
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

GIDALARDAN İZOLE EDİLEN GRAM POZİTİF BAKTERİLERDE BİYOSİT VE ANTİBİYOTİK DİRENÇ PROFİLİNİN ARAŞTIRILMASI

Meryem Burcu KÜLAHCI

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OCAK 2020

Meryem Burcu KÜLAHCI tarafından hazırlanan "GIDALARDAN İZOLE EDİLEN GRAM POZİTİF BAKTERİLERDE BİYOSİT VE ANTİBİYOTİK DİRENÇ PROFİLİNİN ARAŞTIRILMASI" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Sumru ÇITAK
Genel Biyoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum. .....

Başkan: Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR
Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum. .....

Üye: Prof. Dr. Neslihan GÜNDOĞAN
Genel Biyoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum. .....

Üye: Prof. Dr. Demet ÇETİN
Fen Bilgisi Eğitimi Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum. .....

Üye: Prof. Dr. Işıl SEYİS BİLKAY
Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum. .....

Tez Savunma Tarihi: 15/01/2020

Jüri tarafından kabul edilen bu çalışmanın Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....
Prof. Dr. Sena YAŞYERLİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- 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 çalışmasında 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.

Meryem Burcu KÜLAHCI
15/01/2020

GIDALARDAN İZOLE EDİLEN GRAM POZİTİF BAKTERİLERDE BİYOSİT VE ANTİBİYOTİK DİRENÇ PROFİLİNİN ARAŞTIRILMASI

(Doktora Tezi)

Meryem Burcu KÜLAHCI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2020

ÖZET

Günümüzde hayvan yetiştiriciliğinde gerek hastalıkların tedavisi ve önlenmesi, gerekse hayvansal gıdaların verimini arttırmak amacıyla antibiyotik ve biyositlerin kullanımının oldukça yaygın olması ekonomi ve halk sağlığı açısından ciddi sorunlar yaratmaktadır. Araştırmamızda, Ankara ilinde çeşitli marketlerde satışa sunulan 132 et ve süt ürünü örneğinden izole edilen 77 *Staphylococcus* izolatında, antibiyotik ve biyosit direnç dağılımları ve antibiyotik direnç ve efluks pompa genlerinin varlığı araştırılmıştır. Ayrıca efluks pompa inhibitörü rezerpinin antimikrobiyal direncine etkisi araştırılmıştır. *Staphylococcus* izolatlarında en yüksek oranda direnç tetrasiklin (%24,7)'e karşı belirlenmiştir. İzole edilen 77 *Staphylococcus* izolatının 29'u bir veya birden fazla antibiyotiğe dirençli olarak tespit edilmiştir. Bu izolatların BBL crystal Gram pozitif tanımlama kiti ve 16S rDNA dizi analizi yöntemleriyle tür bazında tanımlamaları yapılmıştır. Test edilen biyositlerin hepsine yüksek MİK değerleri gösteren izolatlar mevcuttur. Rezerpinin *Staphylococcus*'larda ampisilin duyarlılığını %25, tetrasiklin duyarlılığını %27,8, triklosan duyarlılığını %20,7, povidon iyodin duyarlılığını %34,5 arttırdığı belirlenmiştir. Çalışılan 29 *Staphylococcus* izolatında tetK (%88,9), bla (%53,8) antibiyotik direnç genleri yüksek oranda tespit edilmiştir. Ayrıca efluks pompa genlerinden acrB (%31), norE (%79,3), sugE (%44,8), smr (%86,2), efrA (%79,3), efrB (%72,4), mdeA (%82,8), sepA (%51,7) yüksek oranda tespit edilen genlerdir. Araştırmamızda tüketime sunulan hayvansal gıdalardan izole ettiğimiz *Staphylococcus*'ların antimikrobiyal direnç genleri bulundurmaları, bu direnç genlerinin kromozomal ve kromozom dışı genetik materyallerle patojenlere ve normal flora bakterilerine aktarmaları riski sebebiyle, halk sağlığı açısından önemli bir tehdit oluşturmaktadır. Efluks pompası kaynaklı antimikrobiyal direncinin, efluks pompası inhibitörü rezerpin kullanımı ile belli bir oranda azaltılabileceği fakat bu alanda daha kapsamlı çalışmaların yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Bilim Kodu : 20325
Anahtar Kelimeler : *Staphylococcus*, Antimikrobiyal direnci, Efluks pompası, Rezerpin
Sayfa Adedi : 95
Danışman : Prof. Dr. Sumru ÇITAK

INVESTIGATION OF BIOCIDE AND ANTIBIOTIC RESISTANCE PROFILES IN GRAM POSITIVE BACTERIA ISOLATED FROM FOOD

(Ph. D. Thesis)

Meryem Burcu KÜLAHCI

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

January 2020

ABSTRACT

The widespread use of antibiotics and biocides in animal husbandry, both for the treatment and prevention of diseases and to increase the yield of animal foods, creates serious problems in terms of economy and public health. In this study, antibiotic and biocide resistance profile and antibiotic resistance and efflux pump genes were investigated in 77 *Staphylococcus* isolated from 132 meat and dairy products sold in various markets in Ankara. In this study, the effect of efflux pump inhibitor reserpine on antimicrobial resistance was investigated. The highest resistance was determined against tetracycline (24.7%) in *Staphylococcus* isolates. Of the 77 *Staphylococcus* isolated, 29 were found to be resistant to one or more antibiotics. These isolates were identified on the basis of species by BBL crystal Gram positive identification kit and 16S rDNA sequence analysis methods. Isolates showing high MICs to all of the biocides tested were available. Reserpine increased ampicillin sensitivity 25%, tetracycline sensitivity 27.8%, triclosan sensitivity 20.7%, povidone iodine sensitivity 34.5% in *Staphylococcus* isolates. The antibiotic resistance genes tetK (88,9%), bla (53,8%) were found to be high in 29 *Staphylococcus* isolates. Furthermore, among the efflux pump genes acrB (31%), norE (79.3%), sugE (44.8%), smr (86.2%), efrA (79.3%), efrB (72.4%), mdeA (82.8%), sepA (51.7%) are highly detected. The presence of antimicrobial resistance genes of *Staphylococcus* isolated from foods of animal origin presented in our study is an important threat to public health due to the risk that these resistance genes are transferred to pathogens and normal flora bacteria by chromosomal and extrachromosomal genetic materials. It is thought that animicrobial resistance from efflux pump can be reduced to a certain extent with the use of efflux pump inhibitor reserpine, but further studies are needed in this area.

Science Code : 20325
Key Words : *Staphylococcus*, Antimicrobial resistance, Efflux pump, Reserpine
Page Number : 95
Supervisor : Prof. Dr. Sumru ÇITAK

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, her türlü bilgi ve desteğini benden esirgemeyen saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Sumru ÇITAK'a, yine çalışmalarım boyunca yardımlarını ve desteklerini yanımda hissettiğim tez izleme komite üyelerim Prof. Dr. Neslihan GÜNDOĞAN ve Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR'e, tez jürimde yer alarak tezimi değerlendirme sürecinde önemli katkılar sağlayan Prof. Dr. Demet ÇETİN ve Prof. Dr. Işıl SEYİS BİLKAY'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Lisans eğitimimden itibaren tüm akademik çalışmalarımda ve iş yaşamımda her daim yanımda ve arkamda bana destek olan sevgili arkadaşım Arş. Gör. Dr. Betül AYDIN ve aynı şekilde çocukluğumdan beri akademik ve sosyal hayatımda sürekli yanımda olan can dostum Arş. Gör. Dr. Melike KAVUK KALENDER'e,

Bütün çalışma süreçlerimde yanımda olup yardımlarını ve dostluklarını benimle paylaşan başta Zehra ŞAHİN, Tuba AKTUĞRAN ve Serdar COŞKUN olmak üzere tüm laboratuvar arkadaşlarıma,

Maddi, manevi sevgi ve destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, sevgili anne babam, Müfide-Necdet KAVUKOĞLU'na, kayınvalidem Nermin KÜLAHCI'ya,

Deney sürecimde tecrübelerinden yararlandığım sevgili arkadaşlarım Aytuna ÇERÇİ ve Aslı KELEŞ'e

Hayatımın ve araştırmamın her aşamasındaki heyecanımı ve mutluluğumu benimle paylaşan; yaşadığım her soruna benimle birlikte çözüm arayan, yardımcı olan, bana inanan, güvenen, canım eşim Orçun KÜLAHCI'ya katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Araştırmamız, 05/2015-03 kodlu proje ile Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü ve TAGEM 16/AR-GE/28 kodlu proje ile de T.C Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü tarafından desteklenmiştir. Maddi ve manevi katkıları sebebiyle Gazi Üniversitesi ve T.C Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv

ABSTRACT v

TEŞEKKÜR vi

İÇİNDEKİLER vii

ÇİZELGELERİN LİSTESİ ix

RESİMLERİN LİSTESİ xi

SİMGELER VE KISALTMALAR xiv

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 5

2.1. *Staphylococcus* Cinsi Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması 5

2.2. *Staphylococcus*'ların Gıdalardaki Önemi 6

2.3. Antibiyotik Direnci ve Direnç Mekanizmaları 7

2.3.1. Hedef değişikliği veya fazla üretimi 8

2.3.2. Geçirmezlik (İmpermeabilite) 9

2.3.3. Enzimatik inaktivasyon veya parçalama 9

2.3.4. Efluks 10

2.3.5. Alternatif metabolik yolların kazanılması 11

2.3.6. Biyofilm oluşturma 11

2.4. Biyositler (Antiseptik ve Dezenfektanlar) Hakkında Genel Bilgi 11

2.5. Biyosit Direnci 14

2.5.1. Hedef değişikliği 15

2.5.2. Geçirmezlik (İmpermeabilite) 16

2.5.3. Efluks 16

2.6. Gram Pozitif Bakterilerde Bulunan Efluks Pompa Genleri 17

Sayfa

2.7. Biyosit – Antibiyotik Direnci Arasındaki İlişki 20

2.8. Efluks Pompa İnhibitörleri 21

3. MATERYAL ve YÖNTEM 25

3.1. Gıda Örneklerinin Toplanması, İzolasyon ve Ön Tanımlamalarının Yapılması 25

3.2. İzolatların Antibiyotik Dirençliliklerinin Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemiyle Belirlenmesi 26

3.3. Bakteri İzolatlarının Antibiyotik Dirençliliklerinin Mikrodilusyon (MİK) Yöntemiyle Belirlenmesi 27

3.4. Bakteri İzolatlarının Biyositler İçin Minimal İnhibitör Konsantrasyon Değerlerinin (MİK) Belirlenmesi 28

3.6. Rezerpinin Antibiyotik Direnci ve Biyosit MİK Değeri Üzerine Etkisinin Belirlenmesi 31

3.7. Antibiyotik Direnci Gösteren Bakterilerin Tanımlanması 33

3.8. Real Time PZR ile Antibiyotik Direnç ve Efluks Pompa Genlerinin Belirlenmesi 35

3.9. Hedeflenen Gen Bölgelerinin Primerlerinin Tasarlanması 35

3.10. Real Time PZR Reaksiyonu ve Protokolü 38

3.10.1. PZR karışımı hazırlama 38

4. ARAŞTIRMA BULGULARI 41

5. TARTIŞMA 67

6. SONUÇ 81

KAYNAKLAR 85

ÖZGEÇMİŞ 95

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 3.1. Araştırmamızda kullanılan antibiyotik diskleri ve duyarlılık sınırları 27

Çizelge 3.2. Çalışmamızda kullanılmak üzere tasarlanan primerler..... 37

Çizelge 3.3. Literatürden alınan primer dizileri..... 37

Çizelge 3.4. Real Time PZR cihazının çalışma protokolü..... 39

Çizelge 4.1. Gıda örneklerinden izole edilen *Staphylococcus*'ların, izole edildikleri materyallere göre dağılımları..... 41

Çizelge 4.2. *Staphylococcus* izolatlarının disk difüzyon ve MİK yöntemleriyle elde edilen antibiyotik direnç sayı ve yüzdeleri 41

Çizelge 4.3. İzolatların disk difüzyon ve mik yöntemi ile çoklu direnç oranları..... 42

Çizelge 4.4. *Staphylococcus* izolatlarının disk difüzyon ve MİK yöntemlerine göre antibiyotik dirençleri..... 43

Çizelge 4.5. BBL Crystal Identification System Gram-Positive ID Kit ile adlandırılan antibiyotik dirençli *Staphylococcus* izolatlarının tür dağılımı..... 44

Çizelge 4.6. *Staphylococcus* izolatlarının adlandırılması ve biyosit MİK değerleri..... 45

Çizelge 4.7. Biyositlerin *Staphylococcus* izolatları üzerinde gösterdikleri minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değer aralıkları..... 45

Çizelge 4.8. MİK yöntemine göre antibiyotik dirençli bulunan *Staphylococcus* izolatlarının rezerpin eklenerek tekrarlanan deney sonucundaki MİK değerleri 46

Çizelge 4.9. Rezerpin eklenerek tekrarlanan deney sonucunda antibiyotik MİK değeri 4 kat ve daha fazla azalan izolat sayıları 47

Çizelge 4.10. *Staphylococcus* izolatlarının rezerpin eklenerek tekrarlanan biyosit MİK değerleri..... 48

Çizelge 4.11. Rezerpin eklenerek tekrarlanan deney sonucunda biyosit MİK değeri 4 kat ve daha fazla azalan izolat sayıları..... 49

Çizelge 4.12. *Staphylococcus* izolatlarının BBL Crystal bakteri tanımlama kiti ve 16S rDNA dizi analizi ile tanımlama sonuçları 50

Çizelge 4.13. *Staphylococcus* izolatlarının 16S rDNA dizi analizi ile tanımlama sonuçları..... 51

Çizelge 4.14. bla (beta laktamaz) geni qPCR sonucu, örnek bir plak sonucu 53

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 4.15. Antibiyotik dirençli *Staphylococcus*'ların real time pzr ile belirlenen tetrasiklin ve beta laktam grubu antibiyotiklere direnç genleri ve yüzdeleri 64

Çizelge 4.16. Antibiyotik dirençli *Staphylococcus*'ların real time pzr ile belirlenen efluks pompa genleri ve yüzdeleri 65

Çizelge 4.17. *Staphylococcus* izolatlarının antibiyotik direnç ve efluks pompa gen profilleri 66

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim **Sayfa**

Resim 2.1. *Staphylococcus*'ların mikroskop görüntüsü 5

Resim 2.2. Bakteri hücrelerinde antibiyotik direnç mekanizmaları 8

Resim 2.3. Gıda zincirinde kullanılan temel antimikrobiyal maddeler. 12

Resim 2.4. A. Bakterilerde bulunan 7 farklı efluks pompa gen ailesinin filogenetik illüstrasyonu. B. Efluks pompası gen ailelerinin yapısal organizasyonları ve enerji kullanım mekanizmalarını gösteren şematik illüstrasyon, TMH, transmembran heliks sayısını ifade 18

Resim 2.5. Gram pozitif bakterilerde bulunan antimikrobiyal dirençle ilişkili, farklı pompa ailelerini temsil eden efluks pompaları, FQ, florokinolonları, CM, kloramfenikolü, TC, tetrasiklinleri, ML, makrolidleri, ÇD, çoklu direnci temsil etmektedir. norA, florokinolonlarla beraber birçok biyosit ve ilacı dışarı pompalayan bir proteindir. 18

Resim 3.1. Mannitol Salt Agar üzerinde *Staphylococcus*'ların görünüşü 26

Resim 3.2. Antibiyotik Dirençlilik Testi..... 27

Resim 3.3. Biyosit MİK belirleme testi 29

Resim 3.4. Biyosit MİK belirleme testi. 29

Resim 3.5. BBL Crystal GP ID Panel kapaklarının kapatılması 30

Resim 3.6. BBL Crystal Panel Viewer Cihazı 31

Resim 3.7. MİK yöntemi ile antibiyotik dirençlilik testinin reserpin eklenerek tekrarlanması 32

Resim 3.8. MİK yöntemi ile biyosit dirençlilik testinin reserpin eklenerek tekrarlanması 32

Resim 3.9. *Staphylococcus* izolatlarının 16s rDNA bölgelerin PZR ile çoğaltıldıktan sonra jel görüntüsü (1:DNA ladder, marker,2: Negatif kontrol, 3: Çoğalma olmamış örnek, 4-12:Pozitif örnekler) 35

Resim 3.10. Real Time PZR çalışma plağı 39

Resim 4.1. bla (beta laktamaz) geni Tm analiz tablosu 52

Resim 4.2. bla (beta laktamaz) geni amplifikasyon eğrileri 52

Resim 4.3. tetK (tetrasiklin direnç) geni Tm analiz tablosu 53

Resim 4.4. tetK (tetrasiklin direnç) geni amplifikasyon eğrileri 54

Resim **Sayfa**

Resim 4.5. tetL (tetrasiklin direnç) geni Tm analiz tablosu..... 54
Resim 4.6. tetL (tetrasiklin direnç) geni amplifikasyon eğrileri..... 54
Resim 4.7. mecA (metisilin direnç) geni Tm analiz tablosu..... 55
Resim 4.8. mecA (metisilin direnç) geni amplifikasyon eğrileri..... 55
Resim 4.9. qacA/B (efluks pompa) geni Tm analiz tablosu 55
Resim 4.10. qacA/B (efluks pompa) geni amplifikasyon eğrileri 56
Resim 4.11. acrB (efluks pompa) geni Tm analiz tablosu..... 56
Resim 4.12. acrB (efluks pompa) geni amplifikasyon eğrileri 56
Resim 4.13. norE (efluks pompa) geni Tm analiz tablosu..... 57
Resim 4.14. norE (efluks pompa) geni amplifikasyon eğrileri..... 57
Resim 4.15. sugE (efluks pompa) geni Tm analiz tablosu 57
Resim 4.16. sugE (efluks pompa) geni amplifikasyon eğrileri..... 58
Resim 4.17. smr (efluks pompa) geni Tm analiz tablosu 58
Resim 4.18. smr (efluks pompa) geni amplifikasyon eğrileri..... 58
Resim 4.19. efrA (efluks pompa) geni Tm analiz tablosu 59
Resim 4.20. efrA (efluks pompa) geni amplifikasyon eğrileri 59
Resim 4.21. efrB (efluks pompa) geni Tm analiz tablosu 59
Resim 4.22. efrB (efluks pompa) geni amplifikasyon eğrileri..... 60
Resim 4.23. mdeA (efluks pompa) geni Tm analiz tablosu..... 60
Resim 4.24. mdeA (efluks pompa) geni amplifikasyon eğrileri..... 60
Resim 4.25. mepA (efluks pompa) geni Tm analiz tablosu..... 61
Resim 4.26. mepA (efluks pompa) geni amplifikasyon eğrileri..... 61
Resim 4.27. norA (efluks pompa) geni Tm analiz tablosu 61
Resim 4.28. norA (efluks pompa) geni amplifikasyon eğrileri 62
Resim 4.29. norA (efluks pompa) geni Tm analiz tablosu 62
Resim 4.30. norB (efluks pompa) geni amplifikasyon eğrileri..... 62

Resim **Sayfa**

Resim 4.31. sepA (efluks pompa) geni Tm analiz tablosu 63

Resim 4.32. sepA (efluks pompa) geni amplifikasyon eğrileri 63

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	**Açıklamalar**
+	Artı
≥	Büyük eşit
β	Beta
°C	Santigrat derece
Ca^+	Kalsiyum
-	Eksi
H^+	Hidrojen
K^+	Potasyum
≤	Küçük eşit
Na^+	Sodyum
%	Yüzde

Kısaltmalar	**Açıklamalar**
ABC	(ATP)-binding cassette
AbgT	p-aminobenzoyl-glutamate transporter
AFLP	Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizm
AM	Ampisilin
Ark.	Arkadaşları
ATCC	Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu
ATP	Adenin Trifosfat
BC	Benzalkonyum klorür
BHI	Brain-Heart Infusion Broth
b-laktamaz	Beta laktamaz
bp	Baz çifti
BPW	Buffered Peptone Water

Kısaltmalar	Açıklamalar
CCCP	Karbonil siyanid m-klorofenil hidrazon
CFQ	Sefkuinom
cfu	Colony forming units
CH	Klorhekzidin
CLSI	Clinical and Laboratory Standarts Instute
CN	Gentamisin
dk	Dakika
DMSO	Dimetil slfoksit
DNA	Deoksiribonükleikasit
DNaz	Deoksiribonükleikasit enzimi
E	Eritromisin
ENO	Enrofloksasin
F	Forward
g/gr	Gram
H	Hassas
HC	Hekzaklorofen
INF271	N-(2-Methoxyphenyl)-N-(2-naphthyl)urea
INF55	5-Nıtro-2-phenylindole
KAB	Kuaterner Amonyum Bileşikleri
KNS	Koagulaz Negatif *Staphylococcus*
L	Litre
MATE	Multidrug and toxic compound extrusion
MFS	Major facilitator superfamily
MHA	Mueller Hinton Agar
MİK	Minimal İnhibitör Konsantrasyon
ml	Milimetre
mM	Mikrometre
mm	Milimetre
mol	Molekül
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrogram

Kısaltmalar	Açıklamalar
MRSA	Metisiline Dirençli *Staphylocuccus aureus*
MSA	Mannitol Salt Phenol-Red Agar
MSSA	Metisiline Duyarlı *Staphylocuccus aureus*
n	İzolat sayısı
NaCl	Sodyum Klorür
ng	Nanogram
NMP	1-naftilmetil) piperazin
PABA	Para-aminobenzoat
PACE	Proteobacterial antimicrobial compound efflux
PAβN	Fenil arjinin betanaftilamid
PBP	Penisilin bağlayan protein
PBS	Fosfatlı tuz tamponu
pH	Power of hidrojen
PI	Povidon iyodin
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
qPCR	Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
R	Reverse
r	Rezerpinli
rDNA	Ribozomal Deoksiribonükleikasit
RND	Resistancenodulation- division
rRNA	Ribozomal ribonkleikasit
RT-PCR	Real time pzr
SC	Sodyum hipoklorit
SCENIHR	Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks
SMR	Small multidrug resistance
sn	Saniye
T	Triklosan
TE	Tetrasiklin
Tm	Erime noktası
TMH	Transmembran heliks
TSB	Triptic Soy Broth

Kısaltmalar	Açıklamalar
UV	Ultraviyole
V	Volt
WHO	Dünya Sağlık örgütü

1. GİRİŞ

Antimikrobiyal direnç, bir bakterinin antimikrobiyal bir ajanın öldürücü veya üremeyi durdurucu etkisine karşı koyabilme yeteneğidir. Antimikrobiyal direnç gelişimi ve yayılımı genellikle gereksiz ve uygunsuz antibiyotik kullanımına bağlanmakla birlikte, 1940'lı yıllarda antibiyotiklerin kullanılmadığı bazı adalarda toprak ve dışkı örneklerinde tetrasiklin ve streptomisin antibiyotiklerine dirençli bakteriler bulunduğu; antibiyotik direncinin yalnızca yaygın antibiyotik kullanımı sonucu değil, bakterilerin olumsuz çevre koşullarında yaşamını sürdürmek için kullandığı savunma sürecinin bir parçası olduğu da belirtilmektedir. Ancak antibiyotiklerin yoğun şekilde kullanıma girmesi ile birlikte yıllar içinde çoğul dirençli mikroorganizmalar ortaya çıkmakta ve bunlarla oluşan infeksiyonların sağaltımında büyük sorunlar yaşamaya başlamıştır. Günümüzde tüm dünyada bir yandan hızla yeni ilaçlar geliştirmekte iken, öte yandan bunlara süratle direnç kazanan mikroorganizmalarla oluşan infeksiyonlar bildirilmekte ve sorunun boyutu gün geçtikçe büyümektedir (Yüce, 2001).

Antibiyotiklerin hayvan enfeksiyonlarında tedavi ve koruyucu amaçlı uygunsuz kullanımı, hayvan beslenmesinde verim artırıcı olarak yer alması , gıda zincirinde kalıntı ve insan hekimliğinde de ilgili antibiyotiklerin kullanılması nedeniyle patojenik bakterilerde antimikrobiyal direncin gelişmesi büyük bir endişe yaratmaktadır (Lange ve Brokking, 2005; Yılmaz ve ark., 2016). Bu direnç genlerini taşıyan patojen veya normal flora bakterilerin gıdalar yoluyla insan florasına kolonize olmasının hem hayvan hem de insan sağlığı için giderek artan bir tehdit oluşturduğu yapılan araştırmalarda ortaya konmuştur (Doyle, 2006; Garcia Ovando ve ark., 2004). Hayvanlarda mastitis tedavisi sonucu metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*'ların (MRSA) ve tavuk yemlerine katılan büyümeyi uyarıcı avoparsin kullanılması ile oluşan vankomisin dirençli *Enterococcus faecalis*'lerin gelişimi örneklerinde olduğu gibi uygunsuz antibiyotik kullanımı sonucu birçok bakteride antibiyotiklere karşı oluşan direncin giderek artması ve bu direnç genlerinin bakteriler arası aktarılması, insan ve hayvan tedavisini olumsuz yönde etkilemektedir (Suller ve Russel, 1999; Borgen ve ark., 2000; Doyle, 2006; Yılmaz ve ark., 2016).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda *Staphylococcus* gıdalardan kontaminant bakteri olarak izole edilmektedir (Braga ve ark., 2013; Yurdakul ve ark., 2013; Özçelik ve Çıtak., 2009). Bu bakterilerden *S. aureus*'lar hayvanlarda mastitis, insanlarda da gıda zehirlenmesi başta olmak üzere çeşitli hastalıkların nedeni olmaktadırlar (Yurdakul ve ark., 2013). Koagülaz negatif stafilokoklar da uzun süredir kommensal ve kontaminant bakteriler olarak değerlendirilmelerine karşın insanlarda patojenik etkilerinin olduğu bilinmektedir (Rodrigues ve ark., 2017).

Gıdalara mikrorganizmaların bulaşması ve bunun sonucunda oluşan gıda kaynaklı enfeksiyonların önlenmesinde temizlik ve dezenfeksiyonun önemi büyüktür (Fuentes ve ark., 2012). Günümüzde gıda sektöründe hijyeni sağlamada biyositler oldukça sık kullanılmaktadır (Marquez ve ark., 2017). Giderek artan kullanımları, diğer antimikrobik maddelerde olduğu gibi, bunlara karşıda bir direncin gelişip gelişmediği sorusunu gündeme getirmiştir (Fuentes ve ark., 2012). Biyositlerde bakteriyel direnç 1950 ve 1960'lı yıllarda saptanmıştır, çünkü gıda endüstrisinde bakteri sanitasyonu için biyositlerin kullanımı o dönemde başlamıştır (Lerma ve ark., 2013). Konu ile ilgili çalışmalar antibiyotik direnci kadar olmasa bile, son yıllarda üzerine önem verilen konulardan biri haline gelmiştir (Öztürk, 2002). Biyositler, gıda zinciri yoluyla insan gıda kaynaklı patojenlerinin, çiğ gıda ürünlerinden veya bunların üretimi sırasında kontaminasyon yoluyla bulaş riskini azaltmak, gıdada bozulmaya sebep olan bakterilerin inaktive edilmesi ve gıda üretim tesislerini ve ekipmanları mikroorganizmalardan arındırmak gibi birçok amaçla kullanılmaktadır (Fuentes ve ark., 2012).

Gıda sektöründe kullanılan biyositler, klor içeren dezenfektanlar, katyonik kuaterner amonyum bileşikleri, alkol bazlı dezenfektanlar, biguanidler, iyotlu bileşikler, hekzaklorofen ve triklosanlardır (Metin ve Öztürk, 1995; Fuentes ve ark., 2012). Ancak bu sektörde biyositlerin yaygın ve bilinçsiz kullanılmasının, antibiyotiklerde olduğu gibi mikroorganizmaların direnç genleri kazanmasına veya başlangıçta duyarlı olan mikroorganizmaların adaptasyonuna yol açtığı belirtilmektedir. Gıda orijinli dirençli bakterilere, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus, E. coli, Enterococcus, Campylobacter, Yersinia* örnek verilebilir (Meyer ve ark., 2008, Miles ve ark., 2006). Ayrıca giderek büyüyen bir tehlike de antibiyotik ve biyositler arasında çapraz direnç oluşumudur (Şencan, 2003; Langsrud ve ark., 2003; Meyer ve ark., 2008, Lerma, 2013).

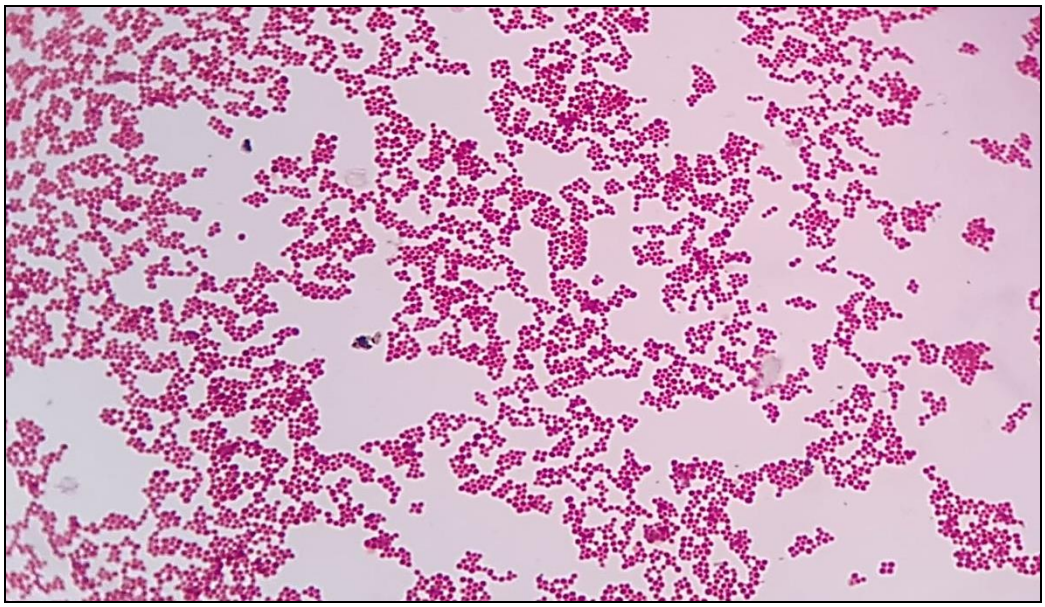
Bakterilerde kazanılmış antimikrobiyal direncine neden olduğu bilinen mekanizmalardan biri de dışa atım pompalarının aşırı ifade edilmesidir. Dışa atım pompalarının neden olduğu direncin önüne geçilebilmesi ve duyarlılığının artması için efluks pompa inhibitörleri dirençle mücadelede ilgi çekici araştırma alanlarından birisidir. Efluks pompa inhibitörü olarak adlandırılan, çeşitli bileşikleri dışa atımı inhibe etme yeteneğine sahip olan bileşikler; peptidomimetikler, proton iyonoforları, alkoloidler, piperazin türevleri, Ca^{+} antagonistleri, fenotiyazinler, selektif seratonin geri alım inhibitörleri, proton pompa inhibitörleri, makrolid türevleri ve piperidin-karboksilik asit türevleri olarak sınıflandırılmaktadır. Alkoloid sınıfı içerisinde yer alan rezerpin, P-glikoproteini inhibe ettiği bilinen ve antihipertansif olan bir bitkisel efluks pompa inhibitörüdür (Sun ve ark, 2014; Aygül, 2015). Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde çığır açan antibiyotiklerin, kısa veya uzun vadede direnç gelişimine yenik düşmesi kaçınılmaz görünmektedir. Buna rağmen efluks pompa inhibitörlerinin kullanımıyla bu durumun belirli ölçüde geciktirilebileceğini gösteren çalışmalar yapılmaktadır (Seasotiya ve Dalal, 2014; Fuentes ve ark., 2014).

