1), 47.
- Reygaert, W.C. (2013). Antimicrobial resistance mechanisms of *S. aureus*. Ed: Mendez-Vilas, A. Spain: Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education.

- Rosenbach, A. (1884). *Staphylococcus aureus* Rosenbach. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 30: 365.
- Rozanska, A., Chmielarczyk, A., Romaniszyn, D., Bulanda, M., Walkowicz, M. and Osuch, P. (2017). Antibiotic resistance, ability to form biofilm and susceptibility to copper alloys of selected staphylococcal strains isolated from touch surfaces in Polish hospital wards. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 6(1):80.
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W. and Davies, D. G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Bacteriogr*, 184: 1140-54.
- Savariraj, W.R., Ravindran, N.B., Kannan, P., Paramasivam, R. Senthilkumar, T.M.A., Kumarasamy, P. et al. (2018). Prevalence, antimicrobial susceptibility and virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from pork meat in retail outlets in India. *Journal Food Safety*.
- Schwarz, S., Shen, J., Kadlec, K., Wang, Y., Brenner Michael, G., Febler, A.T. et al. (2016). Lincosamides, Streptogramins, Phenicol, and Pleuromutilins: Mode of Action and Mechanisms of Resistance, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*.
- Seixas, R., Santos, J.P., Bexiga, R., Vilela, C.L. and Oliveira, M. (2014). Short communication Antimicrobial resistance and virulence characterization of methicillin-resistant *staphylococci* isolates from bovine mastitis cases in Portugal. *Journal Dairy Science*, 97:340.
- Selçuk, T. (2018). *Staphylococcus Aureus İzolatlarında Antibiyotik Duyarlılığının Belirlenmesi Yüksek Lisans Tezi*, Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzincan.
- Seo, K.S. and Bohach, G.A. (2013). *Staphylococcus aureus*, In: *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*, Fourth Edition. American Society Microbiology, 547-574.
- Shorr, A.F. (2007). Epidemiology of staphylococcal resistance. *Clinical Infection Diseases*, 45: 171–176.
- Silva, A., Silva, V., Igrejas, G. and Poeta, P. (2020). Carbapenems and *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and epidemiology, United Kingdom: Antibiotics and Antimicrobial Resistance Genes in the Environment.
- Silva, L.V., Galdino, A.C.M., Nunes A.P.F., Santos K.R.N., Moreira B.M., Cacci L.C. et al. (2014). Virulence attributes in Brazilian clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Internatiol Journal Medicine Microbiology*, 8, 990–100.
- Sinde, E. and Carballo, J. (2000). Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene, the influence of free energy.

- Siriken, B. (2004). The microbiological quality of ground beef in Aydin and Afyon Provinces, Turkey. *Revue Medecine Veterinarie*, 155 (12), 632–636.
- Sköld, O. (2011). Antibiotics and antibiotic resistance. John Wiley Sons Inc.207, New Jersey.
- Soares, G.M., Figueiredo, L.C., Faveri, M., Cortelli, S. C., Duarte, P.M. and Feres, M. (2012). Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs.
- Soyutemiz, G.E. (1999)9. Bursa’da Satışa Sunulan Çeşitli Hazır Köftelerin Hijyenik Kalitesinin Saptanması. *Gıda Dergisi*, 24(3), 163-169.
- Soyutemiz, G.E. (2000). Bursa'da Satışa Sunulan Beş Farklı Grup Hazır Köftenin Kimyasal Bileşimi ve pH Değerlerinin Saptanması. *Gıda Dergisi*, 25, 49-53.
- Stefani, S. and Goglio, A. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: related infections and antibiotic resistance. *Internatiol Journal Infection Disases*, S19-22.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B. and Svabic-Vlahovic M.A. (2000). Modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal Microbiology Methods*. 40, 175-9.
- Sundsford, A., Simonsen, G.S., Haldorsen, B.C., Haaheim, H., Hjelmvoll, S., Littauer, P. et all. (2004). Genetic methods for detection of antimicrobial resistance. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica (AMPIS)*, 112: 815-837.
- Sutherland, J. and Varnam, A. (2002). Enterotoxin producing *Staphylococcus*, *Shigella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Aeromonas* and *Plesiomonas*, Foodborne pathogens, Washington.
- Sutra, L., Rainard, P. and Poutrel, B. (1990). Phagocytosis of mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* and expression of type 5 capsular polysaccharide are influenced by growth in the presence of milk. *Journal of Clinical Microbiology*, 28: 2253-2258.
- Szczuka, E., Urbańska, K., Pietryka, M. and Kaznowski, A. (2013). Biofilm density and detection of biofilm-producing genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Folia Microbiolgy*.
- Szweda, P., Schielmann, M., Milewski, S., Frankowska, A. and Jakubczak, A. (2012). Biofilm production and presence of ica and bap genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in eastern Poland. *Polish Journal Microbiology*, 61: 65-9.
- Şahin, R. (2007). *Staphylococcus Aureus* Suşlarında Biyofilm Üretimi, Biyofilm Pozitif Ve Negatif Suşların Genotipik Ve Fenotipik Karakterlerinin Karşılaştırılması, Uzmanlık Tezi, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Denizli.