Araştırmamızda, Ankara ilinde çeşitli marketlerde satışa sunulan et ve süt ürünlerinden *Staphylococcus*'ların izolasyonu, tür tanımı yapılarak, izolatlardaki antimikrobiyal direnç fenotipik ve genotipik olarak belirlenmiştir. Ayrıca antibiyotik ve antiseptiklere direnç gösteren *Staphylococcus* izolatlarına efluks pompası inhibitörü olan rezerpinin etkisi, efluks pompası proteinlerini kodlayan gen bölgelerinin varlığı ile direncin kaynağı antibiyotik ve biyosidal direnç arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Araştırmamızın sonuçları ile antibiyotik-biyosit direnci arasındaki ilişki, bu direnci taşıyan genlerin belirlenmesi ve özellikle bu genleri taşıyan bakterilerle kontamine gıda ürünlerinin tüketilmesinin engellenmesi ile halk sağlığı ve ekonomik açıdan önemli kazanımlar sağlanacaktır. Bu sayede gıda zincirinde antimikrobiyal direncin izlenmesi, bu dirençle hayvancılıkta ve gıda sektöründe kullanılan biyosidal maddelerin kullanımının denetlenmesi için altyapının oluşturulması, personel, yetiştiriciler ve sahada çalışan veteriner hekimler başta olmak üzere kamuoyunun bilinçli antimikrobiyal kullanımı konusunda bilgilendirilmesi gerektiği tespit edilmiştir. Antimikrobiyal maddelerin daha az ve uygun kullanımları, enfeksiyon kontrolünün daha iyi yapılması, yeni ajanların geliştirilmesi, direncin gelişiminin yavaşlatılmasının gerekliliği, gıda alanındaki çalışmaların önemini daha da arttırmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Staphylococcus* Cinsi Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması

Staphylococcus'lar gram pozitif, spor oluşturmayan, 0.5-1.5 µm çapında, hareketsiz, çeşitli pigmentasyon gösteren ve genelde üzüm salkımı şeklinde kümeler oluşturan koklardır (Resim 2.1). Stafilokoklar, esteraz, lipaz, hiyaluronidaz, jelatinaz, koagülaz, proteaz, kazeinaz, fosfolipaz, deoksiribonükleaz (DNaz), β-glukosidaz ve üreaz gibi çeşitli enzimler üretmektedirler (Güçlü, 2019).



Resim 2.1. *Staphylococcus*'ların mikroskop görüntüsü (Fotoğraf, G.Ü.Fen Fak. Mikrobiyoloji Laboratuvarında Meryem Burcu Külahcı tarafından çekilmiştir.)

Günümüzde tanımlanmış 53 *Staphylococcus* türü ve 28 alt türü bulunmaktadır. 1884 yılında Rosenbach *Staphylococcus* cinsini tanımlamıştır (Rosenbach, 1884). Etten, süt ve süt ürünlerinden, idrar yollarından, derilerden ve solunum yolundan izole edilen Stafilokoklar, düşük su içeren ortamlarda yaşayabilirler ve kurumaya karşı dirençlidirler. Tuz içeren besiyerinden (% 7.5 NaCl) daha kolay izole edilmektedirler.

Staphylococcus aureus, çeşitli toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonların önemli bir nedenidir. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarına, cerrahi alan enfeksiyonlarına ve kemik ve eklem enfeksiyonlarına neden olur. Hastane kaynaklı bakteriyeminin yaygın bir

nedenidir ve hastane kaynaklı solunum yolu enfeksiyonları ile ilişkilidir. Ayrıca, stafilokok ilişkili mastitis enfeksiyonu olan sığırlar kaynaklı pastörize edilmemiş süt ve süt ürünleriyle bulaşan önemli bir gıda patojenidir. Koagülaz-negatif stafilokoklar, insan derisi mikroflorasının ortak bileşenleridir ve peynir ve sosis gibi fermente gıdaların üretilmesinde lezzet ve aroma oluşumunda önemli bir rol oynarlar. Son yıllarda, koagülaz negatif stafilokokların neden olduğu hastane enfeksiyonları vakalarında bir artış olmuştur (Abulreesh, 2011).

Bazı türleri novobiyosine dirençlidir. Genel olarak furazolidon ve nitrofurana duyarlıdır ve düşük seviyelerde eritromisin ve bacitracin'e dirençlidirler. Genellikle fenoller ve bunların türevleri, salisilanilitler, karbanilitler ve halojenler (klor ve iyot) ve bunların türevleri gibi antibakteriyellere karşı hassastırlar (De Vos ve Garrity, 2009).

2.2. *Staphylococcus*'ların Gıdalardaki Önemi

Staphylococcus spp. insan ve hayvanların normal mikrobiyotalarında bulunan genelde zararsız olan fırsatçı patojenlerdir (Worthing ve ark., 2018). *Staphylococcus* cinsi koagülaz-pozitif *Staphylococcus* (KPS) ve koagülaz negatif *Staphylococcus* (KNS) olmak üzere iki genel gruba ayrılmıştır. Ana habitatları insan ve hayvanların deri, deri bezleri ve mukoz membranlarıdır, birçok türü de gıdalar ve insan sağlığı için önem arz etmektedir (Resch ve ark., 2008). Hayvanlarda mastitits, kene ateşi, periorbital ekzama, osteomiyelit, artrit gibi, insanlarda ise toksik şok sendromu,solunum sistemi enfeksiyonları, endokardit, gıda zehirlenmeleri, septik artrit, osteomiyelit, menenjit, sepsis ve bakteriyemi gibi yaşamı tehdit eden hastalıklara yol açmaktadırlar (Tel ve ark., 2012).

S. aureus, dünyada en sık görülen gıda kaynaklı hastalık olan gıda zehirlenmelerine sebep olan en önemli stafilokok türüdür. Bu bakterinin virülens faktörlerinden biri olan ısıya dayanıklı enterotoksin, hayvan veya insanlardan, et ve süt ürünleri gibi hayvansal gıdalara, üretim, işleme veya saklama aşamalarında bulaşan bakterinin aşırı çoğalması sonucu üretilmekte ve ciddi gıda intoksikasyonlarına sebebiyet vermektedir (Özdemir ve Keyvan, 2016). KNS türlerinden *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* ve *S. haemolyticus* en iyi bilinen insan patojenleridir ve çeşitli deri ve idrar yolu enfeksiyonlara kaynak oluşturmaktadırlar. Bunun dışında kalan birçok KNS türü gıdaların normal kontaminatları olarak güvenli kabul

edilmektedir. Hatta peynir ve fermente gıda ürünlerine renk ve aroma vermesi açısından başlangıç kültürlerinde eklenmektedirler (Coton ve ark., 2010).

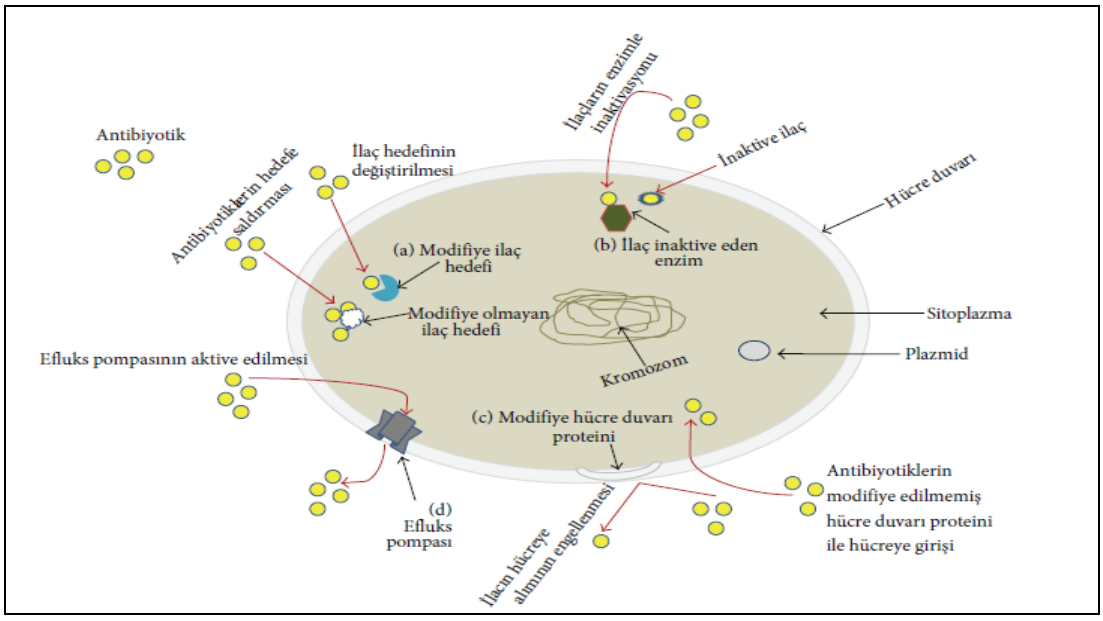
Antimikrobiyal ajanların hayvancılıkta tedavi, korunma ve büyüme faktörü olarak aşırı kullanılmasının, antibiyotik dirençli bakterileri taşıyan ve yayılımına neden olan hayvan kaynakları oluşturacağı belirtilmektedir. Stafilokoklar patojenitelerinin yanında hızla antibiyotik direnci kazanmaları ile de insan ve hayvan sağlığı için tehlike oluşturmaktadırlar. Antibiyotik direncinin, plazmid ve transpozonlar gibi hareketli genetik materyallerle farklı cins ve türler arasında aktarıldığı ve gıdaların dirençli bakteriler açısından ciddi bir rezervuar oluşturduğu bilinmektedir (Chajecka-Wierzchowska ve ark., 2015). Son yıllarda stafilokokların da içinde bulunduğu birçok gıda kaynaklı bakterinin antibiyotik direncinin gıdalarda yayılımına sebep olduğu rapor edilmiştir (Simeoni ve ark., 2008, Piessens ve ark., 2012).

2.3. Antibiyotik Direnci ve Direnç Mekanizmaları

Antibiyotik direnci; bir bakteri türünün bazı suşlarının antibiyotikten etkilenmemesi ya da antibiyotiğe duyarlı bir suşun çeşitli direnç mekanizmalarından biri ile dirençli hale dönmesi olarak tanımlanmaktadır. Günümüzde çeşitli antibiyotiklerin toplumda tüketiminin artması, immun sistemi bozulmuş hastaların sayısında artma olması, yoğun bakım ünitelerinin sayısının artması, gıda endüstrisinde antibiyotik kullanımı gibi nedenlerle bakterilerdeki antibiyotik direnci giderek artmaktadır (Demirtürk ve Demirdal, 2004).

Bakteriler, antibiyotiklere doğal (intrinsik) olarak dirençli olabilmektedir. Bu direnç türü bakterilerin temel özelliğidir ve antimikrobiyal kullanımı ile ilişkili ve kalıtsal değildir. Doğal direnç, bu mikroorganizmaların tür özelliği olarak ilacın hedefi olan yapıyı tanımamalarının veya ilacın yapısal bir özellikten dolayı hedefine ulaşamamasının bir sonucudur. Örneğin ilacın dış membrandan geçememesi nedeni ile Gram negatif bakteriler vankomisine doğal olarak dirençlidir veya bakterilerin L formları ve *Mycoplasma*'lar gibi çepersiz mikroorganizmalar penisilin gibi hücre duvar sentezi inhibitörlerine doğal dirençlidir. Aynı şekilde metabolik olarak inaktif olan bakteri sporları doğal dirençlidir. Çünkü birçok ilacın etkili olabilmesi için bakterinin aktif üreme döneminde olması gereklidir (Yüce, 2001).

Diğer bir direnç yolu ise kazanılmış dirençtir. Bir bakteri genetik özelliklerindeki değişimlere bağlı olarak duyarlı olduğu bir antibakteriyel ajandan etkilenmeyebilir. Bu durumda o bakteri direnç kazanmış olur. Genetik kaynaklı direnç kromozomal veya kromozom dışı elemanlara bağlı olabilir. Kromozomal direnç, bakteri kromozomunda kendiliğinden (spontan) oluşan mutasyonlar sonucu ortaya çıkar. Spontan mutasyonlar bazı fiziksel ve kimyasal faktörlerle oluşabilir ve sonuçta bakteri hücresinde yapısal değişimler oluşur. Böylece hücrenin ilaca permealibitesi azalabilir veya hücre içinde ilacın hedefinde değişiklikler olabilir (Resim 2.2). Streptomisin, aminoglikozid, eritromisin, linkomisine karşı bu tür direnç görülebilir. Ekstrakromozomal direnç, çeşitli yollarla aktarılan plazmid, transpozon ve integron adı verilen genetik elemanlara bağlıdır (Yüce, 2001; Öztürk, 2002; Capita ve Alonso-Calleja, 2013).



Resim 2.2. Bakteri hücrelerinde antibiyotik direnç mekanizmaları (Kumar ve ark., 2013)

2.3.1. Hedef değişikliği veya fazla üretimi

Antimikrobiyal ajanların hücrede bağlandıkları reseptörlerde oluşan tüm değişiklikler, ajanın hücre içine girmesine engel olarak ve mikroorganizmanın ajana dirençli olmasına neden olabilmektedir. Örneğin ribozomal DNA veya diğer kilit elementlerin mutasyona uğraması antimikrobiyalin bağlanamaması ve sonuçta antimikrobiyal etkini kaybına yol açmaktadır. Bu mekanizmaya örnek olarak, belirli penisilin direnci tiplerinde gözlenen penisilin bağlayıcı proteinlerin (PBP'ler) yapısal değişikliği, aminoglikozitleri, makrolidleri

veya tetrasiklinleri etkisiz hale getirebilen ribozomal değişiklikler ve DNA-giraz modifikasyonları ile fluorokinolonlara direnç gelişmesi verilebilir. Öte yandan, glikopeptit antibiyotikler, uzayan peptidoglikan polimerinin pentapeptid zincirinin terminal D-alanil-D-alaninine bağlanarak etki ederler. *Staphylococcus* spp.'de bu bileşiklere duyarlılıkta azalma, hücre duvarı peptidoglikanın içindeki glikopeptid bağlanma bölgelerinin aşırı üretilmesinden kaynaklanabilmektedir (Capita ve Alonso-Calleja, 2013).

2.3.2. Geçirmezlik (İmpermeabilite)

Antibiyotik moleküllerinin, hücre membranından içeri girişinin sınırlandırılması ile bakterilerde antibiyotik direnci gelişebilmektedir. Antibiyotiklerin etki gösterebilmesi için öncelikle hedeflerine ulaşması gereklidir. Örneğin, beta-laktam ajanların penisilin bağlayan proteinlere bağlanabilmeleri için hücre membranının dış yüzeyine ulaşmaları gerekmektedir. Peptidoglikan tabaka, geniş porları bulunması sebebiyle antibiyotiklerin bakteri hücresine girmelerine engel oluşturmamaktadır. Ancak, Gram negatif bakterilerin dış zarı, antibiyotikler ve ortamdan alınacak diğer moleküller için yarı geçirgen bir engel oluşturmaktadır. Bu nedenle, dış zar yapısı tüm Gram negatif bakterilere Gram pozitiflerden farklı bir avantaj sağlamaktadır (Çiftçi ve Aksoy, 2015).

2.3.3. Enzimatik inaktivasyon veya parçalama

Enzimatik inaktivasyon, bakteriler, antimikrobik maddeleri değiştiren veya bozan bir veya daha fazla enzim ürettiğinde ve bunu bakterilere karşı inaktif hale getirdiğinde meydana gelir. Bu enzimler tipik olarak belirli bir antimikrobiyal veya antimikrobiyal sınıfına özgüdür. Bu, beta-laktam halkasını hidrolize eden beta-laktamazların bakteriyel üretimi yoluyla beta-laktam antibiyotiklerini etkileyen yaygın bir direnç mekanizmasıdır (Capita ve Alonso-Calleja, 2013). Birçok araştırmacı, biyositlerin enzimatik dönüşümünün bakterilerde, özellikle ağır metaller (gümüş ve bakır; katyonun metale enzimatik indirgenmesi), parabenler, aldehitler (formaldehit dehidrojenaz), peroksijenler (formaldehit dehidrojenaz) katalaz, süper oksit dismutaz ve alkil hidroperoksidazlar)a karşı bir direnç mekanizması olduğunu gözlemlemişlerdir (SCENIHR, 2009).

Antimikrobiyal direncine sebep olan enzimleri kodlayan genlerin bazıları bakteriyel kromozomlarda ortaya çıkmasına rağmen, genellikle transpozonlar veya plazmitler gibi

hareketli elemanlarda bulunur. Enzim aracılı inaktivasyon nedeniyle makrolid ve tetrasiklin (TetX ile) direnci örnekleri de bilinmektedir. Kloramfenikole direnç tipik olarak asetil transferazlar ile sağlanmaktadır (Poole, 2002).

2.3.4. Efluks

Efluks pompaları, hücreye nüfuz eden antimikrobiyalleri aktif olarak alan ve hücre içi konsantrasyonlarını etkili seviyelerin altına düşüren taşıma proteinleridir. Efluks birkaç antimikrobiyal için tarif edilmiştir. Efluks pompa proteinleri bir bileşiğe özel olabilir veya katkı maddeleri ve antibiyotikler gibi çeşitli bileşikler üzerinde çalışabilir (Capita ve Alonso-Calleja, 2013). Antibiyotik direncinin bir aracı olarak efluks, en yaygın olarak hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterilerdeki tetrasiklinlerle (örneğin TetA, TetB, TetK pompaları) ve florokinolonlarla ilişkilidir. Tet genleri genellikle plazmid veya transpozonlarda kodlanır ve bu nedenle direnç, bu genlerin harici kaynaklardan edinilmesinden kaynaklanır. Bu pompalar, kromozomal olarak kodlanmış bu efluks sistemlerinin mutasyonel hipereeksresyonu sonucu ortaya çıkan hem doğal hem de kazanılmış dirence katkıda bulunmaktadır. Bu efluks sistemlerinin çoğu, makrolidlere, b-laktamlara, aminoglikozitlere ve tetrasikline karşı direnç sağlar. Makrolidlere karşı efluks kaynaklı direnç, Gram-pozitif bakterilerde de tarif edilmiştir. Kloramfenikol direnci de efluks yoluyla sağlanabilmektedir (Poole, 2002).

S.aureus'ta çoklu direnç gelişimine neden olan bazı proteinler QacA, NorA ve daha spesifik olarak MsrA ve TetK proteinleridir. Bunların varlığı florokinolonların, makrolid ve tetrasiklin grubu antibiyotiklerin hücre dışına atılmasına neden olmaktadır (Zarakolu, 2003).

Gram pozitif bakterilerde antibiyotik direnci için önemli olan efluks pompası genleri, ertromisini hücre dışına pompalamayı sağlayan ermA, ermB, msrA/B, ereA,ereB, mefA, tetrasiklini pompalayan tetK, tetL, beta laktam grubu antibiyotikleri pompalayan bla ve mecA, vankomisini pompalayan vanA, vanB,vanC, gentamisinin atılmasını sağlayan aac (6_)- le-aph(2_)-la, aph(2'_)-lb, aph (2'_)-lc, aph(2'_)-ld gibi genlerdir (Fuentes ve ark., 2014).

2.3.5. Alternatif metabolik yolların kazanılması

Bazı antibiyotikler metabolik yollardaki enzimler gibi davranmaktadır. Antibiyotik dirençli bakteriler, antimikrobiyal etkiyi atlayıp yeni bir metabolik yol geliştirerek antibiyotiği etkisiz hale getirirler. Sülfonamidler ve trimetoprim, bakteriler için gerekli bir vitamin olan folik asidin biyosentezine engel olmaktadırlar. Sülfanomidler, para-aminobenzoat (PABA) yerine geçerek, folat sentezinin yapıtaşlarından olan 7,8-dihidropteroatın sentezini engellerler. Trimetoprim de benzer olarak dihidrofolatın tetrahidrofolata indirgenmesini engellemektedir. Sülfonamidlere ve trimetoprime karşı direnç, sırasıyla sülfonamidler ve trimetoprim için duyarlılığı ve afiniteyi azaltan, değiştirilmiş dihidropteroat sentaz ve dihidrofolat redüktaz sentezi ile metabolik değişime dayanmaktadır (Schmitz, Perdikouli ve ark., 2001).

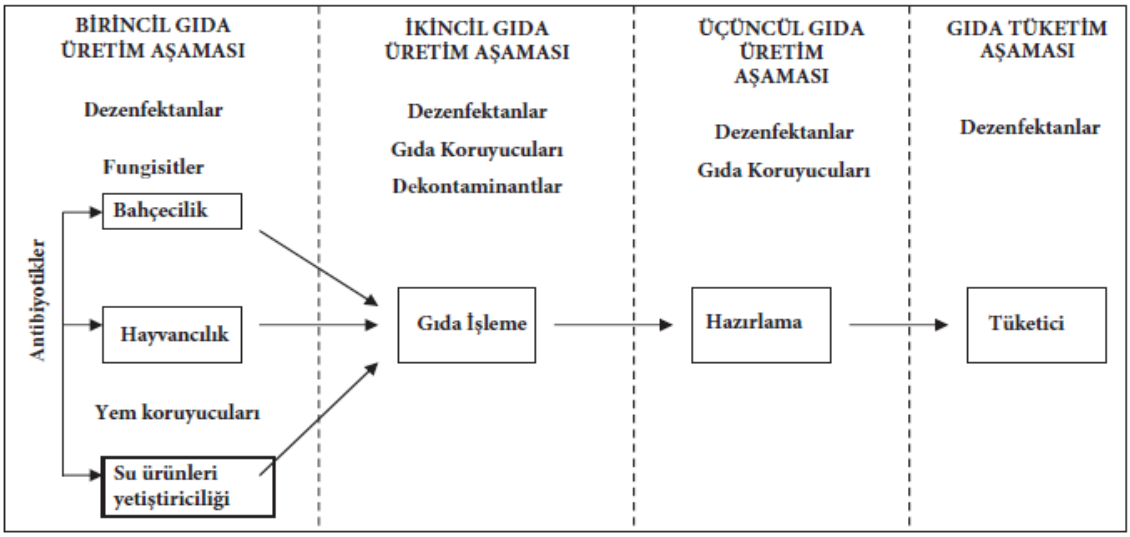
2.3.6. Biyofilm oluşturma

Birçok bakteri doğal veya abiyotik yüzeylerle ilişkilidir ve serbest hücrelerden ziyade biyofilm olarak büyümeyi tercih etmektedir. Biyofilmler, yüzeylerde oluşan ve doğada bulunan mikroorganizmalar için yaygın bir büyüme şekli olan bir ekzopolimerik manto içinde (dış-polimerler ve hücre dışı enzimler) bulunan mikroorganizmaların ortak yapılarıdır. Biyofilmlerdeki bakteri hücreleri, çeşitli mekanizmalar ile biyositlere ve antibiyotiklere karşı artan direnç gibi serbest hücrelerden farklı özellikler göstermektedir. Bu mekanizmalar; hücre dışı polimerik matriks nedeniyle aktif moleküllerin biyofilm boyunca difüzyonunun azaltılması, biyofilmde yüksek bakteri konsantrasyonu olması, fizyolojik durumun modifiye edilmesi: azalmış metabolizma ve büyüme hızı, porin sentezinin azalması ile membran geçirgenliğinin değiştirilmesi, çok ilaca direnç operonlarının ve efluks pompalarının indüksiyonu, antimikrobiyal bileşikleri parçalayan enzimlerin aşırı üretimi ve pasifleşme (dormansi) dir (Capita ve Alonso-Calleja, 2013).

2.4. Biyositler (Antiseptik ve Dezenfektanlar) Hakkında Genel Bilgi

Mikroorganizmalar üzerine değişik mekanizmalarla mikrobisit veya mikrobiostatik etki gösteren antiseptik ve dezenfektanlar, diğer yaygın bir terimle biyositler günümüz tıp pratiğinde yaygın kullanım alanı bulan maddeler arasındadır. Bu maddeler, hastaneler, diğer sağlık kurumları ve veterinerlikte kullanılmaktadır. Özellikle nozokomiyal

infeksiyonların önlenmesi ve kontrolünde ilgili maddelerden geniş ölçüde yararlanılmaktadır (Resim 2.3). Ayrıca hazır gıda sanayiinde ve kozmetik sektöründe ilgili maddelerin koruma amacıyla kullanımının giderek artması biyositlerin kullanım alanlarını genişletmiştir (Öztürk, 2002).



Resim 2.3. Gıda zincirinde kullanılan temel antimikrobiyal maddeler (Capita ve Alonso-Calleja, 2013).

Biyositler, gıda endüstrisinde temizlik ve dezenfeksiyon programlarında yer alan, patojenik ve gıdalarda bozulmaya neden olan bakterileri kontrol amacıyla kullanılan en önemli silahtır (Holah, Taylor ve ark., 2002). Giderek artan kullanımları, diğer antimikrobik maddelerde olduğu gibi, bunlara karşı da bir direncin gelişip gelişmediği sorusunu gündeme getirmiştir. Konu ile ilgili çalışmalar antibiyotik direnci kadar olmasa bile, son yıllarda üzerine önem verilen konulardan biri haline gelmiştir (Öztürk, 2002).

En önemli biyosit tipleri;

Alkoller

Aldehitler (Formaldehit, gluteraldehit)

Biguanidler (Klorhekzidin)

Diamidinler

Halojen salan maddeler

İyot ve İyodoforlar (Povidon iyodür)

Gümüş Bileşikleri

Peroksijenler (Hidrojen peroksit)

Fenoller
Kuaterner Amonyum Bileşikleri (Benzalkonyum Klorid) ‘dir (Öztürk, 2002; Keskin ve Kök, 2007; Eryılmaz ve Akin, 2008).

Araştırmamızda test materyali olarak kullandığımız biyositler; sodyum hipoklorit, hekzaklorofen, klorhekzidin, triklosan, povidon iyodin ve benzalkonyum klorittir. Aktif oksidize edici ajanlardan sodyum hipoklorit (NaOCl), klor içeren dezenfektanlar içerisinde yer almaktadırlar. Günümüzde gıda endüstrisinde en sık kullanılan ajan olmakla beraber evlerde, hastanelerde, hayvancılıkta ve yaşamın birçok alanında hijyen ve sanitasyon için kullanılmaktadır (Fukuzaki, 2006).

Kuaterner amonyum bileşikleri (KAB), birçok dezenfektanın bileşiğine eklenen katyonik bileşiklerdir. Benzalkonyum klorit, bu bileşiklerin en sık kullanılan sınıfıdır. Benzalkonyum kloridler, evlerde ve hastanelerde ortam temizliğinde kullanıldıkları gibi, lens solüsyonları, göz damlaları gibi insan hijyen ürünlerinin içine de eklenmektedirler (Ertekin ve ark., 2016).

Klorheksidin, geniş spektrumlu antibakteriyel aktiviteye sahip polisiklik bir bisbiguaniddir. El hijyeni, cerrahi antisepsilerde ve antimikrobiyal emdirilmiş kateterlerin ve sargıların bir bileşeni olarak, hayvancılıkta deri ve mukoza temizliği için yaygın olarak kullanılmaktadır. Klorheksidin, ayrıca, hastanede yatan hastalarda enfeksiyon riskini azaltmak ve MRSA dekolonizasyonunda mupirosin ile beraber burun içi yıkama solüsyonlarına eklenmektedir (Liu ve ark., 2015).

Triklosan, antisepsi (el yıkamaları, sabunlar) dahil birçok endikasyonda ve plastik, yastık, kozmetik, dişçilik ürünleri, kumaşlar, deodorantlar gibi birçok yerli üründe kullanılan bisfenol biyosit sınıfına ait bir maddedir. Yüksek konsantrasyonlarda, çoklu sitoplazmik ve membran hedeflerine sahip olmakla beraber, düşük konsantrasyonlarda, etki mekanizması esas olarak, 17enoil-asil taşıyıcı protein (ACP) redüktaz enziminin inhibe edilmesi yoluyla lipit sentezinin engellenmesi ile gerçekleşmektedir (Hughes ve Ferguson, 2017). Triklosan ve hekzaklorofen Gram pozitif bakterilere karşı, Gram negatiflerden daha fazla kullanılmaktadır. Hekzaklorofen, el temizliğinde ve derinin ameliyatlara hazırlanması için günümüzde kullanımı azalmakta olan bir antiseptik maddedir.

Povidon iyodin, iyot ve polivinil pirrolidon karışımı olan ve sıklıkla deri ve mukozalarda kullanılan kuvvetli bir antiseptiktir. İyodinin mikrobisidal aktivitesi, bakteri hücresel mekanizmalarının ve yapılarının inhibe edilmesini içermektedir. Solunum zincirinde yer alan sitozolik enzimlere ek olarak, bakteri hücre zarlarında nükleotitleri yağ/amino asitleri denatüre ve deaktive etmektedir (Bigliardi ve ark., 2017).

2.5. Biyosit Direnci

Gıda zinciri boyunca antimikrobiyal direncin seçilim ve yayılımı birincil olarak antibiyotik, ikincil olarak ise biyositlerin kullanımıyla artmaktadır (Morente ve ark., 2013). Bazı biyosit direnç tiplerinin bakteriler arasında aktarılabildiği ve en azından birinin gelecekte önemi artan bir problem olarak karşımıza çıkabileceği yönünde kanıtlar bulunmuştur (Fraise, 2002). Marker olarak antibiyotik direnç geni eklenmiş olan genetiği değiştirilmiş tarım ürünleri, gıda zincirine eklenen, aktarılma olasılığı olan antibiyotik direnç geni içeren mikroorganizmalar ve sub-letal dozda yapılan gıda işleme teknikleri de endişe kaynağı olmaktadır (Capita ve Alonso-Calleja, 2013).

Biyosit direnci, bir kromozomal genin mutasyonu veya amplifikasyonu yoluyla veya ekstrakromozomal genetik elementlerin (plazmitler ve transpozonlar) direnç genleri kazanması ile ortaya çıkabilir. Direncin biyosit inaktivasyonundan kaynaklanabildiği bilinmektedir, ancak nispeten nadirdir ve birkaç biyosit sınıfına (organik cıva bileşikleri) özgüdür. Daha yaygın olarak ve muhtemelen biyositler için hücresel hedeflerin çokluğunun bir sonucu olarak, direnç hücre zarf geçirgenliği veya artmış efluks faaliyetinden kaynaklanmaktadır (Poole, 2002).

Biyosit direnci de antibiyotik direncinde olduğu gibi doğal (intrinsik) direnç ve kazanılmış direnç olarak oluşabilmektedir. Doğal direnç, bakterilerin doğal fenotipik özellikleri ile oluşan ve kromozomal genler ile kontrol edilen dirençtir. Bu direnç genellikle antiseptik ve dezenfektanların hücre içine alımlarının azalması ile olmaktadır. Bakteri sporları, değişik gram negatif bakteriler ve mikobakteriler doğal olarak birçok biyosidal maddeye dirençlidir. Fizyolojik adaptasyon da doğal bir direnç mekanizmasıdır. Bu adaptasyona en önemli örnek olarak biyofilm oluşumu gösterilebilir. Biyofilm içindeki bakteriler, biyosidal maddelere daha dirençlidirler. Antibiyotik direncinde olduğu gibi, biyofilm tabakası çeşitli mekanizmalarla bakterilere direnç kazandırmaktadır (Çağlar, 2005).

Yüksek moleküler ağırlıklı maddeler, *Staphylococcus*'ların ve vegetatif *Bacillus sp.* duvarından kolayca geçebilmektedir. Bu nedenle gram pozitif bakteriler KAB ve klorhekzidin dahil değişik biyositlere karşı duyarlıdır. Bununla birlikte bakteri üreme hızı ve üreme ortamındaki besin kısıttlamaları, biyositlere karşı duyarlılığı değiştirebilir; daha dirençli formlar meydana gelebilir. *Enterococcus*'lar genel olarak *Staphylococcus*'lardan daha dirençli olmakla birlikte son yılların sorun bakterileri olan vankomisin dirençli *Enterococcus* kökenlerinin vankomisin duyarlı olanlara göre biyositlere daha dirençli olduklarına dair bir kanıt elde edilememiştir (Öztürk, 2002).

Kazanılmış direnç, mutasyon veya kromozom dışı genetik materyallerin kazanılması ile edinilen dirençtir ve söz konusu biyosidallerin kademeli olarak artan çeşitli dozlarına maruz kalma ile gerçekleşmektedir. Gram negatif bakteriler, genellikle antiseptik ve dezenfektanlara karşı spor oluşturmayan bakteriler ve mikobakteriyal olmayan gram pozitiflere göre daha dirençlidirler (Keskin ve Kök, 2007). Plazmid aracılıkla kazanılmış direnç, civa bileşikleri ve diğer metal tuzları için saptanmıştır ve son yıllarda değişik biyositlere karşı özellikle *Staphylococcus*'larda olmak üzere direnç geliştiği görülmektedir.

2.5.1. Hedef değişikliği

Bakteriyel hücre içerisinde birçok spesifik hedefi olan antibiyotiklerin aksine, biyositlerin birden çok hücresel bileşeni etkilediği görülmektedir ve bu nedenle, hedef bölge mutasyonlarının biyosit direncine neden olması nadir görülen bir durumdur (Morente ve ark., 2013). Diş macunları, sabunlar, deterjanlar ve cerrahi temizleyicilerde kullanılan popüler bir bakterisidal ve fungusidal bir ajan olan triklosana, bakterilerin yağ asidi sentezinde önemli rölü olan fabI geninde oluşan bir anlamsız mutasyon oluşarak ajanın tanınmaması ile direnç gelişebilmektedir. Bazı bakterileri suşları Kuaterner Amonyum Bileşiklerini (KAB) N-de alkilasyon yolu ile parçalayabilmektedir ve bu onları dirençli hale getirmektedir. Gıda ve diğer endüstrilerde sık ve gereğinden fazla KAB içeren dezenfektanların kullanımı, bu suşlar üzerinde seçici baskı oluşturup dirençli suşların çoğalarak ortamda üstün hale geçmesine neden olmaktadır (Paul ve ark., 2019).

2.5.2. Geçirmezlik (İmpermeabilite)

Antimikrobiyal maddelerin etki gösterebilmeleri için hücredeki hedef bölgelerine ulaşmaları gerekmektedir. Bakterilerde çeşitli mutasyon veya adaptasyonlar yoluyla dış membran geçirgenliğinin azalması, direncin gelişmesine neden olmaktadır. Gram negatif bakterilerde kazanılmış biyosit toleransından geçirgenlik değişikliklerinin sorumlu olduğunu belirten birçok araştırma bulunmaktadır. Bu araştırmalarda, yüzey hidrofobikliği, dış zar yapısı, zar proteinlerinin ve dış zar yağ asidi bileşimindeki değişikliklerin bu direnci oluşturabildiğini tespit etmişlerdir (Morente ve ark., 2013). Yine de, son veriler bir direnç mekanizması olarak dış membran bariyer geçirgenliğinin, ek direnç mekanizmaları (efluks ve b-laktamazlar) ile beraber çalıştığında önemli olduğunu göstermektedir. Ayrıca membran geçirmezliğinin biyofilm mekanizması ile desteklendiğinde de ciddi önem oluşturabileceği belirtilmiştir (Poole, 2002).

2.5.3. Efluks

Biyosit direncine sebep olan efluks pompası proteinleri içinde antibiyotikleri de barındıran geniş bir ajan topluluğunu hücre dışına pompalamakla görevlidir (Morente ve ark. 2013). Günümüzde tanımlanmış yedi büyük bakteriyel çoklu antimikrobiyal efluks pompası ailesi bulunmaktadır, bunlar; adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette (ABC) süperailesi, resistancenodulation- division (RND) ailesi, major facilitator superfamily (MFS), small multidrug resistance (SMR) ailesi, multidrug and toxic compound extrusion (MATE) ailesi, proteobacterial antimicrobial compound efflux (PACE) ailesi ve p-aminobenzoyl-glutamate transporter (AbgT) ailesidir. Bu aileler amino asit sekans benzerlikleri substrat profilleri, substrat pompalamada kullandıkları enerji kaynaklarına göre sınıflandırılmışlardır. Ailelerin büyük çoğunluğunun en az bir üyesinin, yüksek çözünürlüklü yapı tespiti ile, transmembran helikslerin (TMH) sayısı da dahil olmak üzere protein yapısal organizasyonu doğrulanmıştır (Ahmad, Nawaz ve ark., 2018).

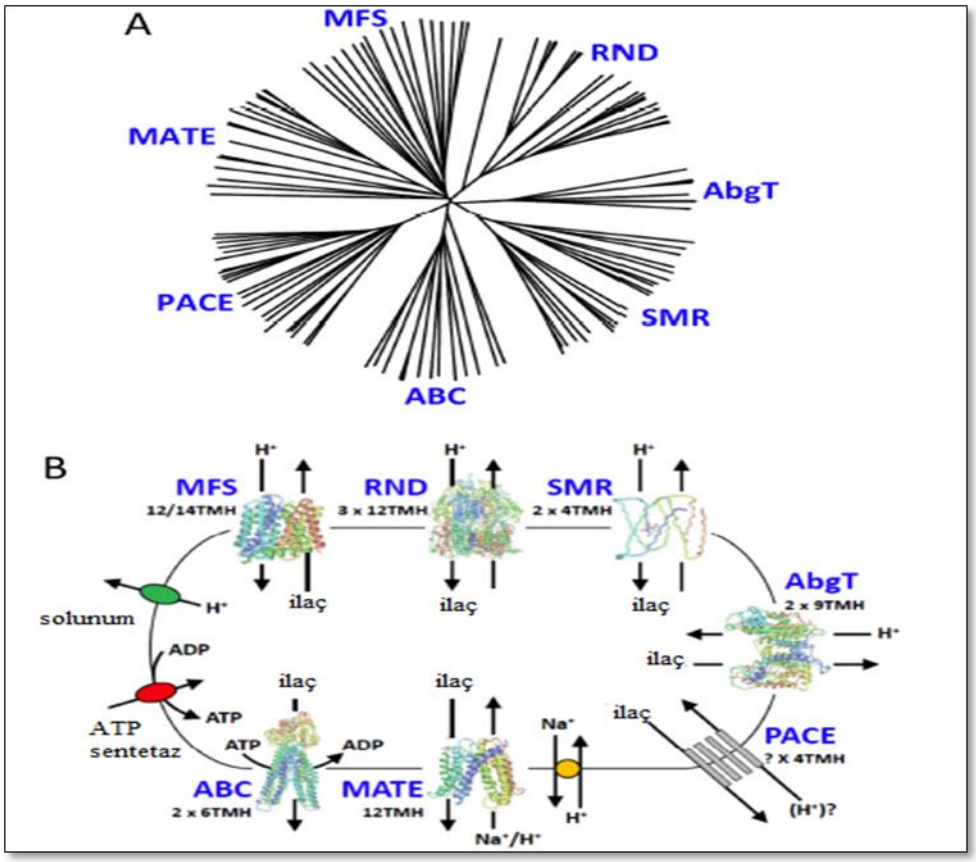
Efluks pompaları, RND ailesi örneğinde olduğu gibi, sadece iç membran taşıyıcıları değildir aynı zamanda dış membran kanalları ve periplazmik adaptör proteinleridir. RND ailesinden pompaların, *Pseudomonas aeruginosa*'da (MexB) ve *Escherichia coli* ve *Salmonella typhimurium*'da (AcrB) belirgin antibiyotik direnci ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır. Gram pozitif bakterilerde MFS ailesinden pompa proteinlerini kodlayan

genler, *Staphylococcus aureus*'ta NorA ve *Streptococcus pneumoniae*'da PmrA gibi, tanımlanmıştır (Navidinia ve Goudarzi, 2019).

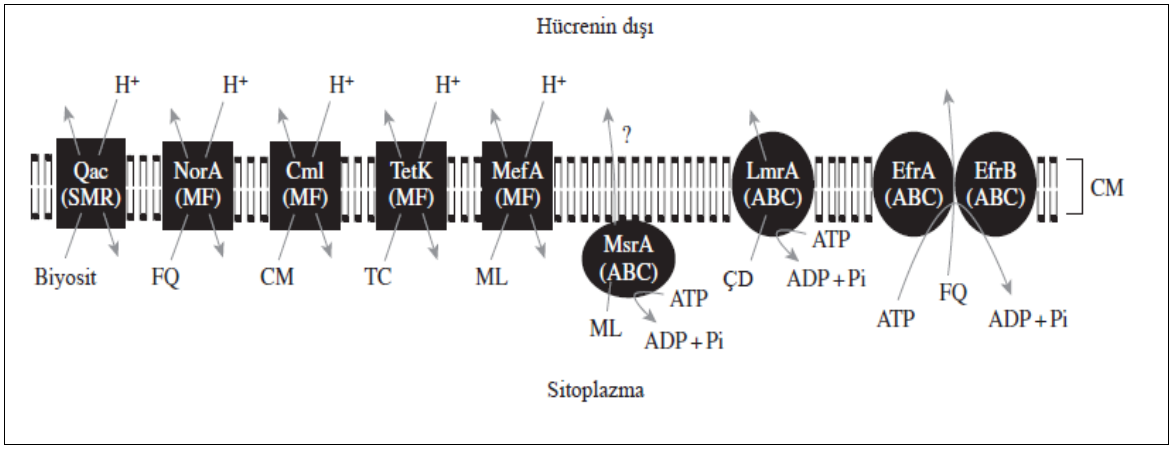
Gram pozitif bakterilerde, efluks pompa proteinleri yaygın olarak bulunmakta olup, son yıllarda yoğunlaşan çalışmalar stafilokok, streptokok, enterokok gibi klinik önemi olan bakterilerin çoklu ilaç direncinde bu proteinlerin etkin rol oynadığını ortaya koymaktadır. Hücre duvarı yapısı sebebiyle Gram pozitif bakterilerde efluks pompa sistemlerinin organizasyonu Gram negatif bakterilerden daha basit bir yapıdadır ve proteinler hücre zarında bulunmaktadır. *S.aureus*'ta sentezi plazmid kontrolündeki qacA ve smr pompa proteinlerinin, antiseptik ve dezenfektanlara; sentezi kromozomal genlerin kontrolünde olan NorA'nın ise hidrofilik kinolonlara yüksek düzey dirence yol açması, hastane enfeksiyonlarının kontrolü açısından önem taşımaktadır. Varlığı ilk kez *S.epidermidis*'te gösterilen ABC ailesine ait MsrA proteininin homoloğu, *S.aureus*'un klinik izolatlarında da gösterilmiş olup makrolid ve streptogramin B direnciyle ilişkili bulunmuştur. Diğer bir araştırmada, ilk kez bir MATE tipi pompa proteininin de (MepA), *S.aureus*'ta biyosit ve florokinolon direnciyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Hasdemir, 2007).

2.6. Gram Pozitif Bakterilerde Bulunan Efluks Pompa Genleri

Gram pozitif hücre zarfı, ince bir tabaka fosfolipid üzerinde kalın bir tabaka peptidoglikan tabakadan oluşmaktadır. Gram negatif bakterilerde ise iki katmanlı hücre duvarı ve hücre zarı bulunmaktadır. Gram negatif bakterilerde hücre zarı ve hücre duvarı katmanlarını içeren çok bileşenli kompleks bir çoklu ilaç pompa sistemi, Gram pozitif bakterilerde ise tek bir transmebran bileşeni vardır. Klinik açıdan önemli ilaçların dışa atımını sağlayan RND süperailesi pompa proteinlerinin gram negatif bakterilerde hücre iç ve dış mebranının her üç katmanını da kapsayan bileşenleri mevcuttur. Bu sebeple yıllarca Gram pozitif bakterilerde RND süperailesi proteinlerinin bulunmadığı düşünülmekteydi fakat 2001 yılında RND süperailesinden olan yerP proteininin *Bacillus subtilis*'te bulunması bu fikrin değişmesini sağlamıştır. Daha sonra diğer büyük çoklu ilaç pompası süperaileleri gen ve proteinlerinin (MFS, ABC, MATE,SMR, PACE, AbgT) (Resim 2.4) de Gram pozitif bakterilerde iyi bir şekilde temsil edildiği belirlenmiştir (Li ve ark., 2016, Ahmad ve ark., 2018).



Resim 2.4. A. Bakterilerde bulunan 7 farklı efluks pompa gen ailesinin filogenetik illüstrasyonu. B. Efluks pompası gen ailelerinin yapısal organizasyonları ve enerji kullanım mekanizmalarını gösteren şematik illüstrasyon, TMH, transmembran heliks sayısını ifade



Resim 2.5. Gram pozitif bakterilerde bulunan antimikrobiyal dirençle ilişkili, farklı pompa ailelerini temsil eden efluks pompaları, FQ, florokinolonları, CM, kloramfenikolü, TC, tetrasiklinleri, ML, makrolidleri, ÇD, çoklu direnci temsil etmektedir. norA, florokinolonlarla beraber birçok biyosit ve ilacı dışarı pompalayan bir proteindir (Poole, 2005).

Gram pozitif bakteriler içinde biyosit direnç genleri en iyi *S.aureus*'ta çalışılmıştır. *S.aureus*'ta bulunan kromozom tarafından kodlanan en önemli genler, norA (MFS), norB (MFS), norC (MFS), mepA (MATE), mdeA (MFS), sepA (n.d), sdrM (MFS), lmrS (MFS), plazmidler tarafından kodlanan en öneli genler ise qacA (MFS), qacB(MFS), smr (SMR), qacG(SMR), qacH(SMR) ve qacJ(SMR)'dir (Costa ve ark., 2013) (Resim 2.5).

Araştırmamızda çalışılan genlerden qacA/B, MFS süperailesinden, plazmidler tarafından kodlanan, proton hareket kuvveti ile çalışan ve içinde 12 farklı kimyasal sınıftan lipofilik mono ve di katyonlar bulunan 30 farklı antimikrobiyal maddeyi (benzalkonyum klorit, klorhekzidin, diamidinler, boyalar vb.) hücre dışına pompalayan, özellikle *Staphylococcus*'larda çok iyi çalışılmış olan proteinleri kodlamaktadır (Andersen ve ark., 2015).

acrB geni, RND süperailesinden, proton hareket kuvveti ile çalışan başta akriflavinler ve florokinolonlar olmak üzere birçok substratı olan proteini kodlamaktadır (Anes ve ark., 2015). norE geninin kodladığı protein, MATE süperailesinden, proton hareket kuvveti ile çalışan (sodyum gradiyent), florokinolonlar başta olmak üzere birçok substratı dışarı atmaktadır. sugE geni, SMR süperailesinden, proton hareket kuvveti ile çalışan, Gram negatif bakterilerde çok iyi tanımlanmış, setiltrimetilamonyum bromür, setilpiridinyum klorür, tetrafenilfosfonyum, benzalkonyum klorür, etidyum bromür ve sodyum dodesil sülfat gibi maddelere direnci sağlamaktadır (Fuentes ve ark., 2014).

Smr geni ürünü, SMR süperailesinden, proton hareket kuvveti ile çalışan, plazmidlerle kodlanan, Gram pozitif bakterilerde çok çalışılan ve benzalkonyum klorür, etidyum bromid gibi maddeleri hücre dışına pompalamakla görevli proteindir. efrA/B, *Enterococcus*'larda bulunan, ABC süperailesinden, ATP enerjisini kullanan ve akriflavin, etidyum bromür, safranin O, DAPI, daunomisin, doksorubisin, novobiyosin, arbekasin, doksisiklin ve norfloksasin gibi maddeleri dışarı pompalayan proteinleri kodlamaktadır (Lerma ve ark., 2014).

Kromozomda kodlanan mdeA gen ürünü, MFS süperailesinden, proton hareket kuvveti ile çalışan ve benzalkonyum klorür, etidyum bromid, virjinyamisin, novibiosin gibi maddeleri dışarı pompalamaktadır. MATE süperailesinden mepA geni, kromozomda kodlanmakta, proton hareket kuvveti ile çalışmakta (sodyum gradiyent) ve kuaterner amonyum

bileşikleri (örneğin benzalkonyum klorür, setirimid, dekalinyum), klorheksidin, tetrafenil-fosfonyum, pentamidin ve boya etidyum bromür, ayrıca glisilinlerin sınıfından bir antibiyotik olan tigesikline bağlanmaktadır. norA ve norB genleri MFS süperailesine bağlıdır, kromozomda kodlanmakta, enerji olarak proton hareket kuvvetini kullanmakta ve proteinleri florokinolonlar, etidyum bromür ve birçok biyositi hücre dışına pompalamaktadırlar. Kromozomal olarak kodlanmış sepA geni, antiseptik bileşiklere, yani benzalkonyum klorür, klorheksidin glukonat ve boya akriflavine karşı düşük seviyede direnç sağlayan bir efluks pompası olarak tanımlanmaktadır (Andersen ve ark., 2015, Li ve Nikaido, 2009, Costa ve ark., 2013).

2.7. Biyosit – Antibiyotik Direnci Arasındaki İlişki

Antibiyotik ve biyositlerin içinde bulunduğu antimikrobiyal ajanlar bakteriler üzerinde bakterisidal veya bakteriyostatik olarak benzer etkiler göstermektedir. Bakteriler bu ajanlara karşı ortak direnç mekanizmalarına sahiptir. Bakterilerin, biyosit maruziyetinden sonra beş ana prensibi takip ederek antibiyotiklere karşı direnç geliştirdiği kanıtlanmıştır. Bunlar, çapraz direnç, maruziyet ile gelişen fenotipik değişiklikler, ortak direnç (co-resistance) (alıcı hücreye hem biyosit hem antibiyotik direnci kazandıran, kromozom dışı genetik materyaller ile edinilen direnç), maruziyet sonucunda daha toleranslı alt popülasyonların gelişmesi ve biyosit ve antibiyotik maruziyeti sonrası hasarlı DNA'yı onarmak için bakterilerdeki SOS tepkisinin etkinleşmesi ile DNA hasarında ani artışlardan kurtulma mekanizmasıdır (SCENIHR, 2009).

Çapraz direnç, benzer şekilde etkili bileşikler veya ajanları tolere etmek için aynı stratejiyi kullanan belirli bir toksik maddeye karşı geliştirilmektedir. Antimikrobiyal kemoterapi sırasında, mikroorganizmalar onları antimikrobiyallere karşı dirençli kılan bir kaçış mekanizması olarak mutasyona uğramaktadırlar (Paul ve ark., 2019). Giderek büyüyen bir tehlike de antibiyotikler ve biyositler arasında çapraz direnç oluşumudur. Özellikle gıda alanında yaygın olarak kullanılan biyositler ile antibiyotikler arasındaki çapraz direnç önemli halk sağlığı sorunlarına yol açabilmektedir. Çapraz direnç iki antibakteriyel ajan hedefe ulaşmak için aynı yolu kullanıyorsa (ör. porinler gibi), benzer etki mekanizmasına sahip ise (ör. protein sentez inhibisyonu gibi) veya benzer direnç mekanizmalarına sahip ise (ör. permeabilite azalması gibi) ortaya çıkabilmektedir. Biyositler ile çapraz direnç

antibiyotiklerle ve/veya dezenfektanlar ile oluşabilmektedir (SCENIHR, 2009, Morente ve ark., 2013, Navidinia ve Goudarzi, 2019).

Bakteriler arasında biyositlere en fazla direnç bakteri sporlarında görülmektedir. Manto (spor kabuğu) biyositlerin geçişini engellemektedir. Stafilokoklar gibi gram pozitif bakterilerin hücre duvarı biyositlere karşı etkili bir engel oluşturmaz. Mukoid ve/veya slime faktörü taşıyan stafilokoklar kloroksilenol, setrimid ve klorhekzidine daha dirençlidir. Slime faktörü uzaklaştırıldığında dirençli stafilokoklar daha duyarlı hale gelmektedir (Fraise, 2002).

Birçok araştırmacı, veteriner, gıda ve klinik bakteri izolatları ile yaptıkları çalışmalarda çoklu antibiyotik direnci gösteren izolatların, biyosidal maddelere de duyarlılıkların da azalmış olduğunu gözlemlemişlerdir (Gibbons ve Udo, 2000; Morente ve ark., 2013; Fuentes ve ark., 2014; Becker ve ark., 2018).

Antibiyotik ve Biyosit Direnci Arasındaki Benzerlik ve Farklılıklar:

Benzerlikler

İntrinsik (doğal) direnç (örneğin sporların alkollere dirençli olması) ve dış etken kaynaklı dirençlerin (ağır metallere karşı efluks pompaları) iyi tanımlanmış olması,
Kazanılmış direnç mekanizmaları benzerdir (örneğin geçirmezlik, efluks pompaları).
Biyofilmlerin inaktivasyon ve ölümü engellemesi,
İnaktivasyon, antibiyotik veya biyosit ile temas konsantrasyonuna ve süresine bağlıdır.

Farklılıklar

Çoğu antibiyotik biyosentetik işlemlerde belirli bir hedefi engeller,
Çoğu biyosit, düşük veya yüksek konsantrasyonlarda etkili olan, çoklu konsantrasyon bağımlı hedeflere etki etmektedir (Weber ve ark., 2019).

2.8. Efluks Pompa İnhibitörleri

Bakteriyel çoklu antibiyotik direncine neden olan efluks pompa proteinlerini inhibe ettiği bilinen bazı bileşikler; fenil arjinin betanaftilamid (PAβN), INF271, INF55, karbonil

siyanid m-klorofenil hidrazon (CCCP), rezerpin, 1-(1-naftilmetil) piperazin (NMP), birikodar, timkodar, verapamil, milbemisin, klorpromazin, paroksetin ve omeprazoldur.

Efluks pompa inhibitörlerinin çalışma mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamakla beraber, birkaç mekanizma ile çoklu antimikrobiyal direncini azaltabildikleri çeşitli araştırmalarda belirtilmiştir (Schmitz ve ark., 1998; Marquez, 2005, Pages ve Amaral, 2009). Bu mekanizmalar; inhibitörün antibiyotiklerle yarışmalı veya yarışmasız olarak doğrudan pompaya bağlanması ile pompayı bloke etmesi, ATP bağlanmasını inhibe ederek veya proton gradyanını bozarak enerjinin tükenmesine de neden olması, inhibitörün antibiyotik ile kompleks oluşturarak ilacın hücrelere girmesini kolaylaştırması ve kompleksin daha büyük olması nedeniyle hücreden dışarı pompalanmasını engellemesi şeklinde işleyebilmektedir (Schmitz ve ark., 1998; Marquez, 2005).

Toksisiteye yol açabilmeleri sebebiyle, henüz klinik kullanımı olan bir pompa inhibitörü yoktur. Endüstriyel ve akademik alanda faaliyet yürüten pek çok araştırmacı tarafından, pompa inhibisyonu özelliği keşfedilen doğal ve sentetik kaynaklı pek çok bileşik rapor edilmektedir. Bu çerçevede, patent başvuru örnekleri de olan çeşitli antibiyotik türevi (tetrasiklin, aminoglikozit ve florokinolon analogları) ve antibiyotik dışı bileşikler (indol, üre, aromatik asit, piperidin-karboksilik asit, kinolin türevleri ve peptidomimetikler) sıklıkla çalışılmaktadır. Yapılan çalışmalarla, efluks pompa inhibitörlerinin bazı antibiyotiklerin minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerlerini düşürdüğü gösterilmiştir (Aygül, 2015).

Gram negatif bakterilerde, fenil-arginin-β-naftilamid (PaβN)'in güçlü bir efluks pompa inhibitörü olduğu; *Pseudomonas aeruginosa*'nın Mex pompa sistemleri, *Enterobacteriaceae* ailesinin AcrAB pompa sistemi ve *Campylobacter jejuni*'nin eritromisin pompa sistemi tarafından sağlanan norfloksasin direnç aktivitelerini azaltabildiği tespit edilmiştir (Kumar ve ark., 2013).

Rezerpin, P-glikoproteini inhibe ettiği bilinen ve antihipertansif olan bir bitkisel alkaloiddir. Gram pozitif bakterilerde, NorA ve Bmr çoklu ilaç pompa sistemlerini inhibe ettiği ortaya konan ilk bileşiktir. Rezerpin bir efluks pompa inhibitörü olarak çok ilaca dirençli Gram pozitif bakterilerde florokinolon aktivitesini arttırmaktadır. Rezerpin ya da diğer NorA inhibitörlerinin kullanılması *S. aureus*'da NorA pompasını inhibe etmektedir.

İn vitro olarak *S. aureus* ve *S. pneumonia*'nın dirençli varyantlarının ortaya çıkışını da azaltmaktadır. Rezerpin tetK determinantını bulunduran MRSA türlerine karşı tetrasiklin aktivitesini de artırmaktadır ve *Lactococcus lactis'teki* çoklu ilaç direncini sağlayan ABC efluks sisteminin üyesi olan LmrA'yı inhibe ettiği de gösterilmiştir (Alqwai ve ark., 2003).

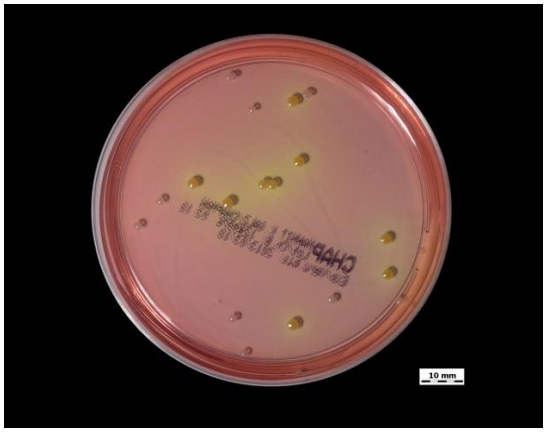
3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Gıda Örneklerinin Toplanması, İzolasyon ve Ön Tanımlamalarının Yapılması

Kasım 2016 – Mayıs 2017 tarihleri arasında, Ankara'nın çeşitli market, mandıra ve pazarlarında satışa sunulan 13 çiğ süt, 60 peynir, 18 çiğ tavuk ve 41 et (kıyma, kuşbaşı), fermente et (sucuk, sosis, salam) olmak üzere, toplam 132 gıda örneği materyal olarak kullanılmıştır. Örnekler soğuk zincir koşulları dikkate alınarak, steril kapların içinde laboratuvar ortamına getirilmiş ve aynı gün içinde çalışılmıştır.

Araştırmamızda Türk Standartları Enstitüsünde (TSE, 2011) belirtilen esaslara göre çiğ süt örnekleri steril 200 ml 'lik şişelere alınmıştır. Laboratuvara getirilen 25 ml çiğ süt örneğinden 225 ml'lik steril tamponlanmış peptonlu su (Buffered Peptone Water, BPW, Merck, 107228) kullanılarak sırasıyla 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}'lük dilusyonlar hazırlanmıştır. Analiz için laboratuvara steril koşullarda getirilen 25 g peynir örnekleri steril bir kapta tartılmış, 225 ml steril Ringer Çözeltisi'nde (Merck, 115525) ezilip homojenize edilerek 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}' lük dilusyonları hazırlanmıştır. 25 g et ve tavuk örnekleri steril kaplarla laboratuvara getirilip tartılıp parçalanarak, 225 ml'lik steril BPW içine alındıktan sonra 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}' lük dilusyonları hazırlanmıştır. Bütün dilüsyonlardan, Mannitol Salt Phenol-Red Agar'a (MSA, Merck, 105404) 0,1 ml ekim yapılarak 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır (Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği, 2011).

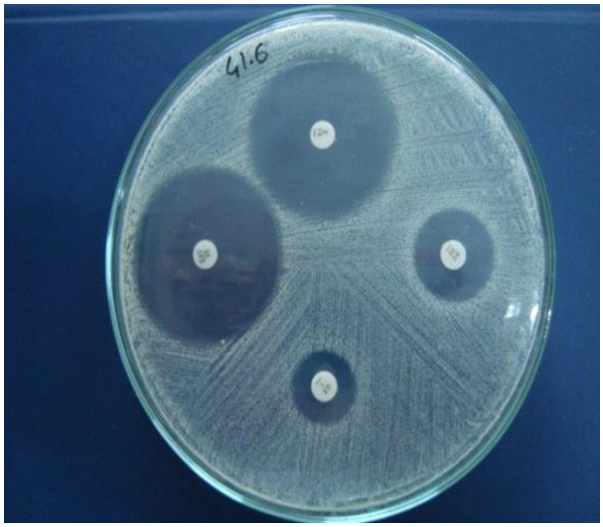
MSA besiyerinde sarı zon oluşturan sarı-parlak kolonilere ve kırmızı-mor zon oluşturan beyaz şüpheli kolonilere (Resim 3.1) Gram boyama, katalaz, oksidaz testleri uygulanmıştır. Gram pozitif (+), üzüm salkımı şeklinde kok, katalaz pozitif (+) ve oksidaz negatif (-) olan koloniler *Staphylococcus* olarak adlandırılmıştır. Araştırmamızda yapılacak tüm deneyler için kontrol suş olarak *S.aureus* ATCC 29213 kullanılmıştır (Chajecka-Wierzchowska ve ark., 2015).



Resim 3.1. Mannitol Salt Agar üzerinde *Staphylococcus*'ların görünüşü (http://www.bacteriainphotos.com/mannitol_agar.html)

3.2. İzolatların Antibiyotik Dirençliliklerinin Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemiyle Belirlenmesi

Antibiyotik duyarlılık testi Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü'nde (CLSI) (CLSI, 2013) belirtilen kriterlere göre Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine göre yapılmıştır. *Staphylococcus* izolatları Mueller Hinton Agar (MHA, Merck, 105435) besiyerine ekilip 30-35^{o}C'de 24 saat inkübe edildikten sonra, kültürlerden 2-3 koloni alınarak, 0,5 MacFarland bulanıklık standardına eşdeğer olacak şekilde serum fizyolojik içinde süspanse edilmiştir. Süspansiyondan, steril eküvyon çubuk ile alınan izolatlar MHA besiyeri yüzeyine sürme yöntemi ile ekilmiştir. Besiyeri yüzeyi kuruduktan sonra antibiyotik diskleri yerleştirilerek 37°C'de 18-24 saatlik inkübasyon sonucunda oluşan antibiyotik inhibisyon zon çapları milimetrik olarak ölçülmüştür. Elde edilen zon çapları CLSI da (CLSI, 2013) belirtilen zon çaplarıyla karşılaştırılarak *Staphylococcus*'ların antibiyotiklere hassas ve dirençli olarak değerlendirilmesi yapılmıştır. Çalışılan izolatlar için ampisilin (AM,10µg), sefkuinom (CFQ,30µg), tetrasiklin (TE,30µg), gentamisin (CN,10 µg), enrofloksasin (ENO,15µg), eritromisin (E,15µg) antibiyotikleri kullanılmıştır. İzolatlar Çizelge 3.1'de belirtilen (CLSI, 2013), inhibisyon zon çaplarına göre hassas ve dirençli olarak değerlendirilmiştir (Resim 3.2).



Resim 3.2. Antibiyotik Dirençlilik Testi (Fotoğraf, G.Ü.Fen Fak. Mikrobiyoloji Laboratuvarında Meryem Burcu Külahcı tarafından çekilmiştir.)

Çizelge 3.1. Araştırmamızda kullanılan antibiyotik diskleri ve duyarlılık sınırları

Antibiyotikler	Antibiyotik konsantrasyonu (µg)	Zon çapı (mm)	
		Hassas	Dirençli
Ampisilin(AM)	10 µg	≥29	≤28
Sefkuinom (CFQ)	30 µg	≥23	≤22
Tetrasiklin(TE)	30 µg	≥19	≤14
Gentamisin (CN)	10 µg	≥15	≤12
Enrofloksasin (ENO)	15 µg	≥23	≤22
Eritromisin (E)	15 µg	≥23	≤13
Kloramfenikol (C)	30 µg	≥18	≤12
Nitrofurantoin (F)	300µg	≥17	≤14
Siprofloxacin (CIP)	5 µg	≥21	≤15
Sefuroksim (CXM)	30 µg	≥18	≤14

Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine göre antibiyotik dirençli izolat sayısı ve yüzdeleri Çizelge 4.3'te ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

3.3. Bakteri İzolatlarının Antibiyotik Dirençliliklerinin Mikrodilusyon (MİK) Yöntemiyle Belirlenmesi

Toz antibiyotikler uygun çözücüler olan; %95 etanol (eritromisin), steril distile su (sefkuinom, gentamisin, tetrasiklin), fosfat tamponu, pH: 6.0, 0.1 mol/L (ampisilin), %1 dimetil sülfosit (DMSO) (enrofloksasin) çözünmeleri sağlandıktan sonra steril distile su ile

1024 µg/ml konsantrasyonda hazırlanmaları için stok solüsyon olarak CLSI kriterlerine göre hazırlanmıştır (CLSI, 2013).