- Şanlıbaba, P. (2022). Prevalence, antibiotic resistance, and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* isolated from retail raw beef, sheep, and lamb meat in Turkey. *Internatol Journal Food Microbiology*, 16;361:109461.
- Şanlıbaba, P. ve Şentürk, E. (2018). Prevalence, Characterization and Antibiotic Resistance of Enterococci from Traditional Cheeses in Turkey. *International Journal of Food Properties*, 21(1): 1955-1963.
- Şen, E. ve Özdemir, H. (2016). *Staphylococcus aureus*'un antibiyotik dirençliliği ve halk sağlığı açısından önemi. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 14 (1), 20-35.
- Tang, Y., Larsen, J., Kjeldgaard, J. Andersen, P.S., Skov, S. and Ingmer, H. (2017). Methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* from retail meat in Denmark, *International Journal of Food Microbiology*, 249, 72-76.
- Tegegne, H. A., Kolaçkova, I., Florianova, M., Gelbiçova, T., Madec, J. Y., Haenni, M. et al. (2021). Detection and molecular characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat in the retail market. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 26, 233-238.
- Thapaliya, D., Forshey, B. M., Kadariya, J., Quick, M. K., Farina, S., O'Brien, A. et al. (2017). Prevalence and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* in commercially available meat over a one-year period in Iowa, USA. *Food microbiology*, 65, 122-129.
- Thwala, T., Madoroba, E., Maliehe, T.S., Magwedere, K., Basson, A.K. and Butaye, P.(2022). Antimicrobial Resistance, Enterotoxin and *mec* Gene Profiles of *Staphylococcus aureus* Associated with Beef-Based Protein Sources from KwaZulu-Natal Province, South Africa. *Microorganisms*.
- Titouche, Y., Houali, K., Ruiz-Ripa, Ningadassalon, L., Nia, Y., Fatihi, A. et al. (2020). Enterotoxin genes and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from food products in Algeria, *Journal of Applied Microbiology*, 129; 4, 1, 1043–1052.
- Todar, K. (1994). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.
- Topçu, S. (2006). *Ankara'da Satışa Sunulan Döner Kebap Çeşitlerinden Listeria Monocytogenes, Staphylococcus Aureus, Aeromonas Hydrophila İzolasyonu Ve Çeşitli Antibiyotiklere Dirençlilikleri*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Torki Baghbaderani, Z., Shakerian, A. and Rahimi, E. (2020). Phenotypic and Genotypic Assessment of Antibiotic Resistance of *Staphylococcus aureus* Bacteria Isolated from Retail Meat. *Infection Drug Resistance*, 13:1339-1349.
- Tshipamba, M. E., Lubanza, N., Adetunji, M. C. and Mwanza, M. (2018). Molecular characterization and antibiotic resistance of foodborne pathogens in street-vended ready-to-eat meat sold in South Africa. *Journal of food protection*, 81(12), 1963-1972.
- Uğur, M., Nazlı, B. ve Bostan, K. (2001). *Gıda Hijyeni*, İstanbul Teknik Yayınevi.