Araştırmamızda; antibiyotik olarak; ampisilin (AM; Sigma), sefkuinom (CFQ, İntervet), tetrasiklin (TE; Fluka), gentamisin (CN; Sigma), enrofloksasin (ENO, Bayer), eritromisin (E, Bilim), vankomisin (VA, Sigma) kullanılmıştır. Antibiyotik direnç ve duyarlılığının belirlenmesinde mikrodilüsyon yönteminin kullanıldığı testte 100µl Mueller Hinton Broth (MHB, Merck, 110293) besiyeri içeren 96-kuyulu mikroplakta (U taban) her bir antibiyotiğe ait CLSI'da belirtilen direnç ve duyarlılık sınırlarına göre hazırlanmış başlangıç dilüsyon solüsyonları eklenerek çift katlı dilüsyonları (≤512 µg/ml) yapılmıştır**.** Kuyulara 0,5 McFarland yoğunluğunda taze hazırlanmış bakteri kültür süspansiyonundan $2x10^5$cfu/ml yoğunlukta tüm kuyulara 10 µl ilave edilerek 37ºC'de 16-18 saat inkübe edilmiştir. Makroskobik olarak üreme görülmeyen en düşük konsantrasyon Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları olarak (MİK) belirlenmiştir. Besiyeri, kültür ve çözücü kontrolleri testte 2 paralel olarak çalışılmıştır.

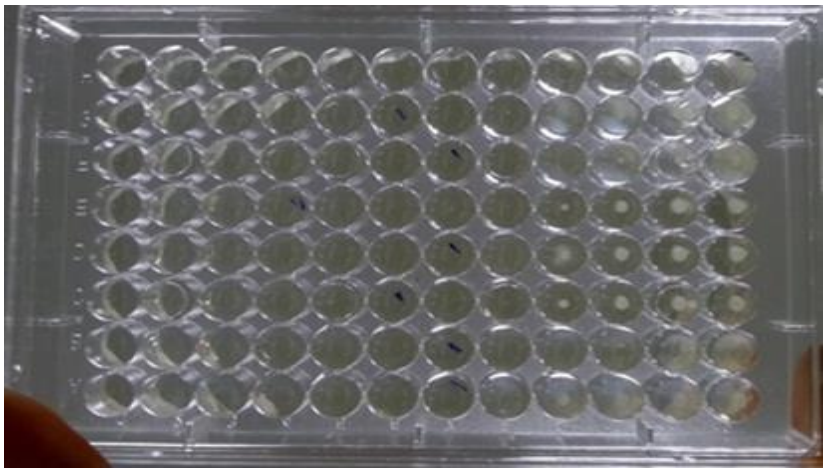
Tüm bakteri izolatları her bir antibiyotik için belirlenen MİK değerleri CLSI kriterlerine göre dirençli ve duyarlı kabul edilmiştir (CLSI, 2013). Buna göre; ampisilin (S≥0.25; R≤0,5 µg/ml), sefkuinom (S≥2; R≤8 µg/ml), tetrasiklin (S≥4; R≤16 µg/ml), gentamisin (S≥4; R≤16 µg/ml), enrofloksasin (S≥0.25; R≤1 µg/ml), eritromisin (S≥0.5; R≤8 µg/ml), vankomisin (S≥4, R≤32)dir.

3.4. Bakteri İzolatlarının Biyositler İçin Minimal İnhibitör Konsantrasyon Değerlerinin (MİK) Belirlenmesi

Biyosidal test maddeleri, uygun çözücüleri olan %95 etanol (klorhekzidin, hekzaklorofen), steril distile su (benzalkonyum klorür, sodyum hipoklorit, povidon iyodin), etanol (triklosan) ile çözünmeleri sağlandıktan sonra steril distile su ile 1024 µg/ml (klorhekzidin, hekzaklorofen, benzalkonyum klorür, triklosan), 100 mg/ml (sodyum hipoklorit), 100 g/l (povidon iyodin) konsantrasyonlarda stok solüsyonları hazırlanmıştır.

Araştırmamızda kullanılan biyosidal maddeler klorhekzidin (CH, Sigma), hekzaklorofen (HC, Sigma), benzalkonyum klorür (BC, Sigma), sodyum hipoklorit (SC, Merck), povidon iyodin (PI, Sigma), triklosan (T, Sigma)'dır.

Biyosit MİK değerlerinin belirlenmesinde mikrodilüsyon yönteminin kullanıldığı testte 100µl MHB (Merck, 110293) içeren 96-kuyulu mikroplakta (U taban) hazırlanmış başlangıç dilüsyon solüsyonları eklenerek çift katlı dilüsyonları yapılmıştır**.** Kuyulara 0,5 McFarland yoğunluğunda taze hazırlanmış kültür süspansiyonundan $2x10^5$cfu/ml yoğunlukta tüm kuyulara 10 µl ilave edilerek 37ºC'de 16-18 saat inkübasyon sonrası makroskobik olarak üreme görülmeyen en düşük konsantrasyon Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları olarak (MİK) belirlenmiştir (Resim 3.3, 3.4). Besiyeri, kültür ve çözücü kontrolleri testte iki paralel olarak çalışılmıştır.



Resim 3.3. Biyosit MİK belirleme testi (Fotoğraf, G.Ü. Fen Fak. Mikrobiyoloji Laboratuvarında Meryem Burcu Külahcı tarafından çekilmiştir.)



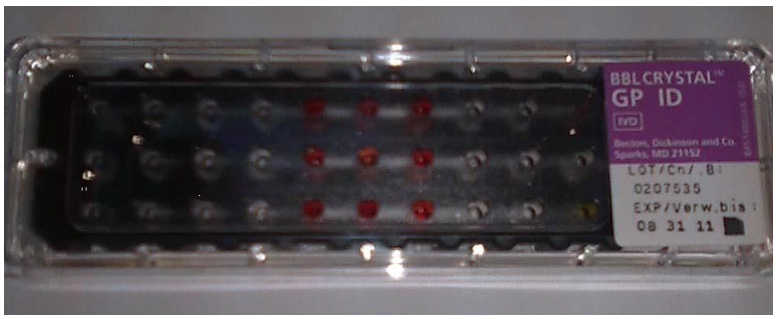
Resim 3.4. Biyosit MİK belirleme testi (Fotoğraf, G.Ü.Fen Fak. Mikrobiyoloji Laboratuvarında Meryem Burcu Külahcı tarafından çekilmiştir.)

3.5. Antibiyotik Direnci Gösteren Bakterilerin BD BBL Crystal Tanımlama Kiti ile Tanımlanması

Disk difüzyon yöntemi ile antibiyotiklerin bir veya birden fazlasına direnç gösterdiği belirlenen Gram pozitif bakteri izolatları seçilerek, Becton Dickinson (BD) BBL Crystal Identification System Gram-Positive ID tanımlama kitiyle tanımlamaları yapılmıştır.

Bu test için izolatların Triptic Soy Broth (CASO, TSB, Merck, 100800) içerisindeki 18-24 saatlik kültürleri kullanılmıştır. Bu kültürlerden alınan 100 µl, kit içinden çıkan sıvı çine inoküle edilerek 0,5 McFarland bulanıklık olacak şekilde ayarlanmıştır. Vortex ile iyice homojenize edilen bakteri süspansiyonları, BBL Crystal Base paneline boşaltılmış ve tüm kuyucukların süspansiyonla dolması sağlanmıştır. BBL Crystal GP ID Panel kapakları kapatılmıştır.

Paneller ters çevrilerek 35-37^{o}C'de, nemli ortamda 18-24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda paneller BBL Crystal Panel Viewer cihazı kullanılarak ve BBL Crystal Gram-Positive Identification Color Chart tablosu yardımıyla okunmuş ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonuçları bilgisayar ortamında, BBL Crystal Identication System programına aktarılarak *Staphylococcus* tür tanımlaması yapılmıştır (Resim 3.5, 3.6).



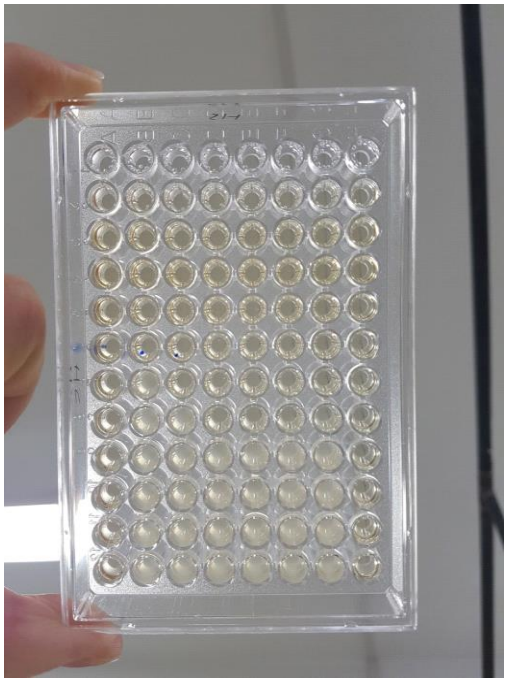
Resim 3.5. BBL Crystal GP ID Panel kapaklarının kapatılması (Fotoğraf, G.Ü.Fen Fak. Mikrobiyoloji Laboratuvarında Meryem Burcu Külahcı tarafından çekilmiştir.)



Resim 3.6. BBL Crystal Panel Viewer Cihazı (Fotoğraf, G.Ü.Fen Fak. Mikrobiyoloji Laboratuvarında Meryem Burcu Külahcı tarafından çekilmiştir.)

3.6. Rezerpinin Antibiyotik Direnci ve Biyosit MİK Değeri Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Daha önce, antibiyotiklerden bir veya birden fazlasına direnç gösterdiği belirlenen Gram pozitif bakteri izolatları, antimikrobiyal dirençlerinin rezerpin duyarlı efluks pompa sistemiyle olup olmadığını belirlemek amacıyla, mikrodilusyon yöntemi ortama antibiyotik ve biyositlerle beraber 0,01 mg/ml oranında rezerpin eklenerek tekrar edilmiştir (Resim 3.7, 3.8). Rezerpin eklendiğinde oluşan MİK değeri ile eklenmediğinde görülen değer oranlanmış ve oranın 4 katı ve üzeri görülmesi durumunda direncin rezerpin duyarlı efluks pompası ile olabileceği düşünülmüştür (Gibbons ve Udo, 2000).



Resim 3.7. MİK yöntemi ile antibiyotik dirençlilik testinin reserpin eklenerek tekrarlanması (Fotoğraf, G.Ü.Fen Fak. Mikrobiyoloji Laboratuvarında Meryem Burcu Külahcı tarafından çekilmiştir.)



Resim 3.8. MİK yöntemi ile biyosit dirençlilik testinin reserpin eklenerek tekrarlanması (Fotoğraf, G.Ü.Fen Fak. Mikrobiyoloji Laboratuvarında Meryem Burcu Külahcı tarafından çekilmiştir.)

3.7. Antibiyotik Direnci Gösteren Bakterilerin Tanımlanması

Antibiyotiklerden bir veya birden fazlasına dirençli olduğu belirlenen 29 *Staphylococcus* izolatı seçilerek, önce laboratuvarımızda fenotipik (biyokimyasal) (gram boyama, katalaz, oksidaz, BBL Crystal Gram pozitif kit) olarak tanımlanmıştır. Daha sonra da doğrulama amacıyla, izolatların genomik DNA izolasyonları yapılmış ve 16s rDNA bölgeleri PZR ile çoğaltılıp, agaroz jelde görüntülendikten sonra DNA dizi analizleri hizmet alımı yapılan firmalar tarafından yapılmıştır.

İzolatların genomik DNA izolasyonu:

Hizmet alımı ile 16S rDNA dizi analizi yapılacak olan izolatların genomik DNA izolasyonları laboratuvarımızda ticari (ROCHE High Pure PCR Template Preparation) kit ile yapılmış olup hemen kullanılmayacak olan DNA'lar çalışma yapılıncaya kadar -20^{o}C'de saklanmıştır. DNA izolasyonu için ticari kitin protokolü *Staphylococcus* izolatları için optimize edilmiştir.

DNA İzolasyonu:

1. Sıvı besiyerinde üremiş olan bakteri kültüründen 1500 µl alınıp eppendorf tüpe aktarılarak, 3000g de 5 dk santrifüjlenmiştir.
2. Süpernatant kısmı atılarak üzerine 300 µl fosfatlı tuz tamponu (PBS) eklenip vortekslenmiştir. Eppendorf tüp 95^{o}C'de 7 dakika inkübe edilmiştir.
3. İnkübasyon sonunda eppendorf tüpe *Staphylococcus* için 30 µl lizostafin (10 mg/ml, 50mM Tris buffer içerisinde) eklenerek 37^{o}C'de 20 dakika inkübe edilmiştir.
4. İnkübasyondan sonra 300 µl Binding Buffer ve 75 µl Proteinaz K eklenip iyice vortekslenmiş (Max hızda) ve arkasından 70^{o}C de 10 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında tekrar iyice vorteksleme yapılmıştır.
5. Daha sonra 150 µl Isopropanol eklenip, pipetaj ile iyice karıştırılmıştır.
6. Total karışım toplama tüpü (Collection Tube) üzerine oturtulmuş filtre tüplerine yüklenmiştir.
7. 1 dk 8000g de santrifüj yapılmıştır.
8. Toplama tüpü atılmış ve filtre yeni bir tüpe yerleştirilmiştir.
9. 500 µl Inhibitor Removal Buffer eklenip, 1 dk 8000g de santrifüj yapılmıştır.
10. Toplama tüpü atılıp ve filtre yeni bir tüpe yerleştirilmiştir.
11. 500 µl Wash Buffer eklenip, 1 dk 8000g de santrifüj edilmiştir.

12. Toplama tüpündeki sıvı atılıp, 500 µl Wash Buffer tekrar eklenerek 1 dk 8000g de santrifüj edilmiştir.
13. Altındaki süpernatant atılarak filtreye bir şey eklenmeden 8000g de 15 sn çevrilerek filtre tampondan uzaklaştırılmıştır.
14. Filtreler yeni 1.5 ml ependorf tüplerine yerleştirilmiştir.
15. 50 µl önceden +70^{o}C ye ısıtılmış Elution Buffer filtrelere eklenip 1 dk 8000g de santrifüj edilmiştir.
16. Toplanan DNA'nın miktarı ve kalitesi Biotek Epoch Take3 Plate cihazı ile ölçülmüştür.
17. PZR yapılmayacak ise DNA'lar -20^{o}C de saklanır. PZR başlanacak ise karışım hazırlanana kadar +4^{o}C de saklanabilir.

PZR Karışımı (Mix) Hazırlama:

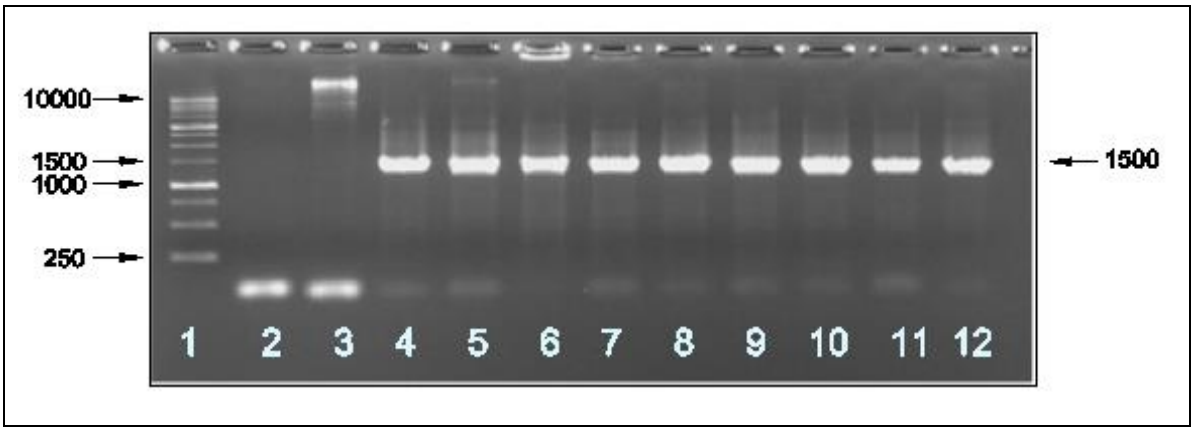
1 örnek için;
Forward Primer (1:10 Sulandırılmış/10µM): 1 µl (Çizelge 3.2, 3.3)
Reverse Primer: (1:10 Sulandırılmış/10µM): 1 µl
AptaTaq Fast PZR Master (5x): 4 µl
DNA Örnekleri: x µl (Toplam miktar 150-200 ng olacak şekilde denenebilir. Eğer 150 ng dan yüksek ise 150 ng olacak şekilde eşitleme yapılır.)
Su: 14-x µl
Toplam: 20 µl

Reaksiyon;

Denatürasyon: 95^{o}C de 60 sn (1x)
PZR: Denatürasyon 95 ^{o}C de 5 sn
Annealing/Elongation: 56^{o}C de 30 sn } (35x)
Cooling: +4^{o}C de Sonsuz.

5 µl PZR örneği + 1 µl 6x DNA boyası (Runsafe DNA staining reagent), Jele yüklenerek, 80V da markerların takibi ile yürütülmüştür (Resim 3.9).

Uygun bölgede yeterli büyüklükte (1500 bp) bant elde edildiğinde PZR ürünleri hizmet alımı yapılan firmaya ulaştırılarak, dizi analizi ile tanımlama yaptırılmıştır.



Resim 3.9. *Staphylococcus* izolatlarının 16s rDNA bölgelerin PZR ile çoğaltıldıktan sonra jel görüntüsü (1:DNA ladder, marker,2: Negatif kontrol, 3: Çoğalma olmamış örnek, 4-12:Pozitif örnekler) (Fotoğraf, G.Ü. Fen Fak. Mikrobiyoloji Laboratuvarında Meryem Burcu Külahcı tarafından çekilmiştir.)

3.8. Real Time PZR ile Antibiyotik Direnç ve Efluks Pompa Genlerinin Belirlenmesi

Real time pzr (RT-PCR) ile antibiyotik direnç ve efluks pompa genlerinin tespit edilmesi için, öncelikle hedeflenen genlerin ileri ve geri (forward ve reverse) primerleri tasarlanmıştır. Uygulanan yöntemle tasarlanamayan genlerin primer dizileri uygun literatürden alınarak sentezletilmiştir. Çizelge 3.2 ve 3.3'de belirtilen primerler elde edilip uygun olarak sulandırıldırılıp kullanıma hazır hale getirilmiştir. Deneyde Roche marka FastStart Essential DNA Green Master kit kullanılmıştır. Hedeflenen gen bölgesine ait primer çiftleri ile SYBR Green boyası kullanılarak LightCycler 96 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) cihazında çalışma yapılmıştır. Sonuçlar Abs Quant analiz modülü kullanılarak çalışmaya dahil edilen pozitif ve negatif kontrollere göre değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olark 16S rDNA primeri ile kurulmuş karışım, negatif kontrol olarak ise DNA konulmadan hazırlanmış karışım kullanılmıştır.

3.9. Hedeflenen Gen Bölgelerinin Primerlerinin Tasarlanması

Primer tasarımı, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ sitesinde yapılmıştır. Çalışma yapılacak organizma ve gen araması yapıldıktan sonra gelen sonuçlar içerisinden 'complete cds' olan, olabildiğince tüm genom sekansını içeren bölge opsiyonel seçilerek, gene ait sekansın FASTA formatı açıldıktan sonra, yeni bir sekmede http://primer3.ut.ee/ 'e gidilmiştir. FASTA formatından çoğaltılacak bölge için ortalama 800 baza kadar seçilim yapılıp, Primer3 sitesine sekans yapıştırılmıştır. Aynı sayfa içerisinde aşağıdaki kısma

hedeflenen ürün bp olarak yazıldıktan sonra Pick primers'e tıklanır, ilk gelen primer dizileri sistemin önerdiği olabilecek en iyi primerlerdir. Primer çiftinin hairpin, self-dimer & heterodimer oluşturma skorlamalarının kontrolü için https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer sitesine geçilmiştir. Ücretsiz üyelik açılır, ilk primer çifti denenir. Sırası ile hairpin, self dimer ve heterodimer denenir, burada istenen aralık deltaG'nin +2 -9 arasında çıkmasıdır. Her iki primer de (F ve R) istenen aralıklarda ise, tasarım tamamlanmıştır. Bu şekilde tasarlanamayan birkaç primerin dizileri uygun makalelerden (Patel ve ark., 2010, Swick ve ark., 2011) alınarak sentezlettirilmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.2. Çalışmamızda kullanılmak üzere tasarlanan primerler

Primer adı	Baz Dizileri	
16S	F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
	R	ACGGCTACCTTGTTACGACTT
acrB	F	ACCAAGTTCATCCACGCCTA
	R	AAAGGCTGGGCAAATGACTG
sugE	F	ACACAGTGATTGGCATGATTG
	R	GCATCCCCACAAAGAACCAA
efrA	F	GGAGCGGGACTGTTCAAATC
	R	GAATCCGTGAAGCCGAAACC
efrB	F	TCCTAGATGAGCCAGAAGAAGA
	R	GTCCCACAATCGCAACCATT
qacA/B	F	GCTGCTGTTGAAGAGTCTATGT
	R	TGCAAGCTGTTTTATCCCCG
smr	F	AGATCAGGCACCTTCAACGA
	R	GCATGGCGAAAATCCGTAGA
mdeA	F	TCCATACAATAACCCGCCGA
	R	TCGCTTTTCCATGTTGTCGC
mepA	F	TTTAGGGGCGAGAGGTGAAA
	R	TGATTGCAGTACCCAAAGCTG
norA	F	TGGGGCACTTTTCCAAATCT
	R	AGTTCAATCCGCCTGCAAAG
sepA	F	TCATGATACCTCTGACGGCA
	R	ATAAGTACGCCTGCACCCAT
bla	F	AGCAGATAAGAGTGGACAAGC
	R	GCTGTTTCGCTGACTACTTTG
mecA	F	GGCAGACAAATTGGGTGGTT
	R	TGAAGCAACCATCGTTACGG
tetK	F	TGTCTTGATTGCCCACGTTC
	R	TGCAACAGTTCACATGGACG
tetL	F	AGGAAGCAGAGTTCAGCCAT
	R	TAAGGGCACAAATCGCATCG
cat	F	TAACCTGCCCCGTTAGTTGA
	R	TTGTGCGTTGAGAAGAACCC

F: Forward, R: Reverse

Çizelge 3.3. Literatürden alınan primer dizileri

Primer adı		
norB (Patel ve ark. 2010)	F	GTAATGGTACTAATTATGATTCGTGTTGG
	R	CTGGCAAGAAAGTTAATGAAATGAGAC
norE (Swick ve ark. 2011)	F	CTGGCGGCAGCGGTAA
	R	TGCCATACAGACACCCACCATA

F: Forward, R: Reverse

3.10. Real Time PZR Reaksiyonu ve Protokolü

Bakteri izolatlarının DNA izolasyonları yapıldıktan sonra her reaksiyon kuyucuğuna eşit miktarda dna eklenebilmesi için gerekli sulandırmalar yapılmıştır. Reaksiyon için kullanılan Roche marka FastStart Essential DNA Green Master kitin kullanım kılavuzunda belirtilen protokole göre reaksiyon karışımı (mix) hazırlanmış ve cihaz (Roche, LightCycler 96, 05815916001) protokolüne uygun olarak reaksiyon cihazda yürütülmüştür. Çalışılan her gen için pozitif kontrol olarak, 16s rDNA primerleri ile reaksiyon kurularak yürütülmüştür.

3.10.1. PZR karışımı hazırlama

Primerler 10 mM olacak şekilde sulandırılarak hazırlanmıştır. Daha sonra, reaksiyon karışımı aşağıda yazıldığı gibi son hacim 20 µl olacak şekilde hazırlanmıştır.

Master Mix (2x kons.) (hazır)	10 µl
Primerler (F,R)	0,5-0,5 µl
Su	4 µl
DNA	5 µL
Toplam Hacim	20 µl

Reaksiyon karışımı hazırlanıp kuyucuklara aktarıldıktan sonra 96 kuyucuklu plakanın üzeri özel jelatin ile kapatılarak cihaza yerleştirilmiştir (Resim 3.10). Cihazın çalışma protokolü kullanılan primer çiftinin erime sıcaklığı dikkate alınarak, kullanım kılavuzunda tavsiye edildiği üzere aşağıdaki gibi düzenlenerek çalışılmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Real Time PZR cihazının çalışma protokolü

Run Editor				
Detection Format		Reaction volume (µl)		
Dyes 1: SYBR Green I		20		
Programs				
	Temp. (^{o}C)	Ramp (^{o}C/s)	Duration	Acquisition
Pre-Incubation	95	4.4	600	None
3-step Amplification	No of cycles:45			
	95	4.4		None
	58	2.2	10	None
	72	4.4	10	Single
Melting	95	4.4	10	None
	65	2.2	60	None
	97	0.1	1	5 Readings/



Resim 3.10. Real Time PZR çalışma plağı (Fotoğraf, G.Ü.Fen Fak. Mikrobiyoloji Laboratuvarında Meryem Burcu Külahcı tarafından çekilmiştir.)

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Kasım 2016 – Mayıs 2017 tarihleri arasında, Ankara'nın çeşitli market, mandıra ve pazarlarında satışa sunulan 13 çiğ süt, 60 peynir, 18 çiğ tavuk ve 41 et (kıyma, kuşbaşı) olmak üzere toplam 132 gıda örneği materyal olarak kullanılmış ve 77 *Staphylococcus* elde edilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Gıda örneklerinden izole edilen *Staphylococcus*'ların, izole edildikleri materyallere göre dağılımları

Gıda örnek adı	Çalışılan örnek sayısı	*Staphylococcus*	
		İzolat sayısı	%
Peynir	60	51	66.2
Çiğ Süt	13	16	20.8
Tavuk	18	5	6.5
Et	41	5	6.5
TOPLAM	132	77	100

İzole edilen *Staphylococcus*'ların antibiyotik dirençleri Kirby-Bauer disk difüzyon ve MİK yöntemleri ile (Çizelge 4.2, Çizelge 4.3, Çizelge 4.4), biyosidal maddelere olan duyarlılıkları ise MİK yöntemi ile tespit edilmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.2. *Staphylococcus* izolatlarının disk difüzyon ve MİK yöntemleriyle elde edilen antibiyotik direnç sayı ve yüzdeleri

Staphylococcus (n=77)	Çalışılan Antibiyotik İsimleri									
	AM	E	TE	CIP	C	CN	CXM	F	CFQ	ENO
Disk difüzyon	13 (%16,9)	2 (%2,6)	19 (%24,7)	0	3 (%3,9)	0	31 (%40,3)	2 (%2,6)	3 (%3,9)	0
MİK	4 (%5,2)	0	18 (%23,4)	0	3 (%3,9)	0	11 (%14,3)	2 (%2,6)	0	0

AM:Ampisilin, E:Eritromisin, TE: Tetrasiklin, CIP:Siproflaksasin, C:Kloramfenikol, CN:Gentamisin, CXM:Sefuroksim, F:Nitrofurantoin, CFQ:Sefkuinom, ENO:Enrofloksasin)

Staphylococcus izolatlarında en yüksek antibiyotik direnci beta laktam grubundan sefuroksim ve ampisilinde belirlenmiştir. Sonraki en yüksek direnç tetrasiklinde gözlenmiştir. MİK yönteminde disk difüzyona göre daha az dirençli izolat tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3. İzolatların disk difüzyon ve mik yöntemi ile çoklu direnç oranları

Staphylococcus (n=77)	Tek antibiyotiğe direnç	İki antibiyotiğe direnç	Üç antibiyotiğe direnç	TOPLAM
Disk difüzyon	28 (%59.6)	16 (%34)	3 (%6.4)	47 (%61)
MİK	20 (%69)	9 (%31)	0	29 (%37.7)

Çizelge 4.4. İzolatların disk difüzyon ve MİK yöntemlerine göre antibiyotik dirençleri

No	Bakteri Kodu	Disk Difüzyon Yöntemine Göre Antibiyotik Dirençliliği	Dirençli olduğu antibiyotik sayısı	MİK Yöntemine Göre Antibiyotik Dirençliliği	Dirençli olduğu antibiyotik sayısı
1	S1-1	AM	1		
2	P49-2	AM,CXM	2	CXM	1
3	P24-1	AM,CXM,TE	3	CXM,TE	2
4	P2-2	AM,CXM	2	CXM	1
5	S12-1	AM	1	AM	1
6	P23-1	AM,CXM,TE	3	CXM,TE	2
7	P20-1	AM,CXM	2	CXM	1
8	S11-1	AM	1	AM	1
9	P36-3	AM,CXM	2	AM,CXM	2
10	S3-1	AM,CXM	2	AM,CXM	2
11	S13-3	AM,E	2		
12	ES-14	AM,CXM,TE,E	3	CXM	1
13	K11-1	CXM,TE	2	CXM,TE	2
14	ES-18	TE,C	2	TE,C	2
15	ES-20	CXM,TE	2	TE	1
16	P49-3	CXM,TE	2	CXM, TE	2
17	ES-15	TE	1	TE	1
18	T1-1	AM,TE	2	TE	1
19	S4-2	TE	1	TE	1
20	K6-1	TE	1	TE	1
21	ES-11	TE	1	TE	1
22	ES-8	TE,C	2	TE,C	2
23	K5-1	CXM,TE	2	TE	1
24	ES-9	TE	1	TE	1
25	T18-1	TE	1	TE	1
26	S6-1	CXM,TE	2	TE	1
27	P2-1	CXM,TE	2	TE	1
28	K10-2	TE	1	TE	1
29	ES-17	CXM	1		
30	P21-1	CXM	1		
31	P10-1	CXM	1		
32	ES-7	CXM	1		
33	ES-2	CXM	1		
34	ES-21	CXM	1		
35	P3-1	CXM	1		
36	S7-2	CXM	1		
37	P4-3	CXM	1		
38	ES-19	CXM	1		
39	ES-13	CXM	1		
40	ES-5	CXM	1		
41	P44-1	CXM	1	CXM	1
42	P14-1	CXM	1		
43	P47-2	CXM	1		
44	P43-1	CXM	1		
45	ES-6	CXM	1		
46	S8-1	F	1	F	1
47	P46-1	C,F	2	C,F	2

AM:Ampisilin, E:Eritromisin, TE: Tetrasiklin, CIP:Siproflaksasin, C:Kloramfenikol, CN:Gentamisin, CXM:Sefuroksim, F:Nitrofurantoin)

Antibiyotik dirençli olarak tespit edilen *Staphylococcus* izolatlarının tür tanımlamaları BBL Crystal Identification System Gram-Positive ID Kit ile yapılmıştır (Çizelge 4.5). 7 izolat bu kit ile adlandırılamamış, izolatlardan biri *Enterococcus faecium*, biri de *Micrococcus luteus* olarak adlandırılmıştır.

Çizelge 4.5. BBL Crystal Identification System Gram-Positive ID Kit ile adlandırılan antibiyotik dirençli izolatların tür dağılımı

Sıra No	İzolat No	*Staphylococcus*
1	P49-2	*S.saprophyticus*
2	P24-1	*S.saprophyticus*
3	P2-2	*S.saprophyticus*
4	S12-1	-
5	P23-1	*S.saprophyticus*
6	P20-1	*S.haemolyticus*
7	S11-1	*E. faecalis*
8	P36-3	*M.luteus*
9	S3-1	*S.aureus*
10	ES-14	*S. vitulinus*
11	K11-1	*S.saprophyticus*
12	ES-18	-
13	ES-20	*E. faecium*
14	P49-3	*S.saprophyticus*
15	ES-15	-
16	T1-1	*S.warneri*
17	S4-2	*S.aureus*
18	K6-1	*S.saprophyticus*
19	ES-11	-
20	ES-8	-
21	K5-1	*S.saprophyticus*
22	ES-9	-
23	T18-1	-
24	S6-1	*S.aureus*
25	S6-1	*S.aureus*
26	P2-1	*S.saprophyticus*
27	P44-1	*S.saprophyticus*
28	S8-1	*S.saprophyticus*
29	P46-1	*S.saprophyticus*

-:Kit ile adlandırılamayan izolatlar

Çizelge 4.6. İzolatların adlandırılması ve biyosit MİK değerleri

Sıra No	Bakteri Kodu	Bakteri Adı (*Staphylococcus*)	SC		HC (µg/ml)	CH (µg/ml)	T (µg/ml)	PI		BC (µg/ml
1	P49-2	*S.saprophyticus*	12500	µg/ml	H	0.5	H	12500	mg/l	0,5
2	P24-1	*S.saprophyticus*	12500	µg/ml	H	0.5	H	3125	mg/l	H
3	P2-2	*S.saprophyticus*	25	mg/ml	H	0.5	8	12500	mg/l	4
4	S12-1	- (Adlandırılamadı)	781	µg/ml	H	0.5	1	6250	mg/l	H
5	P23-1	*S.saprophyticus*	391	µg/ml	H	2	2	6250	mg/l	H
6	P20-1	*S.haemolyticus*	391	µg/ml	H	0.5	1	6250	mg/l	4
7	S11-1	*E. faecalis*	1563	µg/ml	H	0.5	1	6250	mg/l	H
8	P36-3	*M.luteus*	1563	µg/ml	H	1	1	12500	mg/l	4
9	S3-1	*S.aureus*	781	µg/ml	H	2	2	50	gr/l	1
10	ES-14	*S. vitulinus*	781	µg/ml	H	1	1	12500	mg/l	1
11	K11-1	*S.saprophyticus*	391	µg/ml	>512	1	>512	6250	mg/l	0,5
12	ES-18	- (Adlandırılamadı)	781	µg/ml	H	1	>512	6250	mg/l	2
13	ES-20	*E. faecium*	391	µg/ml	H	1	>512	6250	mg/l	0,5
14	P49-3	*S.saprophyticus*	12500	µg/ml	H	0.5	>512	25	gr/l	128
15	ES-15	- (Adlandırılamadı)	781	µg/ml	H	1	>512	50	gr/l	1
16	T1-1	*S.warneri*	1563	µg/ml	H	0.5	H	50	gr/l	H
17	S4-2	*S.aureus*	12500	µg/ml	H	1	2	12500	mg/l	H
18	K6-1	*S.saprophyticus*	781	µg/ml	H	H	2	12500	mg/l	H
19	ES-11	- (Adlandırılamadı)	25	mg/ml	H	32	128	50	gr/l	0,5
20	ES-8	- (Adlandırılamadı)	781	µg/ml	H	1	H	50	gr/l	1
21	K5-1	*S.saprophyticus*	391	µg/ml	H	0.5	H	6250	mg/l	H
22	ES-9	- (Adlandırılamadı)	H		H	1	128	50	gr/l	1
23	T18-1	- (Adlandırılamadı)	195	µg/ml	H	H	H	3125	mg/l	H
24	S6-1	*S.aureus*	25	mg/ml	H	H	H	12500	mg/l	H
25	S6-1	*S.aureus*	781	µg/ml	H	4	H	6250	mg/l	H
26	P2-1	*S.saprophyticus*	781	µg/ml	H	1	H	H		H
27	P44-1	*S.saprophyticus*	391	µg/ml	H	0.5	H	12500	mg/l	H
28	S8-1	*S.saprophyticus*	781	µg/ml	H	0.5	H	6250	mg/l	4
29	P46-1	*S.saprophyticus*	12500	µg/ml	H	1	16	6250	mg/l	H

SC: Sodyum hipoklorit, HC: Hekzaklorofen, CH: Klorhekzidin, T:Triklosan, PI:Povidon iyodin, BC: Benzalkonyum klorit H:Hassas.

Çizelge 4.7. Biyositlerin izolatlar üzerinde gösterdikleri minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değer aralıkları

Biyosit	MİK Değer Aralığı		
	512-64 µg/ml	32-4 µg/ml	2-0,25 µg/ml
Benzalkonyum Klorit	1	4	10
Hekzaklorofen	1	-	-
Klorhekzidin	-	2	24
Triklosan	7	2	9
	50-6250	3125-391	195-25
Sodyum Hipoklorit (mg/ml- µg/ml)	8	19	1
Povidon İyodin (g/l- mg/l)	26	2	-

Test edilen her bir biyositin 12 farklı konsantrasyonu test edilmiş ve konsantrasyonlar üç gruba ayrılarak MİK değeri o grupta belirlenen izolat sayıları Çizelge 4.7'de belirtilmiştir. İlk grupta biyositlerin yüksek konsantrasyonları, ikincide orta konsantrasyonlar, son grupta ise düşük konsantrasyonlar bulunmaktadır.

Çizelge 4.8. MİK yöntemine göre antibiyotik dirençli bulunan izolatların rezerpin eklenerek tekrarlanan deney sonucundaki MİK değerleri

Sıra No	Kodu	Adı (*Staphylococcus*)	AM*	rAM*	TE*	rTE*	C*	rC*	CXM*	rCXM*	F*	rF*
1	P49-2	*S.saprophyticus*							512	128		
2	P24-1	*S.saprophyticus*			64	64			512	2		
3	P2-2	*S.saprophyticus*							512	2		
4	S12-1	(Adlandırılamadı)	2	1								
5	P23-1	*S.saprophyticus*			256	64			512	4		
6	P20-1	*S.haemolyticus*							256	4		
7	S11-1	*E. faecalis*	2	2								
8	P36-3	*M.luteus*	4	1					256	64		
9	S3-1	*S.aureus*	512	512					512	2		
10	ES-14	*S. vitulinus*							512	1		
11	K11-1	*S.saprophyticus*			512	128			128	2		
12	ES-18	(Adlandırılamadı)			512	128	16	32				
13	ES-20	*E. faecium*			128	128						
14	P49-3	*S.saprophyticus*			512	256			512	4		
15	ES-15	(Adlandırılamadı)			128	512						
16	T1-1	*S.warneri*			128	64						
17	S4-2	*S.aureus*			512	256						
18	K6-1	*S.saprophyticus*			512	64						
19	ES-11	(Adlandırılamadı)			128	512						
20	ES-8	(Adlandırılamadı)			64	64	4	128				
21	K5-1	*S.saprophyticus*			512	128						
22	ES-9	(Adlandırılamadı)			64	16						
23	T18-1	(Adlandırılamadı)			32	64						
24	S6-1	*S.aureus*										
25	S6-1	*S.aureus*			64	64						
26	P2-1	*S.saprophyticus*			128	128						
27	P44-1	*S.saprophyticus*							256	2		
28	S8-1	*S.saprophyticus*									64	1
29	P46-1	*S.saprophyticus*					4	128			512	3

AM:Ampisilin, TE: Tetrasiklin, C:Kloramfenikol, CXM:Sefuroksim, F:Nitrofurantoin, * µg/ml

Araştırmamızda efluks pompa inhibitörü olan rezerpinin MİK değerini 4 kat veya daha fazla düşürmesinin, efluks pompa inhibitörü olarak etkin olduğunu gösterdiği kabul edilmiştir (Gibbons ve Udo, 2000).

Çizelge 4.9. Rezerpin eklenerek tekrarlanan deney sonucunda antibiyotik MİK değeri 4 kat ve daha fazla azalan izolat sayıları

Antibiyotikler	AM*	rAM*	TE*	rTE*	CXM*	rCXM*	F*	rF*
Staphylococcus (n=29) (%)	4	1 (%25)	18	5 (%27,8)	11	11 (%100)	2	2 (%100)

(AM:Ampisilin, TE:Tetrasiklin, CXM:Sefuroksim, F:Nitrofurantoin, r:Rezerpinli, * µg/ml)

Çizelge 4.8 ve 4.9'da izolatların antibiyotiklere gösterdikleri MİK değerlerinin ortamda 0,01 mg/ml oranında rezerpin varlığındaki test sonuçları belirtilmiştir. Rezerpinin sefuroksim ve nitrofurantoin antibiyotik dirençlerini %100 oranında, ampisilin ve tetrasiklinde ise sırasıyla %25 ve %27,8 oranlarında 4 kat ve daha fazla azalttığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.10. İzolatların rezerpin eklenerek tekrarlanan biyosit MİK değerleri

Sıra No	Adı (*Staphylococcus*)	SC*	rSC*	HC*	rHC*	CH*	rCH*	T*	rT*	PI**	rPI**	BC*	rBC*
1	*S.saprophyticus*	12500	25000	H	H	0.5	H	H	H	12500	25000	0,5	H
2	*S.saprophyticus*	12500	781	H	H	0.5	H	H	H	3125	6250	H	H
3	*S.saprophyticus*	25000	50000	H	H	0.5	H	8	4	12500	12500	4	4
4	*Macrococcus caseolyticus*	781	1563	H	H	0.5	H	1	H	6250	12500	H	H
5	*S.aureus*	391	391	H	H	2	H	2	H	6250	6250	H	H
6	*S.saprophyticus*	391	195	H	H	0.5	H	1	H	6250	6250	4	H
7	*E. faecalis*	1563	781	H	H	0.5	H	1	H	6250	3125	H	H
8	*Macrococcus caseolyticus*	1563	25000	H	H	1	H	1	H	12500	12500	4	16
9	*S.aureus*	781	1563	H	H	2	H	2	1	50000	12500	1	H
10	*S. condimenti*	781	3125	H	H	1	H	1	H	12500	3125	1	H
11	*S.xylosus*	391	781	512	H	1	H	512	H	6250	98	0,5	H
12	*S.succinus*	781	50000	H	H	1	H	512	32	6250	6250	2	16
13	*S.saprophyticus*	391	1563	H	H	1	H	512	H	6250	391	0,5	H
14	*S.saprophyticus*	12500	12500	H	H	0.5	H	512	4	25000	50000	128	8
15	*S.succinus*	781	50000	H	H	1	H	512	16	50000	50000	1	H
16	*S. pasteuri*	1563	50000	H	H	0.5	H	H	H	50000	12500	H	H
17	*S.aureus*	12500	50000	H	H	1	H	2	16	12500	12500	H	H
18	*S.saprophyticus*	781	25000	H	H	D	H	2	1	12500	6250	H	H
19	*Staphylococcus succinus*	25000	50000	H	H	32	H	128	16	50000	6250	0,5	H
20	*S.succinus*	781	25000	H	H	1	H	H	H	50000	50000	1	H
21	*S.saprophyticus*	391	781	H	H	0.5	H	H	H	6250	1563	H	H
22	*S.succinus*	H	H	H	H	1	H	128	512	50000	50000	1	H
23	*S.aureus*	195	391	H	H	H	H	H	H	3125	D	H	H
24	*S.aureus*	25000	1563	H	H	H	H	H	H	12500	1563	H	H
25	*S.aureus*	781	50000	H	H	4	H	H	H	6250	6250	H	H
26	*S.saprophyticus*	781	1563	H	H	1	H	H	H	H	H	H	H
27	*S.xylosus*	391	50000	H	H	0.5	H	H	H	12500	12500	H	H
28	*S.saprophyticus*	781	H	H	H	0.5	H	H	H	6250	1563	4	4
29	*S.xylosus*	12500	H	H	H	1	H	16	8	6250	6250	H	H

SC: Sodyum hipoklorit, HC: Hekzaklorofen, CH: Klorhekzidin, T:Triklosan, PI:Povidon iyodin, BC: Benzalkonyum klorit, H:Hassas, r: rezerpinli, * µg/ml, ** mg/l

Çizelge 4.10'da izolatların rezerpin eklenmeden önce ve sonra gösterdikleri MİK değerleri verilmiştir. Çizelge 4.11'e göre, rezerpin en çok povidon iyodin ve triklosanda MİK değerlerini 4 kat ve daha fazla azaltmıştır.

Çizelge 4.11. Rezerpin eklenerek tekrarlanan deney sonucunda biyosit MİK değeri 4 kat ve daha fazla azalan izolat sayıları

Biyositler	rSC	rHC	rCH	rT	rPI	rBC
Staphylococcus (n=29)	4 (%13,8)	1 (%3,4)	2 (%6,9)	6 (%20,7)	10 (%34,5)	2 (%6,9)

(SC: Sodyum hipoklorit, HC: Hekzaklorofen, CH: Klorhekzidin, T:Triklosan, PI:Povidon iyodin, BC: Benzalkonyum klorit, r:Rezerpinli)

Araştırmamızda bir veya daha fazla antibiyotiğe direnç gösteren, BBL Crystal bakteri tanımlama kiti ile tür tanımlamaları yapılan Gram pozitif bakteri izolatlarının 16S rDNA gen bölgeleri PZR yöntemi ile çoğaltılmıştır. Jelde yürütülüp kontrol edilen DNA örnekleri firmaya gönderilerek DNA dizi analizi sonuçları temin edilmiş, diziler BLAST programı kullanılarak karşılaştırılmış ve yüzde olarak en çok homoloji görülen tür adı doğru kabul edilmiştir (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12. İzolatların BBL Crystal bakteri tanımlama kiti ve 16S rDNA dizi analizi ile tanımlama sonuçları

Sıra No	İzolat Kodu	Bakteri Türü (*BBL Crystal*)	Bakteri Türü (16S dizi analizi)
1	P49-2	*S.saprophyticus*	*S.saprophyticus*
2	P24-1	*S.saprophyticus*	*S.saprophyticus*
3	P2-2	*S.saprophyticus*	*S.saprophyticus*
4	S12-1	*(Adlandırılamadı)*	*Macrococcus caseolyticus*
5	P23-1	*S.saprophyticus*	*S.aureus*
6	P20-1	*S.haemolyticus*	*S.saprophyticus*
7	S11-1	*E. faecalis*	*E. faecalis*
8	P36-3	*M.luteus*	*Macrococcus caseolyticus*
9	S3-1	*S.aureus*	*S.aureus*
10	ES-14	*S. vitulinus*	*S. condimenti*
11	K11-1	*S.saprophyticus*	*S.xylosus*
12	ES-18	*(Adlandırılamadı)*	*S.succinus*
13	ES-20	*E. faecium*	*S.saprophyticus*
14	P49-3	*S.saprophyticus*	*S.saprophyticus*
15	ES-15	*(Adlandırılamadı)*	*S.succinus*
16	T1-1	*S.warneri*	*S. pasteuri*
17	S4-2	*S.aureus*	*S.aureus*
18	K6-1	*S.saprophyticus*	*S.saprophyticus*
19	ES-11	*(Adlandırılamadı)*	*Staphylococcus succinus subsp. casei*
20	ES-8	*(Adlandırılamadı)*	*S.succinus*
21	K5-1	*S.saprophyticus*	*S.saprophyticus*
22	ES-9	*(Adlandırılamadı)*	*S.succinus*
23	T18-1	*(Adlandırılamadı)*	*S.aureus*
24	S6-1	*S.aureus*	*S.aureus*
25	S6-1	*S.aureus*	*S.aureus*
26	P2-1	*S.saprophyticus*	*S.saprophyticus*
27	P44-1	*S.saprophyticus*	*S.xylosus*
28	S8-1	*S.saprophyticus*	*S.saprophyticus*
29	P46-1	*S.saprophyticus*	*S.xylosus*

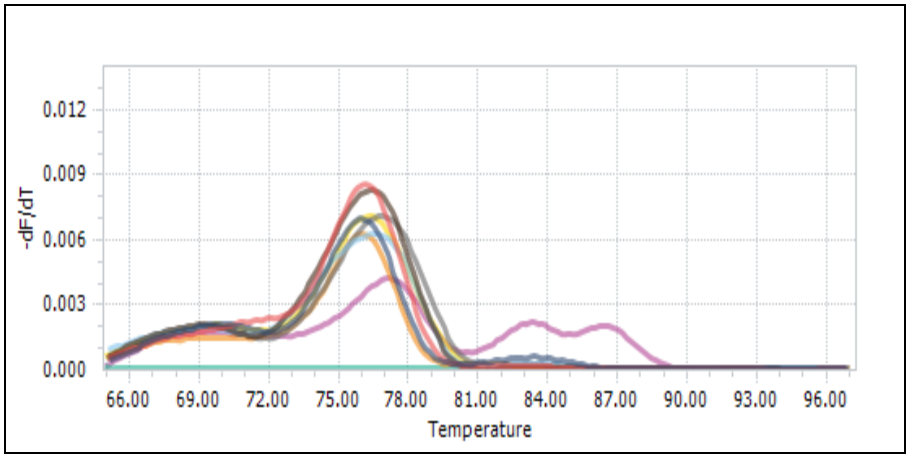
Çizelge 4.13. İzolatların 16S rDNA dizi analizi ile tanımlama sonuçları

Sıra No	İzolat	16S rRNA Analiz Sonucu	Karşılaştırılan Baz Sayısı	(%) Benzerlik
1	P49-2	*S.saprophyticus*	1544	%97
2	P24-1	*S.saprophyticus*	1530	%99
3	P2-2	*S.saprophyticus*	1330	%99
4	S12-1	*Macrococcus caseolyticus*	909	%99
5	P23-1	*S.aureus*	197	%97
6	P20-1	*S.saprophyticus*	1330	%99
7	S11-1	*E. faecalis*	1059	%95
8	P36-3	*Macrococcus caseolyticus*	1306	%99
9	S3-1	*S.aureus*	1602	%98
10	ES-14	*S. condimenti*	952	%97
11	K11-1	*S.xylosus*	1317	%97
12	ES-18	*S.succinus*	1540	%99
13	ES-20	*S.saprophyticus*	1312	%97
14	P49-3	*S.saprophyticus*	1542	%98
15	ES-15	*S.succinus*	1580	%99
16	T1-1	*S. pasteuri*	1321	%99
17	S4-2	*S.aureus*	1588	%99
18	K6-1	*S.saprophyticus*	1530	%98
19	ES-11	*Staphylococcus succinus subsp. casei*	1589	%99
20	ES-8	*S.succinus*	243	%94
21	K5-1	*S.saprophyticus*	1314	%99
22	ES-9	*S.succinus*	1480	%98
23	T18-1	*S.aureus*	256	%88
24	S6-1	*S.aureus*	1618	%98
25	S6-1	*S.aureus*	1620	%99
26	P2-1	*S.saprophyticus*	1542	%98
27	P44-1	*S.xylosus*	1315	%97
28	S8-1	*S.saprophyticus*	1528	%98
29	P46-1	*S.xylosus*	1620	%98

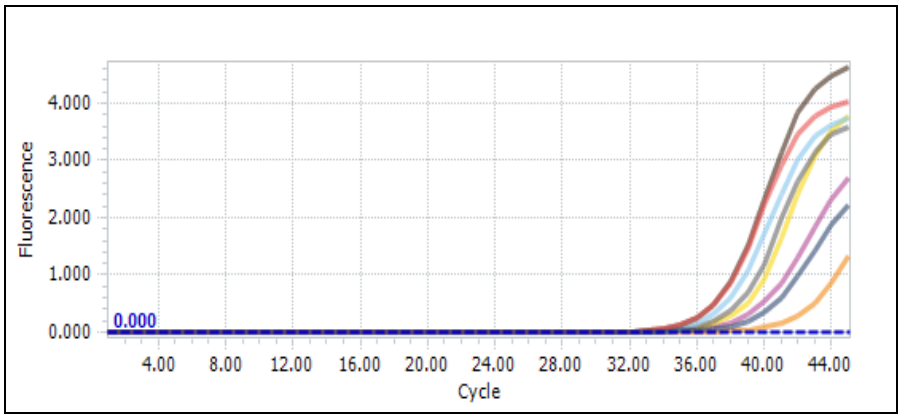
Çizelge 4.12 ve 4.13'deki sonuçlarımıza göre, *Staphylococcus* izolatlarının 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına bakıldığında çalışılan 29 izolatın 13'ünde BBL Crystal bakteri tanımlama kiti ile aynı sonuç alındığı, 8 izolatta tür olarak farklı sonuç elde edildiği, kit ile adlandırılamayan izolatların 6'sının *Staphylococcus* türleri, birinin ise *Macrococcus caseolyticus*, 1 izolatın ise kit ile aynı sonuç vererek *E. faecalis* olarak adlandırıldığı görülmektedir.

Real time çalışmasının sonuçlarının değerlendirilmesi, amplifikasyon eğrileri, Tm (erime sıcaklığı) analizi grafikleri ve absolute quantification (cq) değerlerinin her biri dikkate alınarak, primerlerin doğru yere bağlanıp bağlanmadıkları kontrol edilerek yapılmıştır. Aşağıda örnek olarak bla geninin tek bir plağının Tm (erime sıcaklığı) analizi grafiği (Resim 4.1), amplifikasyon eğrilerinin olduğu grafik (Resim 4.2), ve absolute

quantification (cq) değerlerinin olduğu tablo (Çizelge 4.15) verilmiştir. Çizelge 4.15'de kırmızı olarak belirtilen örneklerin sonuçları pozitif olarak değerlendirilmiştir.



Resim 4.1. bla (beta laktamaz) geni Tm analiz tablosu

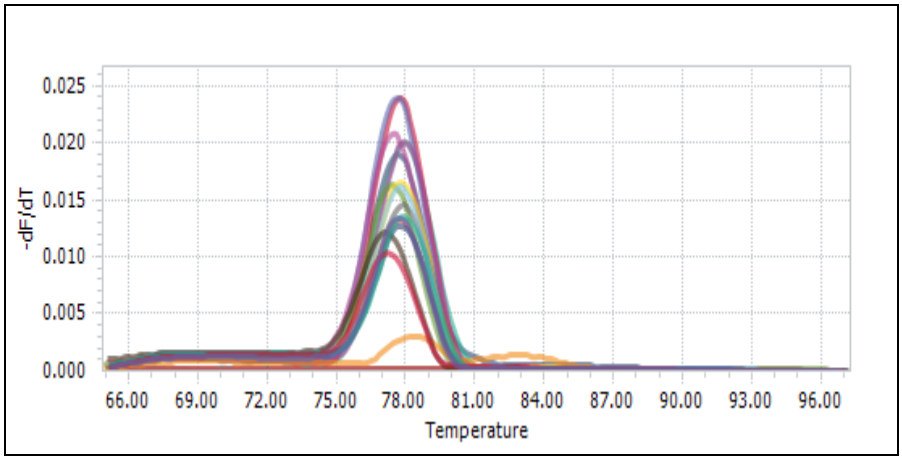


Resim 4.2. bla (beta laktamaz) geni amplifikasyon eğrileri

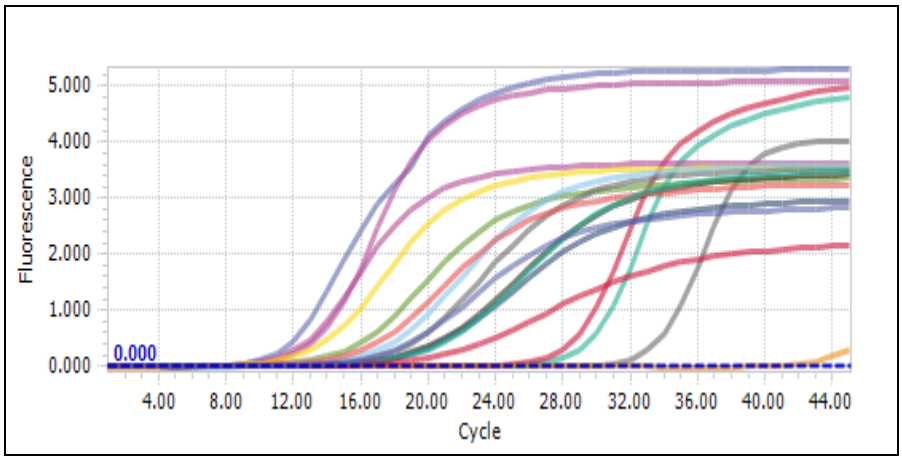
Çizelge 4.14. bla (beta laktamaz) geni qPCR sonucu, örnek bir plak sonucu

Örnek Adı	Gen Adı	Cq	Sonuç	Boya
12	Bla	41.45	Positive	SYBR Green I
19	Bla	39.81	Positive	SYBR Green I
20	Bla	42.87	Positive	SYBR Green I
23	Bla	36.72	Positive	SYBR Green I
25	Bla	41.32	Positive	SYBR Green I
90	Bla	42.29	Positive	SYBR Green I
94	Bla	37.72	Positive	SYBR Green I
95	Bla	-	Negative	SYBR Green I
8	Bla	35.88	Positive	SYBR Green I
9	Bla	35.82	Positive	SYBR Green I
37	Bla	36.45	Positive	SYBR Green I
43	Bla	37.20	Positive	SYBR Green I
72	Bla	37.66	Positive	SYBR Green I
Negatif kontrol	Bla	-	Negative	SYBR Green I
Pozitif kontrol	16s	38.31	Positive	SYBR Green I

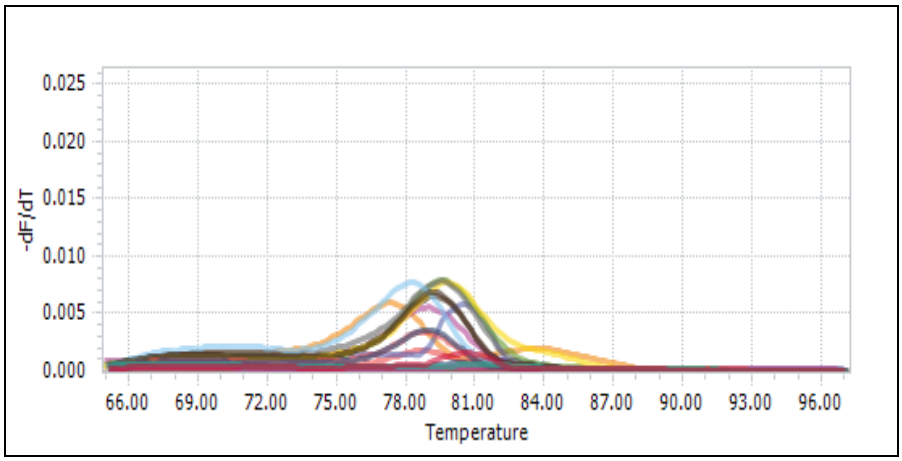
Araştırmamızda çalışılan tetrasiklin direnç (tetK, tetL), metisilin direnç (mecA) ve efluks pompa (qacA/B, acrB, norE, sugE, smr, efrA, efrB, mdeA, mepA, norA, norB, sepA) genlerinin Tm analizi grafikleri ve amplifikasyon eğrileri verilmiştir (Resim 4.3-4.32).



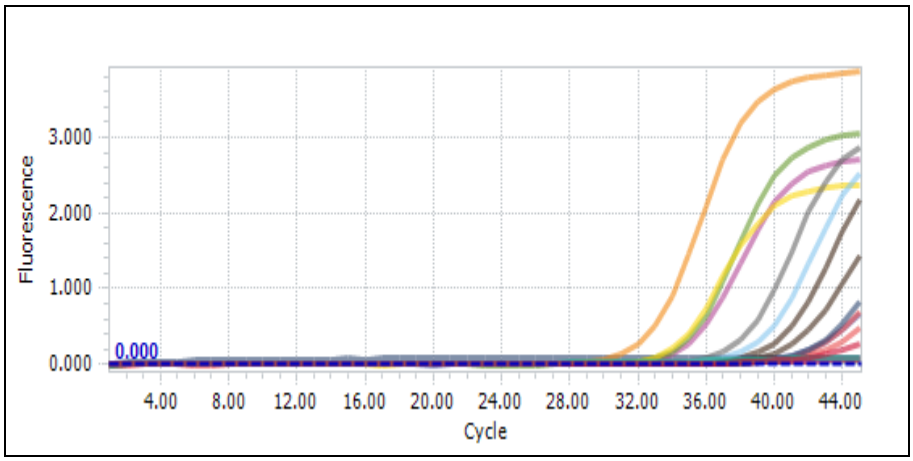
Resim 4.3. tetK (tetrasiklin direnç) geni Tm analiz tablosu



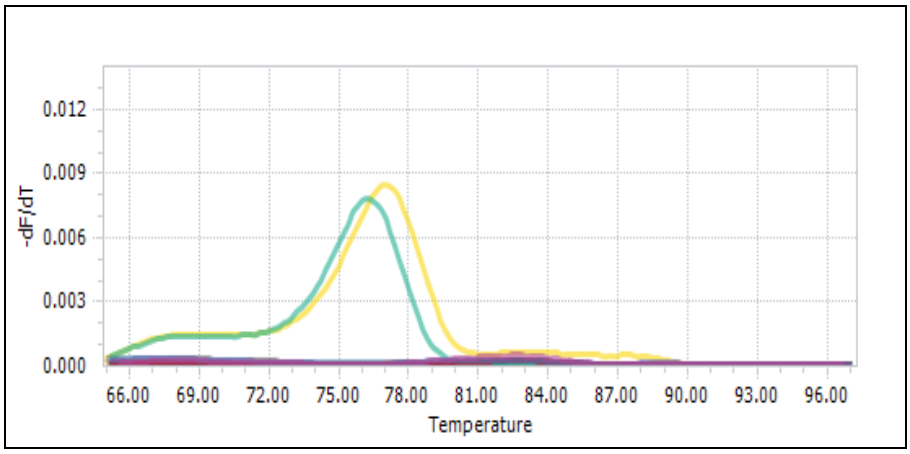
Resim 4.4. tetK (tetrasiklin direnç) geni amplifikasyon eğrileri



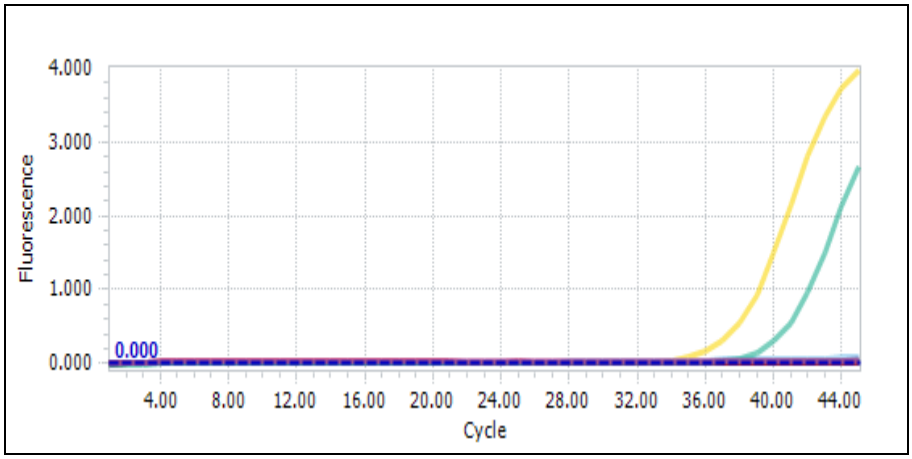
Resim 4.5. tetL (tetrasiklin direnç) geni Tm analiz tablosu



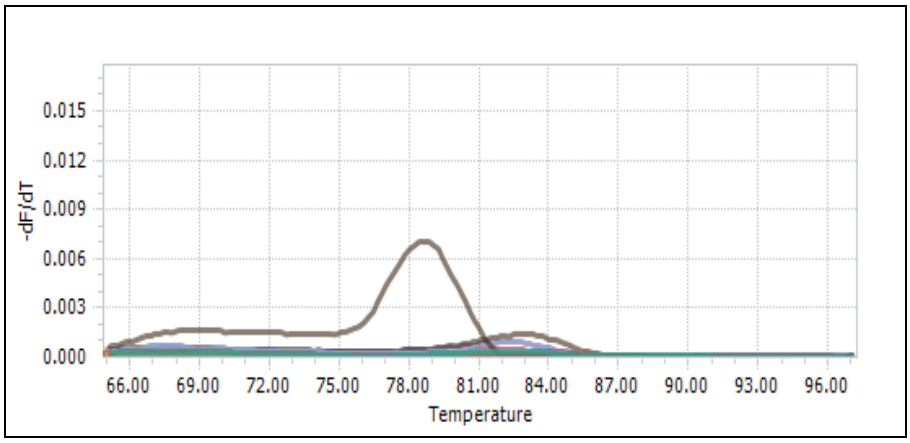
Resim 4.6. tetL (tetrasiklin direnç) geni amplifikasyon eğrileri



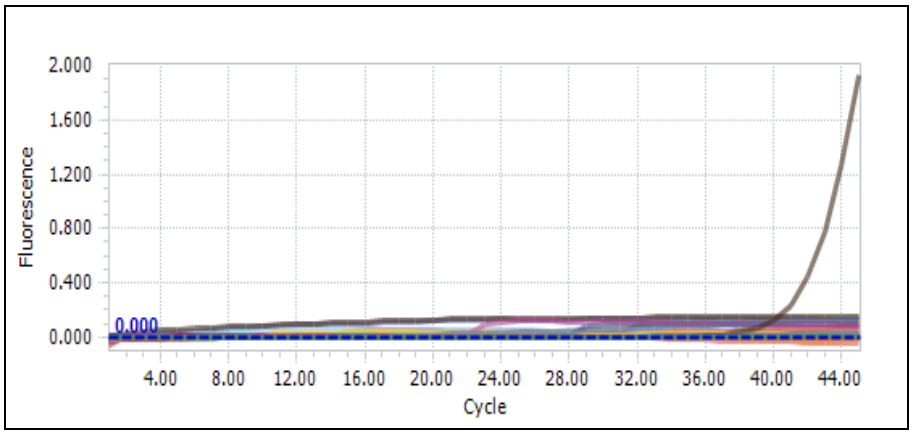
Resim 4.7. mecA (metisilin direnç) geni Tm analiz tablosu