- Ulusoy, S. Leblebicioğlu, H., Usluer, G. ve Ulusoy, S., (2003). Linolonlar. *Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler*, Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi.
- Van den Honert, M.S., Gouws, P.A. and Hoffman, L.C. (2021). A Preliminary Study: Antibiotic Resistance of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* from the Meat and Feces of Various South African Wildlife Species. *Food Science Animal Resources*, 41(1):135-144.
- Van Duijkeren, E., Schink, A.K., Roberts, M.C., Wang, Y. and Schwarz, S. (2018). Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Microbial Spectrum*, 6 (1): 31.
- Van Loo, I. H., Diederer, B. M., Savelkoul, P. H., Woudenberg, J. H., Roosendaal, R., Van Belkum, A. et all. (2007). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat products, the Netherlands. *Emerging infectious diseases*, 13(11), 1753.
- Vasudevan, P., Nair, M.K.M., Annamalai, T. and Venkitanarayanan, K.S. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Veterinary Microbiology*, 92, 179–185.
- Winn, W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G.W., Schreckenberger, P.C. et all. (2006). *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th ed. New York, Lippincott Williams Wilkins.
- Witte, W. (1999). Antibiotic resistance in Gram Positive bacteria: epidemiological aspects. *Journal Antimicrob Chemother*, 44, 1-9.
- Wu, S., Huang, J., Wu, Q., Zhang, J., Zhang, F., Yang, X. et all. (2018). *Staphylococcus aureus* Isolated From Retail Meat and Meat Products in China: Incidence, Antibiotic Resistance and Genetic Diversity. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2767.
- Yıldız, O. ve Aygen, B. (2002). Stafilokokların Antibiyotik Duyarlılığı ve Direnç Sorunu. *İnfeksiyon Hastalıkları Serisi*, 5(3):128-136.
- Yılmaz, M (2019). *Sığır Mastitislerinden İzole Edilen Staphylococcus Aureus Suşlarında Metisilin, Vankomisin Direnci Ve Panton-Valentine Lökosidin Varlığının Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar.
- Yılmaz, N. (2008). *Modifiye atmosferde paketlenme ve ısınlamanın pişirmeye hazır köftelerin mikrobiyal kalitesi ve güvenliği üzerine etkileri*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Yurdakul, N. E., Erginkaya, Z. ve Ünal, E., 2013. Antibiotic Resistance of Enterococci, Coagulase Negative *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* Isolated from Chicken Meat. *Czech Journal of Food Sciences*, 31(1), 14-19.
- Yüce, A. (2001). Antimikrobik ilaçlara direnç kazanma mekanizmaları. *Klimik Dergisi*, 14, 41- 46.

- Yüksekdağ, Z. N. ve Baltacı, N. (2013). Staphylococcus Aureus Türlerinde Biyofilm ve Biyofilm Oluşumundan Sorumlu Genler, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 43(3): 77-83.
- Zaher, H.A., El Baz, S., Alothaim, A.S., Alsalamah, S.A., Alghonaim, M.I., Alawam, A.S. et all. (2023). Molecular Basis of Methicillin and Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus* from Cattle, Sheep Carcasses and Slaughterhouse Workers. *Antibiotics (Basel)*, 18;12.
- Zang, B. (2019). Comprehensive review on the anti-bacterial activity of 1,2,3-triazole hybrids. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 168: 357-372.
- Zehra, A., Gulzar, M., Singh, R., Kaur, S. and Gill, J.P.S. (2019). Prevalence, multidrug resistance and molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in retail meat from Punjab, India. *Journal Of Global Antimicrobial Resistance*, 16, 152-158
- Zetola, N., Francis, J.S., Nuermberger, E.L. and Bishai, W.R. (2005). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infectious Diseases*, 5: 275-86.
- Zhang, K., Sarling, J., Chow, B. L., Elsayed, S., Hussain, Z., Church, D. L. et all. (2004). New quadriplex PCR assay for detection of methicillin resistance and simultaneous discrimination of *S. aureus* from coagulase-negative staphylococci. *Journal Clinical Microbiology*, 42: 4947–4955.

ÖZGEÇMİŞ

Adı- Soyadı : Tuğba SARI

Bilimsel Faaliyetler (Yayınlar, Bildiriler, Katıldığı Projeler)

1-) Sarı, T., Kulaç, Ö., Başkan, C., İnat, G. ve Siriken, B. (2023, 17-18 Nisan). Determination Of Antibiotic Susceptibility Profile and *Int1* gene Of Coliform Bacteria Obtained From Ground Beef And Meatball Consumed In Amasya, 3. International Mediterranean Congress, Mersin.