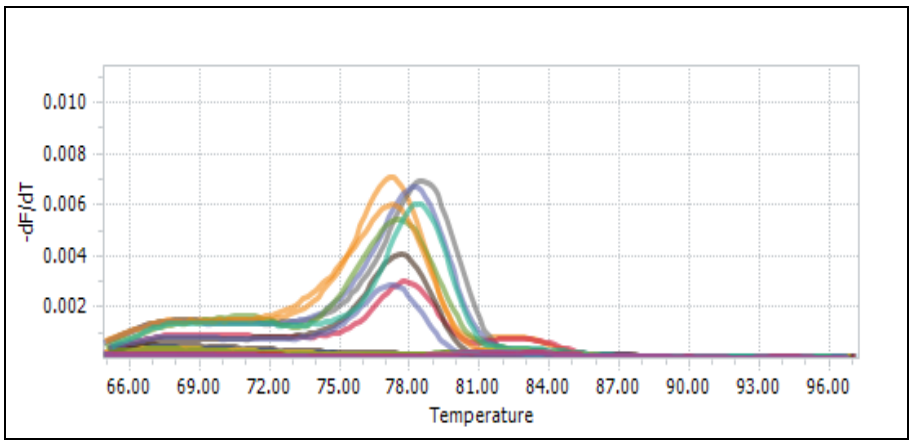
Resim 4.8. mecA (metisilin direnç) geni amplifikasyon eğrileri



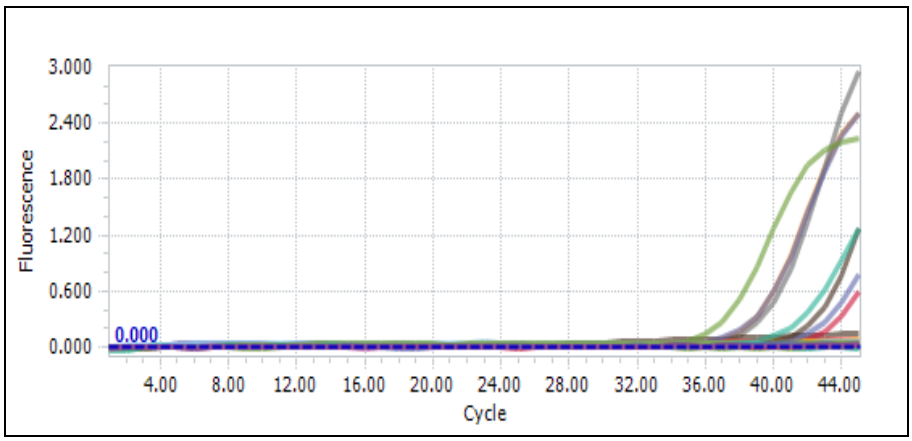
Resim 4.9. qacA/B (efluks pompa) geni Tm analiz tablosu



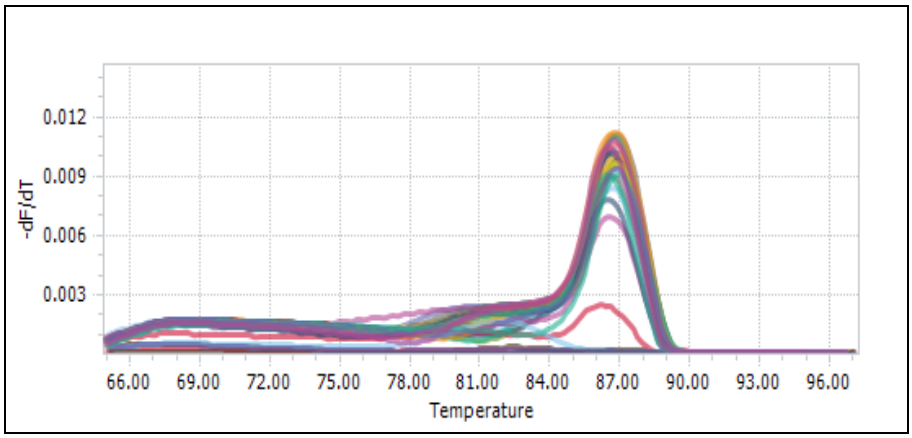
Resim 4.10. qacA/B (efluks pompa) geni amplifikasyon eğrileri



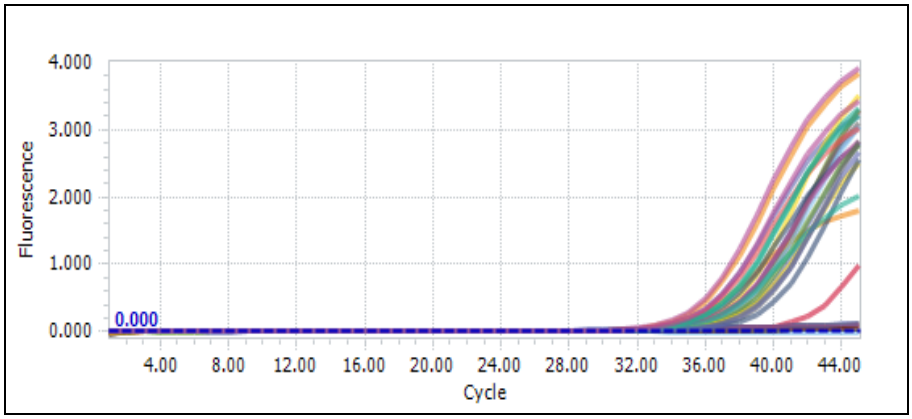
Resim 4.11. acrB (efluks pompa) geni Tm analiz tablosu



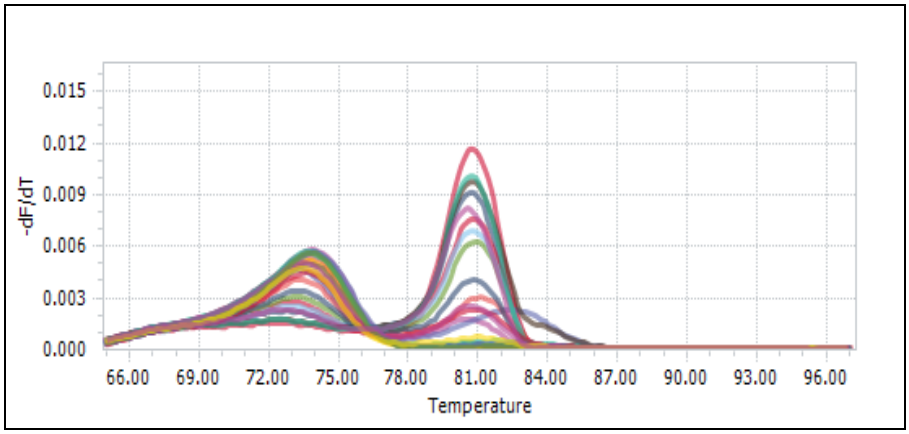
Resim 4.12. acrB (efluks pompa) geni amplifikasyon eğrileri



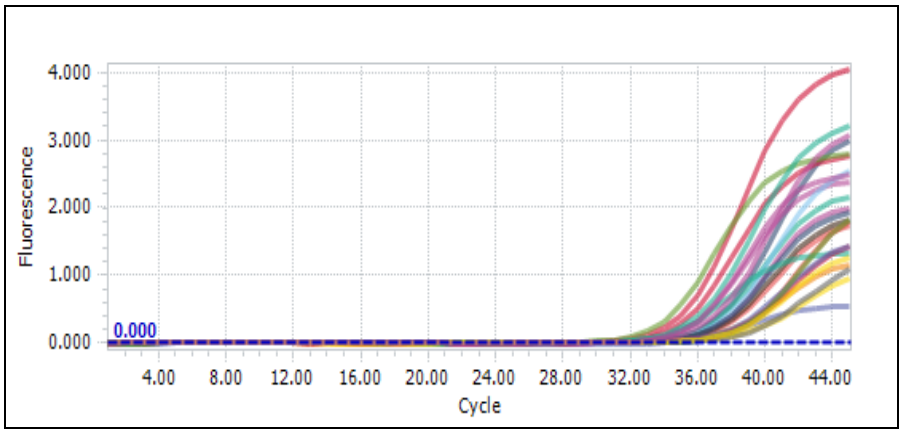
Resim 4.13. norE (efluks pompa) geni Tm analiz tablosu



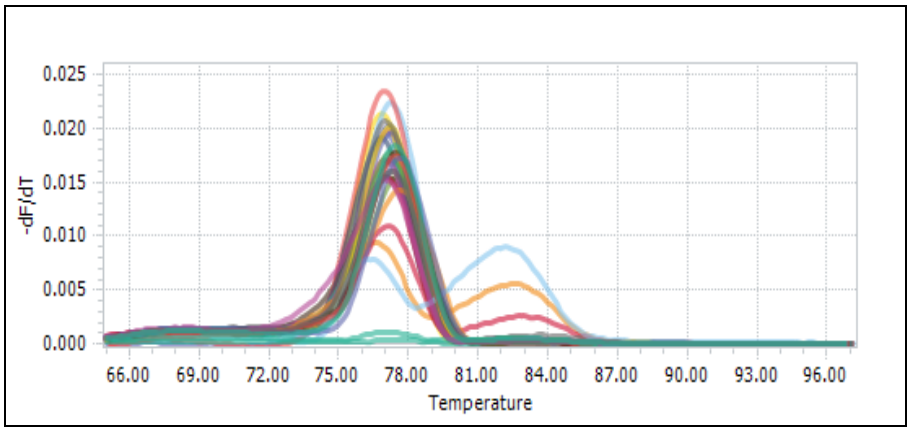
Resim 4.14. norE (efluks pompa) geni amplifikasyon eğrileri



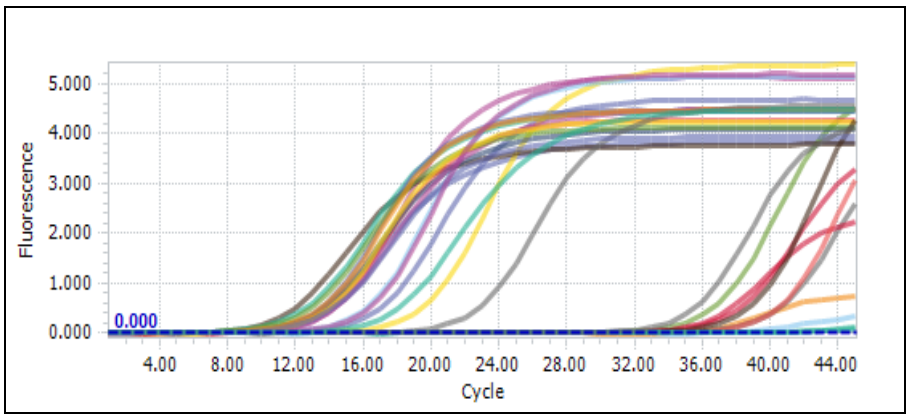
Resim 4.15. sugE (efluks pompa) geni Tm analiz tablosu



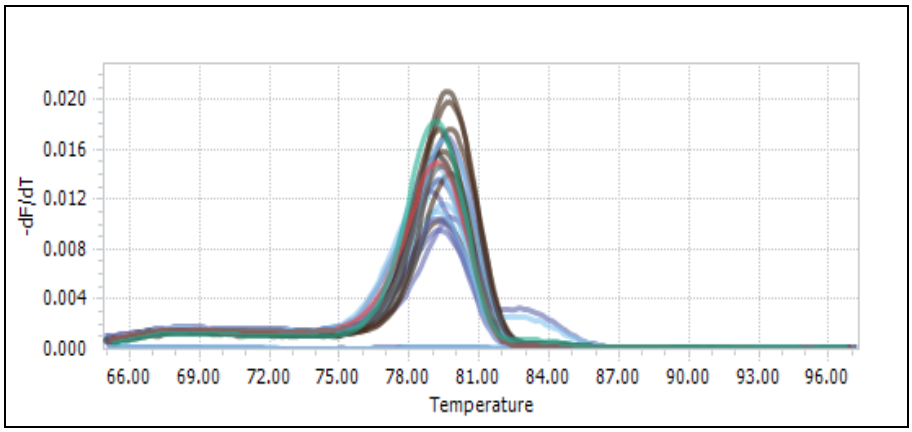
Resim 4.16. sugE (efluks pompa) geni amplifikasyon eğrileri



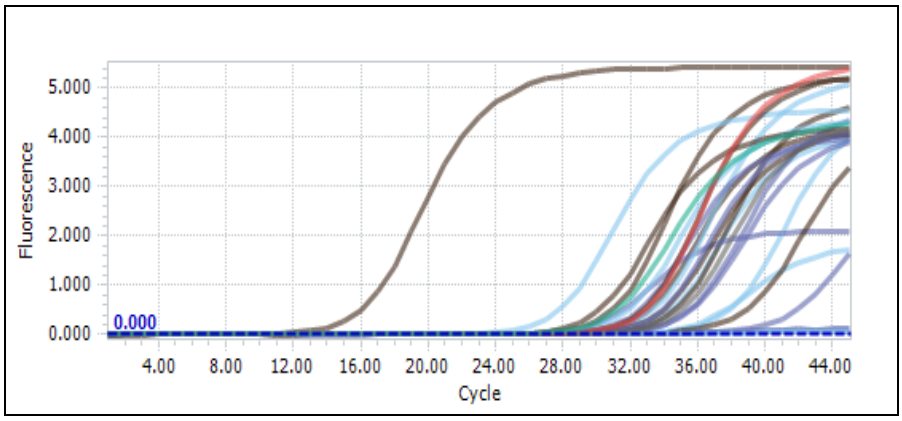
Resim 4.17. smr (efluks pompa) geni Tm analiz tablosu



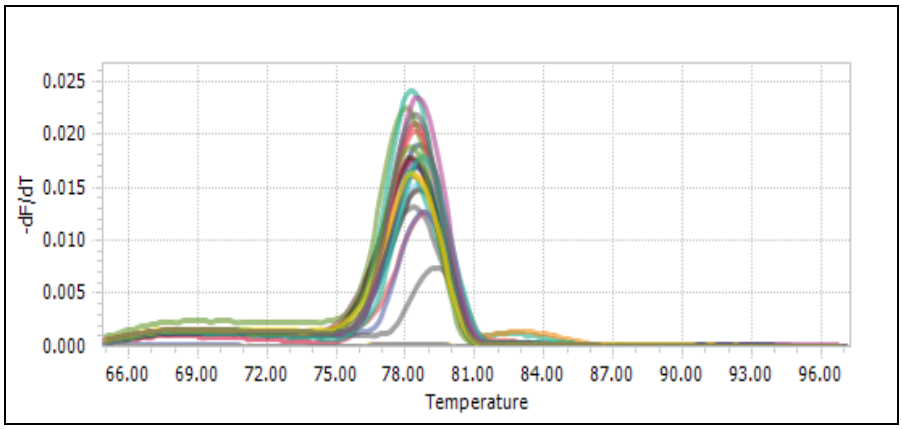
Resim 4.18. smr (efluks pompa) geni amplifikasyon eğrileri



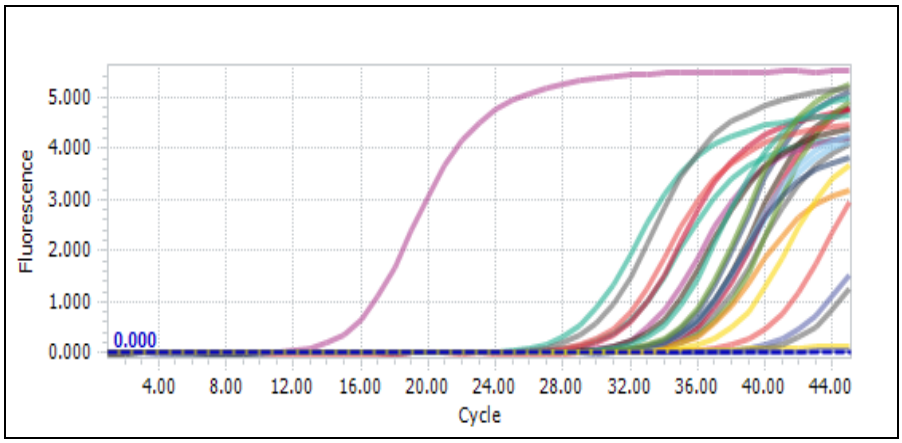
Resim 4.19. efrA (efluks pompa) geni Tm analiz tablosu



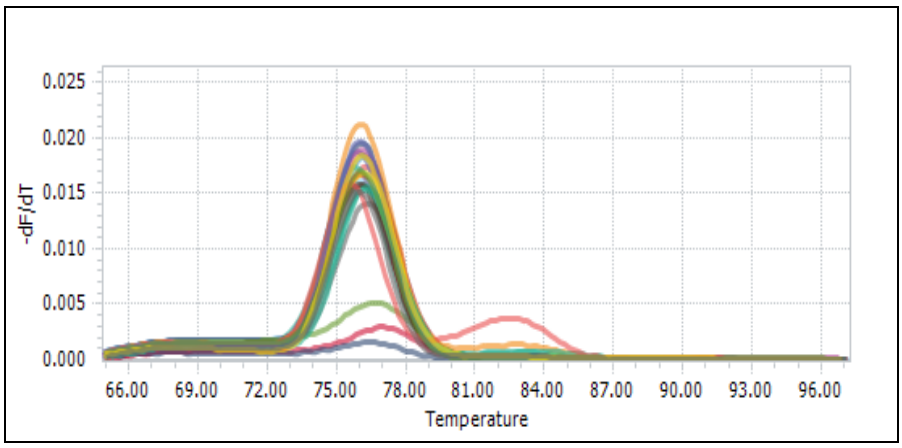
Resim 4.20. efrA (efluks pompa) geni amplifikasyon eğrileri



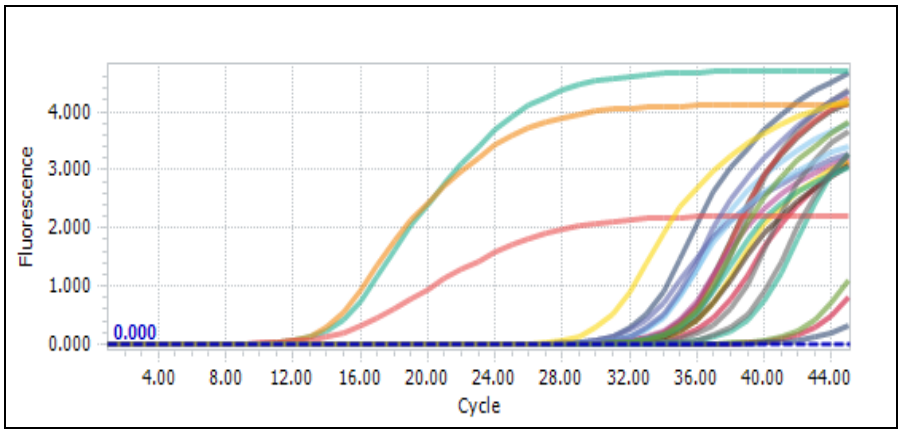
Resim 4.21. efrB (efluks pompa) geni Tm analiz tablosu



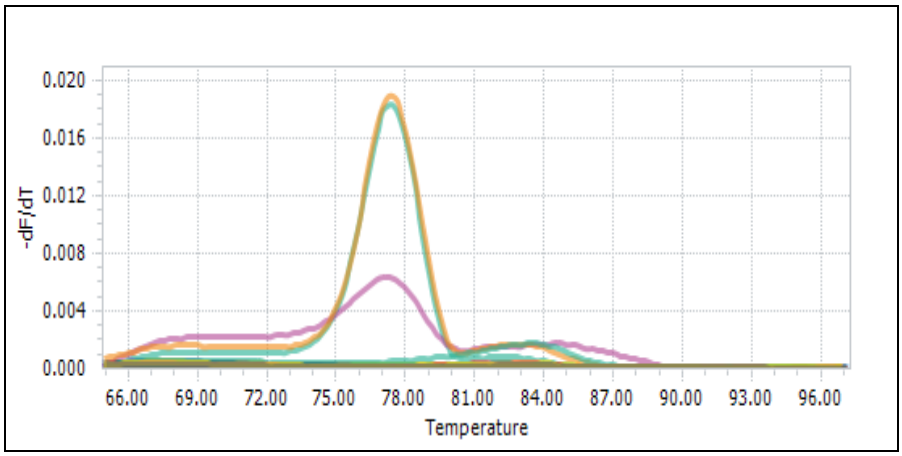
Resim 4.22. efrB (efluks pompa) geni amplifikasyon eğrileri



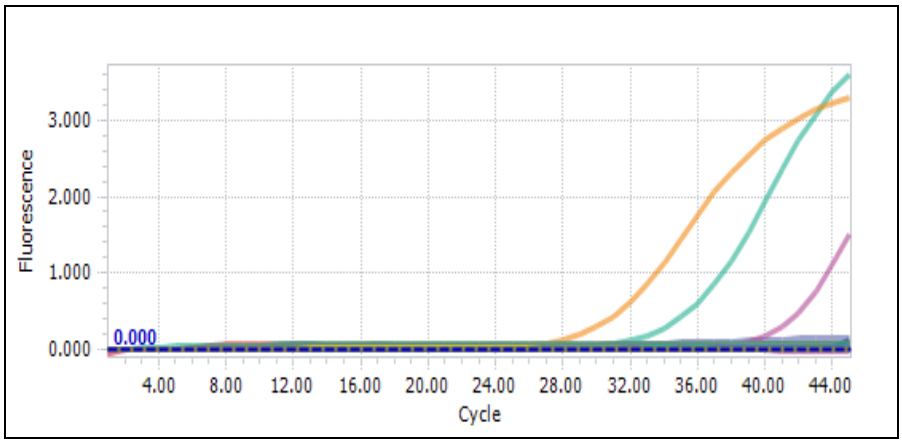
Resim 4.23. mdeA (efluks pompa) geni Tm analiz tablosu



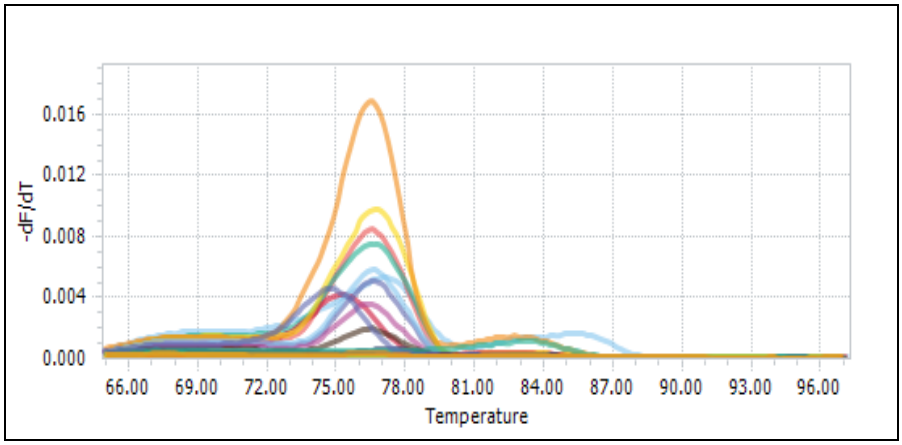
Resim 4.24. mdeA (efluks pompa) geni amplifikasyon eğrileri



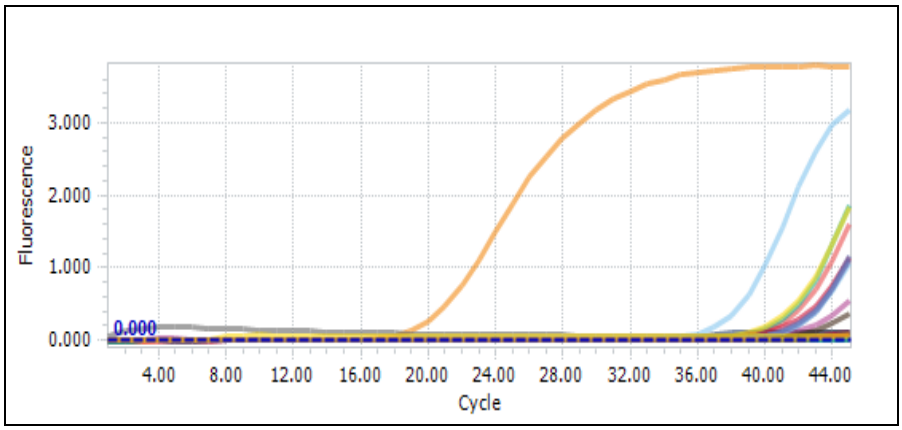
Resim 4.25. mepA (efluks pompa) geni Tm analiz tablosu



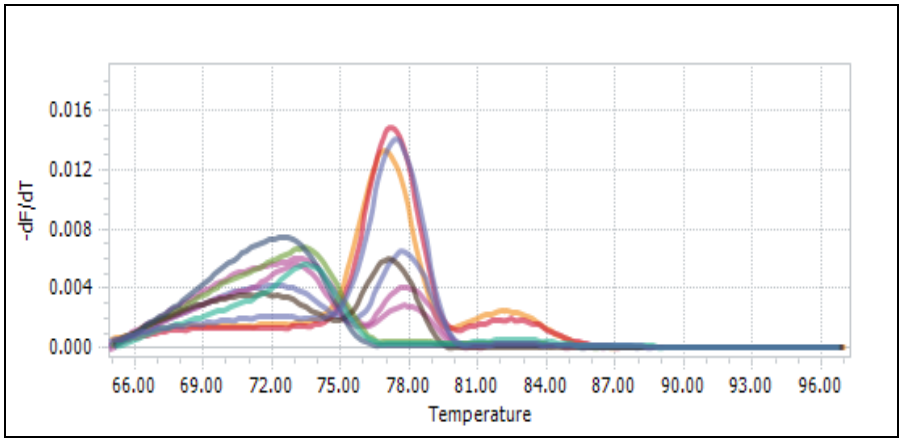
Resim 4.26. mepA (efluks pompa) geni amplifikasyon eğrileri



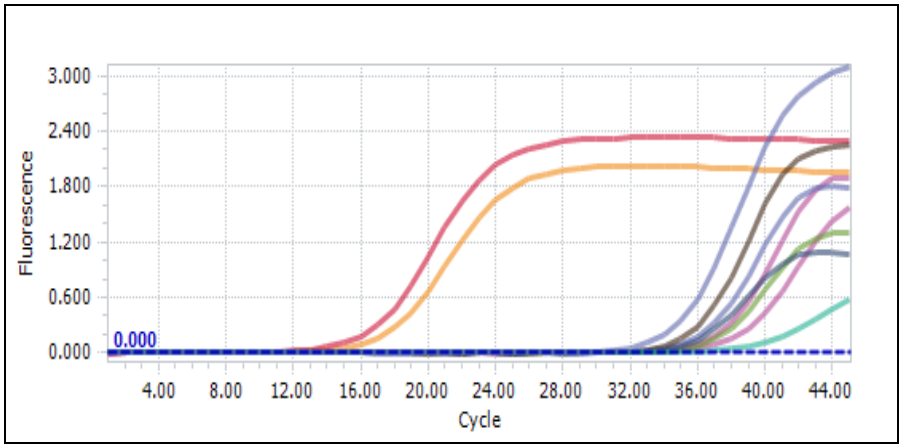
Resim 4.27. norA (efluks pompa) geni Tm analiz tablosu



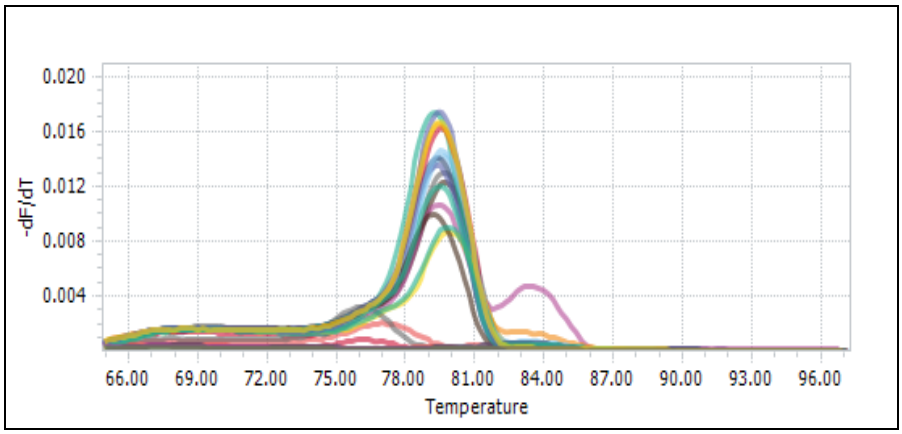
Resim 4.28. norA (efluks pompa) geni amplifikasyon eğrileri



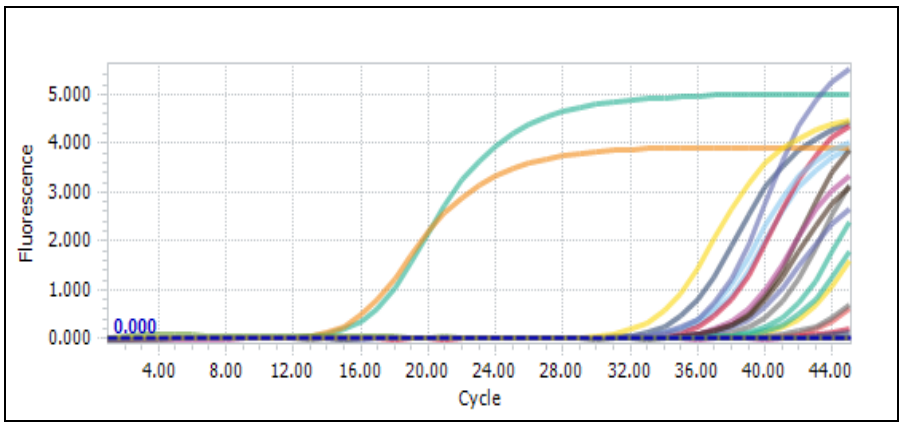
Resim 4.29. norA (efluks pompa) geni Tm analiz tablosu



Resim 4.30. norB (efluks pompa) geni amplifikasyon eğrileri



Resim 4.31. sepA (efluks pompa) geni Tm analiz tablosu



Resim 4.32. sepA (efluks pompa) geni amplifikasyon eğrileri

Günümüzde antibiyotikler insan ve hayvan sağlığı, gıda sektöründe besinlerin korunması, yemlerle verim arttırıcı, klinik ve ilaç sanayisinde yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak ilaçların uygunsuz ve kontrolsüz kullanılması ve farklı çevre koşulları sonucu antibiyotik kalıntılı birçok hayvansal gıda ürünü tüketiciye kadar ulaşmakta bu da antibiyotik direncinin artmasına sebep olmaktadır. Bu direnç plazmid ve transpozonlar aracılığıyla yayılmaktadır. Araştırmamızda gıda örneklerinden izole edilen *Staphylococcus* izolatlarında RT-PZR ile belirlediğimiz antibiyotik direnci ile ilgili gen bölgeleri Çizelge 4.15'te gösterilmiştir. Çizelgede cat geni, bu geni bulunduran izolat tespit edilememesi sebebiyle gösterilmemiştir.

Çizelge 4.15. Antibiyotik dirençli izolatların real time pzr ile belirlenen tetrasiklin ve beta laktam grubu antibiyotiklere direnç genleri ve yüzdeleri

Çalışılan bakteri izolatları	Tetrasiklin ve beta laktam grubu antibiyotiklere direnç genleri							
	tetK (n=18)		tetL (n=18)		bla (n=13)		mecA (n=13)	
	+	%	+	%	+	%	+	%
Staphylococcus	16	88,9	-	-	7	53,8	1	7,7

MİK yöntemi ile tetrasiklin dirençli olduğu tespit edilen 18 *Staphylococcus* izolatının 16'sında tetK geni tespit edilmişken, tetL geni bulunmadığı belirlenmiştir. Beta laktam grubu antibiyotiklere dirençli olduğu tespit edilen 13 izolatın 7'sinde bla, 1'inde de mecA geni tespit edilmiştir.

Bakterilerde çoklu antimikrobiyal direncine neden olan mekanizmalardan efluks pompa sistemi, kazanılmış direncin önemli nedenlerinden biridir. Membran transport proteinlerinden oluşan dışa atım pompa sistemi genlerinin aşırı şekilde ifade edilmesi sonucu ilaçlar hücre dışına itilmektedir. Dışa atım pompa sistemi antibiyotik, dezenfektan, antiseptik gibi birçok bileşiği tanımaktadır. Bu nedenle araştırmamızda antibiyotik direnci gösteren gram pozitif bakteri izolatlarında efluks pompa proteinlerini kodlayan genlerin varlığı araştırılmıştır.

Çizelge 4.16'ya göre, çalışılan toplam 29 izolatın 1 (%3,4)'inde qacA/B, 9 (%31)'unda acrB, 23 (%79,3)'ünde norE, 13 (%44,8)'ünde sugE, 25 (%86,2)'inde smr, 23 (%79,3)'ünde efrA, 21 (%72,4)'inde efrB, 24 (%82,8)'ünde mdeA, 3 (%10,3)'ünde mepA, 7 (%24,1)'sinde norA, 8 (%27,6)'inde norB, 15 (%51,70)'inde sepA geni bulunduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.16. Antibiyotik dirençli izolatların real time pzr ile belirlenen efluks pompa genleri ve yüzdeleri

Efluks pompa genleri	*Staphylococcus* (n=29)	
	+	%
qacA/B	1	3,4
acrB	9	31
norE	23	79,3
sugE	13	44,8
smr	25	86,2
efrA	23	79,3
efrB	21	72,4
mdeA	24	82,8
mepA	3	10,3
norA	7	24,1
norB	8	27,6
sepA	15	51,7

Çizelge 4.17. İzolatların antibiyotik direnç ve efluks pompa gen profilleri

Sıra No	İzolat	16S rRNA Analiz Sonucu	Antibiyotik direnç ve efluks pompa gen profili
1	P49-2	*S.saprophyticus*	bla, norE, sugE smr, efrA, efrB, mdeA
2	P24-1	*S.saprophyticus*	tetK, norE, smr, efrA, efrB, mdeA, norB, sepA
3	P2-2	*S.saprophyticus*	norE, smr, efrA, efrB, mdeA
4	S12-1	*Macrococcus caseolyticus*	qacA/B, norE, efrA, mdeA
5	P23-1	*S.aureus*	tetK, efrB, norE, acrB, mdeA
6	P20-1	*S.saprophyticus*	acrB, efrA, smr, mdeA
7	S11-1	*E. faecalis*	bla, mecA, norE, smr
8	P36-3	*Macrococcus caseolyticus*	bla, acrB, smr, norB, sepA, mdeA
9	S3-1	*S.aureus*	norB, mdeA
10	ES-14	*S. condimenti*	bla, norE, sugE, smr, efrA, efrB, sepA, mdeA
11	K11-1	*S.xylosus*	bla, tetK, acrB, norE, smr, efrA, efrB, mdeA, sepA
12	ES-18	*S.succinus*	tetK, norE, sugE, smr, efrA, efrB
13	ES-20	*S.saprophyticus*	tetK, acrB, norE, smr, efrA, efrB
14	P49-3	*S.saprophyticus*	bla, tetK, norE, sugE, smr, efrA, efrB, mdeA, norA, norB, sepA
15	ES-15	*S.succinus*	tetK, acrB, norE, sugE, smr, efrA, efrB, mdeA, norB, sepA
16	T1-1	*S. pasteuri*	tetK, sugE, smr, efrA, mdeA
17	S4-2	*S.aureus*	acrB, sugE, smr, efrA, efrB, mdeA, mepA, norA, norB, sepA
18	K6-1	*S.saprophyticus*	tetK, norE, sugE, smr, efrA, mdeA, norA, sepA
19	ES-11	*S.succinus subsp. casei*	tetK, norE, smr, efrA, efrB
20	ES-8	*S.succinus*	tetK, norE, smr, efrB, mdeA, mepA
21	K5-1	*S.saprophyticus*	tetK, smr, efrA, mdeA, norA, sepA
22	ES-9	*S.succinus*	tetK, norE, sugE, smr, efrA, efrB, mdeA, norA, sepA
23	T18-1	*S.aureus*	tetK, acrB, norE, smr, efrA, efrB
24	S6-1	*S.aureus*	acrB, norE, sugE, efrB, mdeA, mepA, norB, sepA
25	S6-1	*S.aureus*	tetK, norE, sugE, smr, efrA, efrB, mdeA, sepA
26	P2-1	*S.saprophyticus*	tetK, norE, sugE, smr, efrA, efrB, mdeA, norA, norB
27	P44-1	*S.xylosus*	bla, norE, smr, efrA, efrB, mdeA, sepA
28	S8-1	*S.saprophyticus*	norE, sugE, smr, efrA, efrB, mdeA, norA, sepA
29	P46-1	*S.xylosus*	norE, smr, efrA, efrB, mdeA, sepA

Çizelge 4.17'de *Staphylococcus* izolatlarının antibiyotik direnç ve efluks pompa gen profilleri verilmiştir. İzolatlardan birinin en fazla olarak, çalışılan 17 genin 11'ini, birinin de en az olarak çalışılan genlerin sadece ikisini bulundurduğu tespit edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Gıda hijyeni ilk aşamada, insan tüketimi için sağlık açısından kusursuz olarak sağlıklı hammadde kullanılarak üretimden tüketime kadar gıdaların hijyenik koşullara uygun ve güvenli olarak sağlanmasıdır. Hayvansal gıdalar; gerek hayvanların kesimi sırasında hayvan mikroflorasından ve çevreden, gerekse, işleme, paketleme, muhafaza ve dağıtım aşamalarında çapraz kontaminasyonların oluşması ile insanlarda gıda infeksiyon ve intoksikasyonlarına neden olabilmektedir. Son ürünün kalitesi ve güvenliği açısından gıda işletmelerinde patojen ve bozulmaya neden olan mikroorganizmaların kontrolü önem arz etmektedir (Dafe, 2012).

Staphylococcus'lar sıklıkla süt hayvanlarında subklinik mastitise neden olup, süt ve süt ürünlerinde kontaminasyonlara neden olmaktadır. *S. aureus* ürettigi farklı tipdeki ısıya dirençli enterotoksinleriyle gıda zehirlenmelerinde önemli rol oynamaktadır. Gıda kaynaklı hastalıklar arasında dünyada üçüncü sırada rapor edilmişlerdir. *S. aureus* hastane kaynaklı enfeksiyonların en önemli etkenlerindendir. Etken hızla çoklu antibiyotik direnci kazanarak nozokomiyal ve toplumla iliskili infeksiyonlara neden olmaktadır. *S. aureus* bu özelligi nedeniyle halk saglıgı açısından önemli rol oynamaktadır (Şen ve Özdemir, 2016).

2010-2011 yılları arasında Amerika'nın 8 farklı eyaletinden toplanan perakende satışı yapılan 3520 et örneğinden 1032 (%29,8) *S.aureus* izole edilmiştir (Ge ve ark., 2017). Çalışmamızda ise 41 et örneğinden % 6,5 oranında *Staphylococcus* izolasyonu yapılmıştır (Çizelge 4.1).

Gündoğan ve Ataol'un 2012 yılında yaptıkları çalışmada, 15 kıyma örneğinden 56, 15 çiğ tavuk örneğinden 41 *Staphylococcus* izolasyonu yapılmıştır (Gündoğan ve Ataol, 2012). Bizim çalışmamızda ise 41 et örneğinden 5, 18 çiğ tavuk örneğinden 5 *Staphylococcus* izolasyonu yapılmıştır.

Resende ve ark. Brezilya'da yaptıkları çalışmada, 7 farklı markadan aldıkları 35 yerel Minas peyniri örneğinden 208 gram pozitif bakteri izolatı elde etmiştir. Bunların 140'ı *Enterococcus*, 30'u *Staphylococcus,* 38'i ise *Macrococcus caseolyticus*'tur (Resende ve

ark., 2018). Bizim çalışmamızda çeşitli market ve mandıralardan toplanan 60 peynir örneğinden 51 *Staphylococcus* izole edilmiştir (Çizelge 4.1).

2013 yılında Yurdakul ve ark. 50 tavuk eti örneğinden 4 *S.aureus*, 22 koagülaz negatif *Staphylococcus* (KNS) izolatı elde etmişlerdir (Yurdakul ve ark., 2013). Araştırmamızda, 18 tavuk eti örneğinden 5 *Staphylococcus* izolasyonu yapılmıştır. Sonuçlarımız Yurdakul ve ark. ile benzerlik göstermektedir (Çizelge 4.1).

Veteriner hekimlikte antibiyotik kullanımı, antibiyotik dirençliliğinin yayılmasında önemli rol oynamaktadır. Antibiyotikler çiftlik ve ev hayvanlarında, balık yetiştiriciliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca penisilin, sefalosporin ve diger beta laktam grubu antibiyotikler çiftlik hayvanlarında büyümeyi desteklemek amacıyla kullanılmaktadır. Antibiyotiklerin özellikle çiftlik hayvanlarında tedavi ve büyümeyi artırmak amacıyla kullanılması halk sağlığı açısından önemli bir risk oluşturmaktadır. Bakterilerde gelişen antibiyotik dirençliliği değişik gıdalar, direnç gelişmiş gıda patojenleri ve direncin diğer mikroorganizmalara transferiyle yayılabilmektedir. Antibiyotiklere direnç kazanmış bakterilerin neden oldugu enfeksiyonlarda, hastalar tedaviye cevap vermediğinden vakaların çoğu ölümle sonlanmaktadır. Ayrıca dirençli bakteriler hastaların hastanede kalma süreleri ve tedavi giderlerinin artmasına neden olmaktadır (Şen ve Özdemir, 2016).

Antimikrobiyal maddelerin (antibiyotik, antiseptik ve dezenfektan) besi hayvanlarında kullanılması, et, süt ve ürünlerinin tüketilmesi yoluyla, dirençli bakterilerin insan gastrointestinal sistemine girmesine ve direnç genlerini bağırsaktaki patojenik ve patojenik olmayan bakterilere aktarmasına sebep olmaktadır (Aydin ve ark., 2011).

Yurdakul ve arkadaşlarının 2013 yılında tavuk etlerinden izole ettikleri 22 KNS izolatının Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile %68,1'inin eritromisin, %77,2'sinin tetrasiklin, %27,2'sinin kloramfenikol, %27,2'sinin siprofloksasin dirençli olduğunu belirlemişlerdir. İzole ettikleri 4 *S.aureus*'un 1'i eritromisine, 1'i kloramfenikole ve tümü tetrasikline dirençli iken, siprofloksasine dirençli *S.aureus* bulunmamıştır (Yurdakul ve ark., 2013). Yurdakul ve arkadaşlarının çalışması tetrasiklin, eritromisin ve kloramfenikol direnç sonuçları çalışmamızla benzerlik göstermesine rağmen, siprofloksasin direnci açısından faklılık göstermektedir (Çizelge 4.2, 4.4).

Ogbolu ve arkadaşlarının Nijerya'da 16'sı *S.aureus* 9'u KNS olmak üzere 25 *Staphylococcus* ve 25 *Enterococcus* izolatıyla disk difüzyonla yaptığı çalışmada, *Staphylococcus*'ların 11'inde tetrasiklin, 11'inde eritromisin 17'sinde gentamisin direnci belirlenmiştir (Ogbolu ve ark. 2018). Bizim çalışmamızda, izole edilen 77 *Staphylococcus*'un 19'u tetrasiklin, 2'si eritromisin antibiyotiklerine dirençli olarak saptanırken, gentamisin antibiyotiğine bütün *Staphylococcus* suşları duyarlı olarak bulunmuştur (Çizelge 4.2).

Çıtak ve Duman 2007 yılının Şubat-Temmuz ayları arasında 105 çiğ tavuk örneğinden 195 *Staphylococcus* izole etmişlerdir. Bunların 92'si *S.aureus*, 103'ü KNS olarak belirlenmiştir. *S.aureus* izolatlarının %36,9'u eritromisin, %26,2'si penisilin, %40,2'si tetrasiklin, %31.5'u siprofloksasin, %2,2'si kloramfenikol, KNS izolatlarının %41,7'u eritromisin, %5'i penisilin, %29,1'i tetrasiklin, %21.3'u siprofloksasin, %9,7'si kloramfenikol dirençli olarak belirlenmiştir (Çitak ve Duman, 2011). Bizim çalışmamızda izole edilen *Staphylococcus*'lar %24.7'ü tetrasiklin, %16.9'u ampisilin ve %2.6'sı eritromisin dirençli olarak saptanarak, bu araştırmaya göre direnç oranları daha azdır (Çizelge 4.2).

Ge ve ark. yaptıkları çalışmada satışa sunulan et örneklerinden izole ettikleri 1032 *S.aureus* izolatının; %0,6'sında gentamisin, %12,6'sında eritromisin %54,1'inde tetrasiklin, %69,8 penisilin direnci belirlemişlerdir (Ge ve ark., 2017). Bizim çalışmamızdaki *Staphylococcus* izolatlarında ise gentamisin ve eritromisin dirençli izolat bulunmamakla beraber, tetrasiklin direnci %23,4, ampisilin direnci ise %5,2 olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda Ge ve ark. göre daha az izolat olduğu için ve yüzdeler yakın değerler gösterdiği için, bu çalışma bizim çalışmamızla eritromisin, gentamisin direnci bulunmaması ve tetrasiklin direnci açısından benzerlik, ampisilin direnci açısından farklılık göstermektedir (Çizelge 4.3, 4.4).

Nijerya'da, Ogbolu ve arkadaşlarının klinik örneklerden izole edilen 25 *Staphylococcus* 'un MİK yöntemi ile eritromisin antibiyotiğine direnci araştırılmış, 8'inde 8 µg/ml ve üstü MİK değeri belirlenmiştir (Ogbolu ve ark., 2018). Bizim çalışmamızda yapılan MİK yöntemi ile *Staphylococcus*'larda eritromisin direnci belirlenmemiştir (Çizelge 4.3, 4.4).

Belçika'da 2012 yılında yayınlanan, 7 farklı inek çiftliğinden toplanan inek sütleri ve çevresel örneklerden izole edilen 366 KNS izolatıyla yapılan çalışmada tür tanımlamaları yapılmış, antibiyotik dirençleri ve çeşitli direnç genleri araştırılmıştır. Toplamda 22 farklı tür KNS izolatı elde edilmiştir. Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizm (AFLP) parmak izi analizlerine göre 82 izolatın olduğu bir altgrup oluşturulmuş ve bunların fenotipik ve genotipik duyarlılıkları test edilmiştir. Test edilen tüm izolatlar sefalotin ve gentamisine duyarlı, sadece 1 izolat enrofloksasine orta dirençli olarak belirlenmiştir (Piessens ve ark., 2012). Bu açıdan bu araştırma, bizim çalışmamızla paralellik göstermektedir. Araştırmada 19 izolatta (%23,2) eritromisin direnci belirlenmiştir, bizim çalışmamızda *Staphylococcus* izolatlarında eritromisin direnci belirlenmemiştir (Çizelge 4.2, 4.4).

Özpınar ve Gümüşsoy, 2013 yılında 100 farklı Erzincan tulum peynirinden 72 *Staphylococcus* izole etmiş, bunların 61'inin *S.aureus* olduğunu belirlemişlerdir. 61 izolattan 9 (%14.7)'unda oksasilin (metisilin), 8 (%13.1)'inde sefoksitin, 4 (%6.5)'ünde amoksisilin-klavulonik asit, 28 (%45.9)'inde ise penisilin dirençliliğinii Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile tespit etmişlerdir. Polimeraz Zincir Reaksiyonu sonucunda 61 örnekten 10 (%16.3)'unda *nuc* ve *mecA* genleri saptamışlardır (Özpınar ve Gümüşsoy, 2013). Bizim çalışmamızda, 77 *Staphylococcus* izolatımızın, 13 (%16,9)'ü ampisiline, 31 (%40,3)'i sefuroksime dirençli olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2, 4.4).

Tanrıbuyurdu'nun 2014 yılında 100 inek sütünden izole ettiği 27 *S.aureus*'ta ve Koçyiğit ve arkadaşlarının 2016'da 125 mastitisli inek sütünden izole ettiği 25 KNS, 5 *S.aureus* izolatında sefuroksim ve enrofloksasin dirençliliği bulunmamıştır (Tanrıbuyurdu, 2014, Koçyiğit ve ark., 2016). Bizim çalışmamızda da benzer olarak enrofloksasin direnci belirlenememiş, sefkuinoma da sadece disk difüzyon yöntemi ile 3 dirençli izolat belirlenmiştir (Çizelge 4.2, 4.4).

Biyositler (antiseptik ve dezenfektanlar), sağlık, gıda gibi sektörlerde ortamlardaki mikroorganizma yükünü ciddi oranda azaltarak kabul edilebilir sağlık standartları oluşturabilmek için kullanılmaktadırlar. Bu maddeler düşük konsantrasyonlarda bile birçok bakteri, mantar ve virüs türüne etki etmektedir. Fakat biyositlerin etkinliği birçok faktörden etkilenmektedir, bunlar, doğru konsantrasyon, ortamdaki organik madde ve oksijen oranı, biyodegredasyon gibi faktörlerdir. Bu faktörler doğru ayarlanmadığında biyositlerin etkinliği azalabilmekte veya tamamen kaybolabilmektedir. Bakterilerin biyositlerle uygun

olmayan koşullarda sürekli karşılaşmaları, antimikrobiyal ajanlara direnç, çapraz direnç veya ortak direnç geliştirmelerine sebep olmaktadır (Gadea ve ark., 2017).

Hughes ve Ferguson'un 198 klinik *S.aureus* izolatı ve agar dilüsyon metodu ile yaptığı çalışmada, klorhekzidin maddesinin MİK değer aralıkları 0,5-8 mg/L, triklosan MİK değer aralıkları ise <0,06-16 mg/L olarak belirlenmiştir (Hughes ve Ferguson, 2017). Bizim çalışmamızla karşılaştırıldığında (Çizelge 4.5-4.12) *Staphylococcus* izolatlarının klorhekzidinde biraz daha yüksek MİK değeri gösterdiği, triklosanda ise bizim elde ettiğimiz MİK değerlerinin çok daha yüksek (5 izolatta 512 µg/ml, 2 izolatta 128 µg/ml gibi) olduğunu görmekteyiz. Bu sonuç, gıda ve hayvancılık sektörlerinde biyosidal maddelerin bilinçsiz ve kontrolsüz olarak kullanılıyor olabileceğini işaret etmektedir (Çizelge 4.5).

İspanya'da küçük orta işletmelerde üretilen çeşitli peynirlerden izole edilen, içinde *Bacillus, Enterococcus* ve Laktik asit bakterileri bulunan 80 gram pozitif bakteri ile yapılan çalışmada, benzalkonium klorid MİK değerleri 2,5-50 mg/L, triklosan MİK değerleri 2,5-7,5 mg/L, hekzaklorofen MİK değerleri 5-10 mg/L arasında belirlenmiştir (Marquez ve ark., 2017). Benzalkonium klorid MİK değerleri bizim çalışmamızla benzerlik göstermiş olmasına rağmen, triklosan ve hekzaklorofen MİK değerleri bizim çalışmamızda çok daha yüksek belirlenmiştir. Marquez ve ark. bu değerlerin azalmış biyosit duyarlılığına işaret ettiğini belirtmişlerdir. Bu sebeple bizim çalışmamızdaki izolatlarda da ciddi şekilde azalmış biyosit duyarlılığı olduğu söylenebilmektedir (Çizelge 4.5).

Aykan ve arkadaşlarının 2013 yılında hastane enfeksiyonu etkeni, metisilin dirençli 69 *S. aureus* izolatıyla yaptıkları çalışmada, izolatların benzalkonium klorür ve klorhekzidin MİK değerlerini 2-4-8 µg/ml aralığında belirledikleri görülmüştür (Aykan ve ark., 2013). Bizim sonuçlarımızda *Staphylococcus* izolatlarında benzalkonyum klorürde 1 izolatta 128 µg/ml olmasına rağmen diğer izolatların MİK değer aralıkları 0,5-4 µg/ml, klorhekzidin de de yine 1 izolatta 32 µg/ml olmasına rağmen diğer izolatların MİK değer aralıkları 0,5-4 µg/ml bulunmuştur. Bu sebeple sonuçlarımızın paralel olduğu söylenebilmektedir (Çizelge 4.5).

2014 yılında Lübnan'da bölgesel bir hastanenin çeşitli bölgelerinden izole edilen 86 gram pozitif bakterinin biyosidal direnci çalışılmıştır. Biyositlerin piyasada kullanılan konsantrasyonları baz alınarak seri dilüsyon yapılıp 24-48 saatte üremeleri MİK yöntemi ile incelenmiştir. 31 *S.aureus* izolatının %12,9'u kuaterner amonyum bileşiği içeren dezenfektana, %20,1'i sodyum hipokloride dirençli olarak bildirilmiş, povidon iyodine direnç bulunmamıştır.31 KNS izolatının %6,5'i kuaterner amonyum bileşiği içeren dezenfektana, %6,5'u sodyum hipokloride dirençli olarak bildirilmiş, povidon iyodine direnç bulunmamıştır (Jomha ve ark., 2014).

Organik gıdalardan izole edilen 378 gram pozitif ve negatif bakteride, Fuentes ve arkadaşları (2012) antibiyotik ve biyosit direnci araştırmıştır. Çalışma sonucunda bakterilerde, sefuroksim, amoksisilin ve eritromisin antibiyotiklerine yüksek direnç bulunmuştur. Test ettikleri biyositlere (triklosan, benzalkolyum klorid, hekzadesilpiridinum klorid, hekzaklorhekzidin, setrimid) yüksek MİK değeri gösteren 36 izolatın en az bir antibiyotiğe dirençli olduğu ve birkaç biyosite birden yüksek MİK gösteren izolatların da antibiyotiklere daha dirençli olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda, organik gıdaların antibiyotik dirençli bakteriler için bulaş kaynağı olabileceğini ve biyosit direncinin antibiyotik dirençli bakterilerin artmasını kolaylaştırabildiğini ileri sürmüşlerdir (Fuentes ve ark., 2012).

Araştırmamızda izole edilen antibiyotik dirençli *Staphylococcus* izolatlarında, sodyum hipoklorit (8 izolat), povidon iyodin (26 izolat) ve triklosan (7 izolat) biyositlerine yüksek MİK değerleri belirlenmiştir. Hekzaklorofen (1 izolat 512 µg/ml, diğerleri hassas), klorhekzidin (0,5-1 µg/ml) ve benzalkonyum klorit (0,5-1 µg/ml) biyositlerine genelde düşük MİK değerleri göstermişlerdir fakat yüksek MİK gösteren az sayıdaki izolatın tetrasiklin dirençli olduğu görülmektedir (Çizelge 4.5).

Rezerpin, özellikle Gram pozitif bakterilerde bulunan birçok efluks pompa proteinin çalışmasını yarışmalı inhibisyon yoluyla engelleyen bir alkoloiddir. *Staphylococcus, Bacillus, Enterococcus, Streptococcus, Lactococcus, Listeria* gibi birçok bakteride etkinliği yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Li ve ark., 2016). Günümüzde antimikrobiyal direnci azaltmada aktif olarak kullanılmamasına rağmen araştırmalar için umut vadeden bir etken madddedir. Araştırmalarda, çoklu antibiyotik direnci gösteren bakterilerde ortama

rezerpin eklenmesi ile MİK değerinin 4 kat ve daha fazla oranda düşmesi, rezerpin etkinliğinin göstergesi olarak kabul edilmektedir (Gibbons ve Udo, 2000).

Araştırmamızda *Staphylococcus* izolatlarından, ampisiline dirençli 4 izolattan 1'inde, tetrasikline dirençli 18 izolatın 5'inde, sefuroksime dirençli 11 izolatın 11'inde, nitrofurantoine dirençli 2 izolatın 2'sinde rezerpin eklendikten sonra MİK değeri 4 kat ve daha fazla azalmıştır (Çizelge 4.9). Bu sonuç bu izolatlarda rezerpin duyarlı efluks pompası proteinlerinin bulunduğunu düşündürmektedir.

Gibbons ve Udo'nun 2000 yılında yaptıkları çalışmada, yüksek tetrasiklin direnci gösteren ve tetK geni pozitif olduğu belirlenen 2 farklı klinik MRSA izolatının (MİK: 128 µg/ml) MİK değerlerinin ortama 10 µg/ml rezerpin eklendikten sonra gözle görülür bir miktarda (MİK:32 µg/ml) azaldığı belirtilmiştir (Gibbons ve Udo, 2000). Bizim çalışmamızda da tetrasiklin dirençli *Staphylococcus* izolatlarında tetK geni pozitifliği tespit edilmiş (%88,9) (Çizelge 4.15), rezerpinin de tetrasiklin MİK değerini %27,8 oranında 4 kat ve üzeri olacak şekilde azalttığı belirlenmiştir (Çizelge 4.9). Efluks pompalarının bakteri biyofilmlerinde önemli olduğu ve biyofilm yapılarında antimikrobiyal direncinden sorumlu mekanizmalardan biri olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamızda, rezerpin eklenerek yapılmış biyosit mikrodilüsyon sonuçlarına göre; *Staphylococcus* izolatlarının, toplamda 4'ünde sodyum hipoklorit, 1'inde hekzaklorofen, 2'sinde klorhekzidin, 6'sında triklosan, 10'unda povidon iyodin, 2' sinde benzalkonyum klorit için MİK değerlerinde 4 kat ve daha fazla azalma görülmüştür (Çizelge 4.11). Bu sonuçlar bu izolatlarda rezerpin duyarlı efluks pompası proteinlerinin bulunduğunu düşündürmektedir. Çizelge 4.11'daki yüzdeler incelendiğinde rezerpinin % 34,5 ile en çok povidon iyodinde duyarlılığı arttırdığı, %20,7, %13,8 ile triklosan ve sodyum hipokloritin sırasıyla onu takip ettiği görülmektedir.

Fuentes ve ark. 2014 yılında organik gıdalardan izole edilen 11 *Bacillus*, 25 *Enterococcus* ve 10 *Staphylococcus* izolatıyla yapılan çalışmada, çeşitli biyosidal maddelerin MİK değerleri, bizim çalışmamızda olduğu gibi, ortama 25 µg/ml rezerpin eklendiğinde, benzalkonyum klorid için 4 izolatta, hekzaklorofen için 14 izolatta, klorhekzidin için 19 izolatta, triklosan için 2 izolatta 4 kat ve daha fazla azalmıştır (Fuentes ve ark., 2014). Bu çalışmanın sonuçları bizim çalışmamızla paralellik göstermektedir (Çizelge 4.11).

Seasotiya ve Dalal (2014) yapmış olduğu çalışmada, Efluks pompa sisteminin antimikrobiyal dirençlilikte önemli bir mekanizma olduğu ve antimikrobiyallere karşı çoklu direnç sağladığını bildirmiştir. Siproflaksasin ve oksasilin antibiyotiklerine dirençli suşlarda inhibitör olarak piperin ve plumbeg kullanmış olup izole ettiği 5 *Staphylococcus* suşunun 3'ünde ilgili inhibitörlerin etkisini saptamıştır (Seasotiya ve Dalal, 2014). Bizim çalışmamamızda inhibitör olarak rezerpin kullanılmış olup, *Staphylococcus* izolatlarından, ampisiline dirençli 4 izolattan 1'inde, tetrasikline dirençli 18 izolatın 5'inde, sefuroksime dirençli 11 izolatın 11'inde, nitrofurantoine dirençli 2 izolatın 2'sinde de rezerpin eklendikten sonra MİK değeri 4 kat ve daha fazla azalmıştır (Çizelge 4.9).

16S rDNA, türler ve aynı cinsin türleri arasında yüksek oranda korunmuş bir bölgedir. Bu sebeple 16S rDNA sekans analizi, mikroorganizmaların tanımlanması için altın standart olarak kullanılan basit ve yaygın bir yöntemdir (Woo ve ark., 2001). Bu genin bazı bölgelerinin iyi korunmasına rağmen, diğer bölgeler, tüm canlı organizmaları hedef alan problardan gruba ve türe özgü problara kadar çeşitli özelliklerde nükleik asit problarının tasarımına temel oluşturan büyük çeşitlilik göstermektedir (Fernández-No ve ark., 2015).

Sonuçlarımıza göre, *Staphylococcus* izolatlarının 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına bakıldığında çalışılan 29 izolatın 13'ünde BBL Crystal bakteri tanımlama kiti ile aynı sonuç alındığı, 8 izolatta tür olarak farklı sonuç elde edildiği, kit ile adlandırılamayan izolatların 5'inin *S.succinus,* birinin *S.aureus*, birinin ise *Macrococcus caseolyticus,* bir izolatın ise kit ile aynı sonuç vererek *E. faecalis* olarak adlandırıldığı görülmektedir (Çizelge 4.12, 4.13)

Lange ve ark. 2015 yılında yaptıkları çalışmada, 16S rRNA sekansının sığır mastitinden izole edilen *Staphylococcus* türlerinin doğru tanımlanması için objektif ve doğru bir yöntem olduğunu belirlemişlerdir. Kesin olmayan durumlarda bu mikroorganizmaların tür düzeyinde tanımlanması için ek hedef genlerin kullanılabileceği de söylenmiştir (Lange ve ark., 2015).

Saka ve Terzi Gülel 2018 yılında yayınladıkları çalışmada, 100'ü manda sütü, 100'ü de kaymak ve peynirden oluşan 200 gıda örneğinden toplamda 283 *Staphylococcus* spp. izolasyonu yapmışlar ve bu izolatları 16s rRNA dizi analizi yöntemi ile adlandırmışlardır.

Bu izolatların 99'u, nuc geni içerdiklerinden dolayı *S.aureus* olarak adlandırılmıştır (Saka ve Terzi Gülel, 2018).

tetK ve tetL genleri plazmidlerde kodlanan, Na^+ (K^+)/ H^+ pompası ile enerji sağlayan tetrasiklinlere direnci sağlayan proteinleri kodlamaktadır. Bu genleri taşıyan *Staphylococcus*'ların aynı zamanda Na^+ stresi, alkali stresi vb. dış streslere dayanıklı olduğu bildirilmiştir. *bla,* beta laktamaz enzimini, *mecA*, ise alternatif bir penisilin bağlama proteinini (PBP) kodlayan genlerdir. Bunlar en çok çalışılmış beta laktam antibiyotiklere direnç sağlayan genlerdir (Andersen ve ark., 2015). mecA geni stafilokok suşlarında yüksek oranda korunmuştur. mecA'nın saptanması, genel olarak β-laktam antibiyotiklere karşı direncin belirlenmesinde altın standart olarak kabul edilmektedir (Maes ve ark., 2002).

2005-2006 yıllarında, Pakistan'da bir hastanede izole edilen tetrasiklin dirençli 74 *S.aureus* izolatının 58'inde tetK, sadece bir izolatta tetL geni bulunduğu belirlenmiştir (Ullah ve ark., 2012). Bu araştırmanın sonuçları bizim çalışmamızla benzerlik göstermektedir (Çizelge 4.15).

Dafe, 2012 yılında yaptığı yüksek lisans tez çalışmasında, 120 tavuk et örneğinden 22 *S.aureus* izole etmiş, bu izolatlarda hiç mecA geni tespit edemezken, 2 izolatta tetK geni tespit etmiştir (Dafe, 2012). Bizim çalışmamızda benzer olarak sadece 1 izolatta mecA geni belirlenmiş, farklı olarak ise tetK geni tetrasiklin dirençli belirlenen 18 izolatın 16'sında pozitif bulunmuştur (Çizelge 4.15).

Rodrigues ve arkadaşları, 2017 yılında yayınladıkları çalışmada, 3 farklı peynir üretim tesisinden alınan çiğ süt, peynir gibi gıda ve tesis çalışanlarında alınan sürüntü örneklerinden izole edilen 100 *Staphylococcus* izolatında antibiyotik direnç ve virülens genleri varlığı araştırılmıştır. Çoklu antibiyotik direnci gösteren izolatların ikisinde tetK, altısında ise mecA genleri pozitif bulunmuştur. Bu çalışmanın sonucunda, Brezilya'daki süt işleme ortamlarında antibiyotik dirençli ve farklı kaynaklardan bulaşan yüksek derecede virülan suşlar bulunabileceği, bunun da araştırmacılar, üretici ve tüketiciler için ciddi bir endişe kaynağı olduğunu belirtmişlerdir. Bu nedenle, Brezilya süt işletmelerinde stafilokokların kontaminasyonunu önlemek için iyileştirmeler yapılması, Brezilya üreticilerine ve düzenleyici kurumlara, süt işleme alanındaki önleme ve kontrol

faaliyetlerinin gözlemlenmesi ve gıda güvenliğini sağlamak için iyileştirilmesi gerektiğini vurgulamışlardır (Rodrigues ve ark., 2017).

Samsun'da 100 manda sütü, 50 kaymak ve 50 peynir örneğinden izole edilen 99 *S.aureus*'un 9'unda metisilin direnci belirteci olan mecA geni tespit edilmiştir (Saka ve Terzi Gülel, 2018). Bizim çalışmamızda da beta laktam grubu antibiyotiklere dirençli 13 *Staphylococcus* izolatının sadece 1'inde mecA geni bulunduğu belirlenmiştir.

Souza ve ark., 2019 yılında yayınladıkları makalelerinde, subklinik mastitisli inek sütlerinden izole ettikleri, disk difüzyon yöntemi ile en az üç beta laktam antibiyotiğe dirençli olarak belirlenen 16 *S.aureus* izolatının 5'inde mecA geni bulunduğunu belirtmişlerdir. Bu izolatların 6'sında da bla_z geni tespit etmişlerdir (Souza ve ark, 2019). Araştırmamızda benzer olarak, beta laktam antibiyotiklere dirençli 13 izolatın 1'inde mecA, 7'sinde bla geni bulunduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.15).

Bakterilerde kazanılmış antimikrobiyal direnci, birkaç mekanizma ile gerçekleşmektedir fakat bu mekanizmaların en önemlisi ilaçların dışarı pompalanmasını sağlayan efluks pompa proteinleridir. Efluks pompa proteinleri, 7 farklı süper aileye ayrılmış, yüzlerce farklı basit veya kompleks yapıdaki proteinlerden oluşmaktadır. Bakterilerde bu proteinlerden bir veya birkaçının bulunması ya da bu proteinlerin aşırı ifade edilmesi dirence sebep olmaktadır. Araştırmamızda, bu proteinleri kodlayan genlerin Gram pozitif bakterilerde en çok bilinenleri seçilerek çalışılmıştır.

Aykan ve arkadaşlarının 2013 yılında hastane enfeksiyonu etkeni, metisilin dirençli 69 *S. aureus* izolatıyla yaptıkları çalışmada, izolatların benzalkonyum klorür ve klorhekzidin dezenfektanlarına duyarlılıklarının azalmış ve 8 (%11,6) izolatın qacA/B geni pozitif olduğu bulunmuştur (Aykan ve ark., 2013). Bizim *Staphylococcus* izolatlarımızın sonuçları ile karşılaştırıldığında qacA/B pozitif 1 izolatımız olduğu ve yüzde olarak (%3.4) daha az olduğu söylenebilmektedir (Çizelge 4.16).

2006-2010 yılları arasında Nakipoğlu ve arkadaşlarının topladıkları 50 MRSA, 50 MSSA olmak üzere 100 klinik izolatla yaptıkları çalışmada, MRSA suşlarının 18'inde (%36) smr geni, MSSA suşlarının 2'sinde (%4) qacA/B *g*eni saptamışlardır. MRSA suşlarında qacA/B, MSSA suşlarında smr geni bulunamamıştır (Nakipoğlu ve ark., 2012). Bizim

Staphylococcus izolatlarımızda da qacA/B geni (%3.4) az bulunmuşken, smr geni %86,2 oranında bulunmuştur (Çizelge 4.15).

Fernandes-Fuentes ve arkadaşlarının 2014 yılında organik gıdalardan izole ettikleri 46 gram pozitif bakteri (11 *Bacillus,* 25 *Enterococcus* ve 10 *Staphylococcus*) ile yaptıkları çalışmada, ABC pompa grubundan efrA *ve* efrB genleri yüksek oranda pozitif bulunmuştur. QAC grubundan qacA/B ve smr sadece 2 *Bacillus* izolatında pozitif bulunmuştur. sugE geni 5, mepA 7, sepA 3, norE 2, mdeA 1 izolatta, acrB geni tüm izolatlarda pozitif bulunmuştur (Fuentes ve ark. 2014). Bizim çalışmamızda da efrA ve efrB genleri sırasıyla (%79,3) ve (%72,4) oranında yüksek saptanmıştır. Ayrıca qacA/B (%3.4) düşük de olsa saptanmıştır. sugE geni 13, mepA 3, sepA 15, norE 23, mdeA 24, acrB geni 9 izolatta pozitif bulunmuştur (Çizelge 4.16).

Hassanzadeh ve arkadaşlarının Tahran'da 60 klinik MRSA izolatıyla yaptıkları çalışmada, izolatların tümünde mecA geninin bulunduğunu, izolatların 43'ünde mdeA, 37'sinde mepA, 22'sinde norA, 1'inde izolatın norB, 19'unda sepA ve 11'inde smr geni pozitif olduğu belirlenmiştir (Hassanzadeh ve ark., 2017). mecA geni dışındaki sonuçlar bizim çalışmamızla benzerlik göstermektedir (Çizelge 4.15, 4.16).

Hastane enfeksiyonu etkeni olan MRSA suşlarında PZR yöntemi ile %11.6 (8/69) oranında *qac*A/B geni pozitifliği saptanmış; klorhekzidin ve benzalkonyum klorur solüsyonunun %1'lik konsantrasyonları gerek *qac*A/B geni taşıyan gerekse yüksek MİK (≥ 2 μg/ml) değerlerine sahip MRSA suşlarının hepsi için bakterisidal etkili bulunmuş; buna göre direnç genlerinin varlığının ve artmış MİK değerlerinin direnç fenotipine yansımadığı sonucuna varılmıştır (Aykan ve ark., 2013).

Singapur'da 200 klinik MRSA izolatı ile yapılan bir çalışmada izolatların tümünün mecA, %24'ünün qacA/B geni bulundurduğu belirlenmiştir (Chan ve ark., 2018). Araştırmamızda izolatlarımızın birinde mecA, birinde de qacA/B geni bulunduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.15, 4.16).

Ignak ve ark.(2017) gram pozitif koklarda (69 *Staphylococcus* ve 69 *Enterococcus*) qacA/B, smr, qacG, qacH, qacJ genleri çalışmışlardır. *Staphylococcus* izolatlarında antimikrobiyal direnç genleri %71 oranında saptanırken, *Enterococcus* izolatlarının

hiçbirinde ilgili efluks genleri saptanamamıştır. Bizim çalışmamızda *Staphylococcus*'larda yüksek oranda smr geni (%86.2) saptanırken, qacA/B (%3.4) oranında saptanmıştır (Çizelge 4.16).

2012 yılında yayınlanan, Belçika'da 7 farklı inek çiftliğinden toplanan inek sütleri ve çevresel örneklerden izole edilen 366 KNS izolatıyla yapılan çalışmada tür tanımlamaları yapılmış, antibiyotik dirençleri ve çeşitli direnç genleri araştırılmıştır. Toplamda 22 farklı tür KNS izolatı elde edilmiştir. Bu izolatlarda *mecA* (metisilin direnci) geni %11,7 (43/366) oranında pozitif bulunmuştur (Piessens ve ark., 2012). Bizim çalışmamızda ise 13 beta laktam dirençli *Staphylococcus* izolatının 1'inde (%7,7) *mecA* geni pozitif olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.15).

sepA, bir efluks pompa geni olmakla beraber, biyofilm formasyonu ile ilgili olduğu da *S. epidermidis* izolatlarında belirlenmiştir (Paharik ve ark., 2017). Becker ve ark. Brezilya'da yaptıkları çalışmada, siprofloksasinin sub-inhibitör konsantrasyonlarının efluks pompa inhibitörü rezerpin varlığında ve yokluğunda klinik *Staphylococcus* izolatlarının biyofilm yapısına etkisini ve biyofilm tabakasına rezerpinli ve rezerpinsiz ortamda siprofloksasin uygulandığında sepA geni ekspresyon miktarını belirlemeyi hedeflemişlerdir. Yaptıkları çalışmanın sonucunda, sepA'nın en azından kısmen MRSA-biofilmi ile ilişkili olduğunu söylemişlerdir. Çünkü ekspresyonundaki azalmanın biyofilm biyokütlesindeki azalma ile ilişkili olduğunu belirlemişlerdir. Bu *S. aureus* klinik izolatlarında bu ilişkinin belirlendiği ilk rapor olma özelliğini taşımaktadır. Ayrıca çalışmada klinik *Staphylococcus* izolatlarının biyofilm tabakalarının, siprofloksasinin sub-inhibitör konsantrasyonlarına maruz bırakıldığında artmakta ve siprofloksasinin sub-inhibitör konsantrasyonları ile birlikte efluks pompası inhibitörüne (EPI) (rezerpin) maruz kaldığında azaldığını gösterilmektedir. Siprofloksasin ve EPI eklendiğinde ile gen ekspresyonunun azaldığı belirlendiğinden, sepA'nın, muhtemelen bu izolatlarda biyofilm oluşumu ve korunması ile ilişkili olan efluks pompa genlerinden biri olduğunu düşündürmektedir (Becker ve ark., 2018). Bizim çalışmamızda sepA geni izolatlarımızın %51,7'sinde bulunmuştur fakat rezerpinin sepA geni ekspresyonuna etkisi çalışılmamıştır (Çizelge 4.16). İleride yapılacak olan çalışmalarda bu konu üzerinde durulabileceği düşünülmektedir.

2018 yılında Brezilya'da yumuşak peynirlerden izole edilen gram pozitif bakterilerle yapılan çalışmada, toplam 208 bakteriden 164 (%78)'ünde mecA, 1 (%0,4)'inde ermA, 4

(%1,9)'ünde ermB, 98 (%46,6)'inde msrB, 128 (%60,9)'inde msrA, 13 (%6,1)'ünde qacA/B, 150 (%71,4)'sinde smr geni pozitif bulunmuştur (Resende ve ark., 2018). Yüzde olarak karşılaştırıldığında bu çalışma ile bizim çalışmamız uyumluluk göstermektedir (Çizelge 4.16). Bu genlerin gıdalarda bulunan bakterilerdeki prevalansı ve antimikrobiyal direnci ile ilişkisinin belirlenmesi, antimikrobiyal direncinin yayılımının engellenmesi için büyük önem taşımaktadır.

6. SONUÇ

Gıda olarak en sık tüketilen et, süt ve süt ürünlerinde, bakteriyel bulaş olması, bu gıdaların mikrobiyal çoğalma için çok uygun bir ortam olması sebebiyle, gıdaların raf ömrünün azalması, bozulması ve çapraz kontaminasyonlara yol açmaktadır. Araştırmamızda et, süt ve süt ürünlerinin en önemli kontaminantlarından Gram pozitif bakteriler olan *Staphylococcus* izolasyonu ve izole edilen bu bakterilerin antibiyotik ve biyosit direnç genleri (tetK, tetL, bla, mecA, cat, qacA/B, acrB, norE, sugE, smr, efrA, efrB, mdeA, mepA, norA, norB, sepA) bulundurmalarının kapsamlı bir analizi yapılmıştır. Ayrıca antibiyotik ve biyosit direncinin ortak mekanizmalarından olan efluks pompa proteinlerinin inhibitörü olan rezerpinin, bu dirence etkisi araştırılmıştır.

Staphylococcus'lar, *S.aureus* gibi patojen türler dışında, hijyen ve sanitasyon standartlarında zararsız gıda kontaminantları oldukları düşünülerek ihmal edilmişlerdir. Fakat bu bakterilerin antibiyotik ve biyosit direnç genlerini bulundurmaları bu genleri taşıyan bakterilerin, gıdalar, üreticiler ve tüketicilere gıda zinciri aracılığıyla aktarılmasına sebep olacağından, toplum sağlığı açısından büyük risk oluşturacaktır.

Çalışmamızda izole edilen 77 *Staphylococcus* izolatının, 29'unun başta tetrasiklin (%23,4) olmak üzere sefuroksim (%14,3), ampisilin (%5,2), kloramfenikol (%3,9) ve nitrofurantoine (%2,6) dirençli olduğu tespit edilmiştir. Antibiyotik dirençli izolatların en çok sodyum hipoklorit (50 mg/ml - 6250 µg/ml, 3125-391 µg/ml) ve povidon iyodine (50 g/l - 6250 mg/l, 3125-391 mg/l) yüksek MİK değerleri gösterdiği belirlenmiş, daha sonra sırasıyla triklosan (512-64 µg/ml), hekzaklorofen (512 µg/ml), benzalkonyum klorit (512 µg/ml) ve klorhekzidine (32-4 µg/ml) yüksek MİK değeri gösteren izolatlar bulunmuştur. Sonuçlarımız değerlendirildiğinde, çalışılan antiseptik ve dezenfektanlara yüksek MİK değerleri gösteren izolatlarımızın bulunması, hayvan çiftliklerinde, gıda işleme ve satış yerlerinde, tedavi, hijyen ve sanitasyonun sağlanması için bu maddelerin kullanılmasının ciddi bir şekilde kontrol edilmesi ve düzenlemelerin arttırılması gerektiğini vurgulamaktadır. Bunun yanında, artmış MİK değerlerinin antiseptik ve dezenfektanların klinik uygulamalarında anlamı olmayabileceği düşünülmektedir, bunun sebebi bu maddelerin uygulama dozlarının MİK değerlerinden çok fazla miktarda olması ve antiseptik ve dezenfektanların mikrobiyal hücrelerde birçok hedefinin bulunmasıdır.

Hayvan beslenmesi ve kesimini yapan işletmelerde kullanılan alet ve gereçlerde hijyen ve sanitasyonun düzgün yapılmaması ve özellikle karkasların bağırsak içeriğinin de kontaminasyona sebep olması ile hayvansal gıdaların direnç genlerinin yayılması için önemli bir rezervuar haline gelmesine sebep olmaktadır. Araştırmamızda antibiyotik dirençli *Staphylococcus* izolatlarında en çok, tetrasiklin direnç geni tetK (%88,9), beta laktam grubu antibiyotiklere direnç geni bla (%53,8) ve efluks pompa genlerinden smr (%86,2), mdeA (%82,8), efrA (%79,3), efrB (%72,4), norE (%79,3), sepA (%51,7) ve sugE (%44,8) tespit edilmiştir. Bakterilerde bu genlerin bulunmasının, direncin kesinlikle bu genler sebebiyle olduğunu göstermeyeceği, genlerin ifade edilip edilmediği ve ifade miktarının da önemli olduğu belirtilmektedir. Bu sebeple çalışmamızda pozitif bulunan genlerin ifadesinin de ileri araştırmalarda test edilmesi gerektiği söylenmelidir.

Efluks pompalarının antimikrobiyal dirençte çok ciddi rol oynaması araştırmacıları insan ve hayvan tedavisinde kullanılacak klinik onaylı efluks pompası inhibitörü ilaçlar bulmaya yöneltmiştir. Bu sebeple ilk önce insanlarda kullanılmakta olan onaylı ilaçların inhibitör özelliklerinin araştırılması yapılmıştır. Rezerpin, antihipertansiyon ve antidepresan olarak kullanılan ve Gram pozitif bakterilerde efluks pompası inhibitörü olarak etkileri bizim çalışmamızda da (ampisiline dirençli 4 izolattan 1'inde, tetrasikline dirençli 18 izolatın 5'inde, sefuroksime dirençli 11 izolatın 11'inde, nitrofurantoine dirençli 2 izolatın 2'sinde rezerpin eklendikten sonra MİK değeri 4 kat ve daha fazla azalmıştır) gösterilmiş bir maddedir. Diğer bir taraftan da etkilerinin çok kuvvetli olmadığı, bakteriyel efluks pompa proteinlerini inhibe edecek plazma konsantrasyonlarına ulaşamadığı ve memeli efluks pompa proteinlerine zarar verebileceği gibi durumlar göz önünde bulundurularak, bu konuda çok daha fazla araştırma yapılması gerektiği vurgulanmaktadır.

Antiseptik ve dezenfektan maddeler hastanelerde ve toplumda sık kullanılan maddelerdir. Ancak gerek bizim çalışmamızda gerekse diğer benzer çalışmalarda görüldüğü üzere, bu maddelere karşı gelişen bir direnç söz konusudur. Bu maddelerin uygunsuz kullanılması var olan direnci daha da hızlandıracaktır. Sonuç olarak, *Staphylococcus* izolatlarımızda tetrasiklin direnç geni tetK (%88,9), beta laktam grubu antibiyotiklere direnç geni bla (%53,8) ve efluks pompa genlerinden smr (%86,2), mdeA (%82,8), efrA (%79,3), efrB (%72,4), norE (%79,3), sepA (%51,7) ve sugE (%44,8)'nin yüksek oranlarda bulunması,

antiseptik ve antibiyotiklere karşı direncin ileride bir sorun haline gelebileceğini göstermektedir.

Antimikrobiyal direnç gelişiminin efluks pompa inhibitörlerinin kullanımıyla belirli ölçüde geciktirilebilmesi umulmaktadır. Bu noktada efluks pompa inhibitörleri, potansiyel ajanlar olarak tüm dünyada yoğun bir şekilde araştırılırken, konuyla ilgili ülkemizde sınırlı sayıda klinik araştırma bulunmakta iken veterinerlik ve gıda alanında çalışma bulunmamaktadır. Uluslararası çalışmalarda yoğun bir şekilde araştırılmasına rağmen henüz klinik kullanımda pompa inhibitörlerinin örneği olmaması, bu konu ile ilgili çalışmaların arttırılması ve antibiyotik+beta laktamaz inhibitörü+dışa atım pompa inhibitörü şeklinde üçlü kombinasyonlar geliştirilerek antimikrobiyal direncinin önüne geçilebilmesi için yeni çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Ülkemizde, antibiyotik direncinde efluks pompa sistemlerinin ve dirençle mücadelede önerilen efluks pompa inhibitörlerinin kullanılması konusu ile ilgili klinik alanda yapılan sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Yaptığımız bu çalışma sonuçlarının gıda, klinik ve veterinerlik alanında ileride yapılacak çalışmalara öncülük edeceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Abulreesh, H. H. (2011). Multidrug-resistant staphylococci in the environment. *International Conference on Biotechnology and Environment Management*, 21, 179-184.

Ahmad, I., N. Nawaz, F. K. Dermani, A. K. Kohlan, M. Saidijam and S. G. Patching (2018). Bacterial multidrug efflux proteins: a major mechanism of antimicrobial resistance. *Current Drug Targets,* 18(1), 1-13.

Alqwai, O., G. Poelarends, W. N. Konings, and Georges E. (2003). Photoaffinity labeling under non-energized conditions of a specific drug-binding site of the ABC multidrug transporter LmrA from *Lactococcus lactis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 311(3), 696-701.

Andersen, J., He, G. X., Kakarla, P., KC, R., Kumar, S., Lakra, W., and Varela, M. (2015). Multidrug efflux pumps from *Enterobacteriaceae*, *Vibrio cholerae* and *Staphylococcus aureus* bacterial food pathogens. I*nternational Journal of Environmental Research and Public Health,* 12(2), 1487-1547.

Anes, J., McCusker, M. P., Fanning, S., and Martins, M. (2015). The ins and outs of RND efflux pumps in *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 587.

Aydin, A., Muratoglu, K., Sudagidan, M., Bostan, K., Okuklu, B., and Harsa, S. (2011). Prevalence and antibiotic resistance of foodborne *Staphylococcus aureus* isolates in Turkey. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(1), 63-69.

Aygül, A. (2015). Antibiyotik direncinde dışa atım sistemlerinin ve dirençle mücadele dışa atım pompa inhibitörlerinin önemi. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 49(2), 278-8291.

Aykan, S.B., Cağlar, K,. Engin, E.D., Sipahi, A.B., Sultan, N. ve Yalınay, M. Ç. (2013). Investigation of the presence of disinfectant resistance genes qacA/B in nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates and evaluation of their in vitro disinfectant susceptibilities. *Mikrobiyoloji Bülteni,* 47(1), 1-10.

Becker, A. P., Schneider, R., Dias, C. A., and Macedo, A. J. (2018). sepA gene is positively regulated in fluoroquinolones exposed MRSA-biofilm, *International Journal of Medical Science and Health Research*, 2(5), 30-36.

Bigliardi, P. L., Alsagoff, S. A. L., El-Kafrawi, H. Y., Pyon, J. K., Wa, C. T. C. and Villa, M. A. (2017). Povidone iodine in wound healing: A review of current concepts and practices. *International Journal of Surgery*, 44, 260-268.

Borgen, K., Simonsen, G.S., Sundsfjord, A., Wasteson, Y., Olsvik, Ø., and Kruse, H., (2000) Continuing high prevalence of vanA-type vancomycin-resistant Enterococci on Norwegian poultry farms three years after avoparcin was banned. *Jouurnal of Applied Microbiology*, 89, 478-485.

Braga, T.M., Pomba, C., and Lopes, M.F.S. (2013). High-level vancomycin resistant *Enterococcus faecium* related to humans and pigs found in dust from pig breeding facilities. *Veterinary Microbiology*, 161, 344–349.

Çağlar, K. (2005). *Dezenfektanlara Direnç Gelişim Mekanizmaları Dezenfeksiyon İşlemini Ne Kadar Tehdit Etmektedir*. 4. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi Kitabı, Ankara, 702-714.

Can, Y. ve Çelik, H. (2008). Kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde antibiyotik kullanımı ve kalıntı riski. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 79(4), 35-40.

Capita, R. and Alonso-Calleja, C. (2013). Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(1), 11-48.

Chajecka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., Nalepa, B., Sierpińska, M. and Łaniewska-Trokenheim, Ł. (2015). Coagulase-negative staphylococci (CoNS) isolated from ready-to-eat food of animal origin–phenotypic and genotypic antibiotic resistance. *Food Microbiology*, 46, 222-226.

Chan, M. K. L., Koo, S. H., Quek, Q., Pang, W. S., Jiang, B., Ng, L. S. Y., Tan, S. H. and Tan, T. Y. (2018). Development of a real-time assay to determine the frequency of qac genes in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Microbiological Methods*, 153, 133-138.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2011). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-first informational supplement*. M100-S21. Wayne, PA, USA, 21-28.

Costa, S. S., Viveiros, M., Amaral, L., and Couto, I. (2013). Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: an update. *The Open Microbiology Journal*, 7, 59.

Coton, E., Desmonts, M. H., Leroy, S., Coton, M., Jamet, E., Christieans, S. and Talon, R. (2010). Biodiversity of coagulase-negative staphylococci in French cheeses, dry fermented sausages, processing environments and clinical samples. *International Journal of Food Microbiology*, 137(2-3), 221-229.

Çiftçi, A. ve Aksoy, A. (2015). Antibiyotiklere karşı oluşan direnç mekanizmaları. *Turkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences-Pharmacology and Toxicology-Special Topics*, 1(2), 1-10.

Çitak, S. ve Duman, T. (2011). *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* from raw chicken samples in Turkey: Prevalence and antimicrobial resistance. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 9(1), 156-158.

Dafe, A. Y. (2012). *Tavuk etlerinde Staphylococcus aureus izolasyonu, PCR yöntemi ile enterotoksin tiplendirilmesi ve mecA, tetM, tetK, ermA, ermC genlerinin saptanması*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-83.

De Vos, P. and Garrity, G.M. (2009). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer, USA, 392-420.

Demirtürk, N. ve Demirdal, T. (2004). Antibiyotiklerde direnç sorunu. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 5(2), 17-21.

Doyle, M.E., (2006). Veterinary drug residues in processed meats - potential health risk. A review of the scientific literature. Food Research Institute, University of Wisconsin–Madison, 1-11.

Ertekin, E., Hatt, J. K., Konstantinidis, K. T. and Tezel, U. (2016). Similar microbial consortia and genes are involved in the biodegradation of benzalkonium chlorides in different environments. *Environmental Science & Technology*, 50(8), 4304-4313.

Eryılmaz, M. ve Akın, A. (2008). Dezenfeksiyon ve antisepsi. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 37(4), 311-331.

Fernández-No, I., Böhme, K., Caamaño-Antelo, S., Barros-Velázquez, J. and Calo-Mata, P. (2015). Identification of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the 16S rDNA gene of foodborne *Bacillus* spp. *Food Microbiology*, 46, 239-245.

Fraise, A. (2002). Susceptibility of antibiotic-resistant cocci to biocides. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 158-162.

Frazzon, A.P.G., Gama, A.B., Hermes, V., Bierhals, C.G, Pereira, R.I., Guedes, A.G., D'azevedo, P., and Frazzon, J. (2010). Prevalence of antimicrobial resistance and molecular characterization of tetracycline resistance mediated by *tet*(M) and *tet*(L) genes in *Enterococcus* spp. isolated from food in southern Brazil. *World Journal of Microbiologic Biotechnology*, 26, 365-370.

Fuentes, M.A., Abriouel, H., Morente, E. O., Pulido, R. P. and Gálvez, A. (2014).Genetic determinants of antimicrobial resistance in Gram positive bacteria from organic foods. *International Journal of Food Microbiology*, 172, 49-56.

Fuentes, M.A., Morente, E.O., Abriouel, H., Pulido, R., and Galvez, A., (2012). Isolation and identification of bacteria from organic foods: Sensitivity to biocides and antibiotics. *Food Control*, 26, 73-78.

Fukuzaki, S. (2006). Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. *Biocontrol Science*, 11(4), 147-157.

Gadea, R., Fuentes, M. Á. F., Pulido, R. P., Gálvez, A., and Ortega, E. (2017). Effects of exposure to quaternary-ammonium-based biocides on antimicrobial susceptibility and tolerance to physical stresses in bacteria from organic foods. *Food Microbiology*, 63, 58-71.

Garcia-Ovando H., Gorla, N., Weyers, A., Ugnia, L., Magnoli, A., (2004). Simultenous quantification of ciprofloxacin, enrofloxacin and balofloxacin in broiler chicken muscle. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 36, 93-98.

Ge, B., Mukherjee, S., Hsu, C.-H., Davis, J. A., Tran, T. T. T., Yang, Q., Abbott, J. W., S Ayers, L., Young, S. R., and Crarey, E. T. (2017). MRSA and multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in US retail meats, 2010–2011. *Food Microbiology*, 62, 289-297.

Gibbons, S., Oluwatuyi, M., and Kaatz, G.W. (2003). A novel inhibitor of multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, 7-13.

Gibbons, S. and Udo, E. E. (2000). The effect of reserpine, a modulator of multidrug efflux pumps, on the in vitro activity of tetracycline against clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) possessing the tet (K) determinant. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 14(2), 139-140.

Güçlü, B. (2019). *Tuzlanmış küçükbaş hayvan derilerinden elde edilen ılımlı halofil bakterilerin esteraz ve lipaz aktivitelerinin tespit edilmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 1-53.

Gündoğan, N. ve Ataol, Ö. (2012). Et örneklerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* ve koagülaz negatif stafilokok'ların biyofilm üretimi ve DNaz aktivitelerinin belirlenmesi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 69(3), 135-142.

Hasdemir, U. (2007). Çoklu ilaç direncinde bakteri hücre duvarı organizasyonu ve aktif pompa sistemlerinin rolü. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 41, 309-327.

Hassanzadeh, S., Mashhadi, R., Yousefi, M., Askari, E., Saniei, M. and Pourmand, M. R. (2017). Frequency of efflux pump genes mediating ciprofloxacin and antiseptic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Microbial Pathogenesis*, 111, 71-74.

Holah, J., Taylor, J., Dawson, D., and Hall, K. (2002). Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of Listeria monocytogenes and Escherichia coli. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 111-120.

Hughes, C. and Ferguson, J. (2017). Phenotypic chlorhexidine and triclosan susceptibility in clinical *Staphylococcus aureus* isolates in Australia. *Pathology*, 49(6), 633-637.

Ignak, S. , Nakipoglu Y., Gurler, B**.** (2017). Frequency of antiseptic resistance genes in clinical staphylococci and enterococci isolates in Turkey. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 6, 88.

İnternet: Mannitol Salt Agarda *Staphylococcus* görüntüsü. URL: http://www.bacteriainphotos.com/mannitol_agar.html**,** Son Erişim Tarihi: 29.11.2019.

İnternet: Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği (29.12.2011). URL: https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111229M3-6.htm, Son Erişim Tarihi: 29.11.2019.

Jomha, M. Y., Yusef, H. and Holail, H. (2014). Antimicrobial and biocide resistance of bacteria in a Lebanese tertiary care hospital. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2(4), 299-305.

Kang, S., Lee S., and Choi S. (2013). Distribution of multidrug pump gengs in Enterococci spp. Isolated from bovine milk samples and their antibiotic resistance patterns. *Korean Journal Of Microbiology*, 49(2), 126-130.

Keskin, D. ve F. Kök (2007). Mikroorganizmaların gıda işletmelerinde kullanılan dezenfektanlara karşı direnci. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 16(4), 308-317.

Kumar, S., Mukherjee, M. M. and Varela, M. F. (2013). Modulation of bacterial multidrug resistance efflux pumps of the major facilitator superfamily. *International Journal of Bacteriology*, 2013(1), 1-15.

Koçyiğit, R., Yılmaz, O., Özenç, E. ve Uçar, M. (2016). Effect of some risk factors on subclinical mastitis in dairy cows. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 9(3), 185-193.

Lange, C. C., Brito, M. A., Reis, D. R., Machado, M. A., Guimaraes, A. S., Azevedo, A. L., Salles, E. B., Alvim, M. C. T., Silva, F. S. And Meurer, I. R. (2015). Species-level identification of staphylococci isolated from bovine mastitis in Brazil using partial 16S rRNA sequencing. *Veterinary Microbiology*, 176(3-4), 382-388.

Lange, D.L. and Brokking, D.H., (2005). Nutribiotics could replace antibiotics in feed. *World Poultry*, 10(21), 26-28.

Langsrud, S., Singh, S.M., Heir, E., and Holck, A. L., (2003). Bacterial disinfectant resistance—a challenge for the food industry. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51, 283-290.

Lerma, L.L., Benomar, N., Galvez, A., and Abrioul, H., (2013). Prevalence of bacteria resistannt to antibiotics and biocides on meat processing plant surfaces throuhout meat chain production, *International Journal of Food Microbiology*, 161, 97-106.

Lerma, L. L., Benomar, N., Valenzuela, A. S., Muñoz, M. D. C. C., Gálvez, A., and Abriouel, H. (2014). Role of EfrAB efflux pump in biocide tolerance and antibiotic resistance of *Enterococcus* faecalis and *Enterococcus* faecium isolated from traditional fermented foods and the effect of EDTA as EfrAB inhibitor. *Food Microbiology*, 44, 249-257.

Li, X. Z., and Nikaido, H. (2009). Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*, 69(12), 1555-1623.

Li, X. Z., Elkins, C. A., and Zgurskaya, H. I. (Eds.) (2016). *Efflux-mediated antimicrobial resistance in bacteria: mechanisms, regulation and clinical implications*. USA:Springer, 165-190.

Liu, Q., Zhao, H., Han, L., Shu, W., Wu, Q. and Ni, Y. (2015). Frequency of biocide-resistant genes and susceptibility to chlorhexidine in high-level mupirocin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MuH MRSA). *Diagnostic Microbiology and İnfectious Disease*, 82(4), 278-283.

Maes, N., Magdalena, J., Rottiers, S., Gheldre, Y. and Struelens, M. J. (2002). Evaluation of a triplex PCR assay to discriminate *Staphylococcus aureus* from coagulase negative staphylococci and determine methicillin resistance from blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 1514–1517.

Marquez, B. (2005). Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. *Biochimie*, 87(12), 1137-1147.

Marquez, M.L.F., Burgos, G., Aguayo, C.L., Pulido, R.P., Galvez, A., and Lucas, R. (2017). Chracaterization of biyoside- tolerant bacteria isolated from cheese and dairy small-medium enterprises. *Food Microbiology*, 62, 77-51.

Metin, M. ve Öztürk, F., (1995). *Süt işletmelerinde sanitasyon*. İzmir: Ege Üniversitesi Meslek Yüksek Okulu Yayınları, 410.

Meyer, E., Lumke, C., Kist, M.,Schwab F., and Frank, U., (2008). Antimicrobial resistance in *E. coli* strains isolates from food, animals and humans Germany. *İnfection*, 36, 59-61.

Miles, TD., McLaughlin W., and Brown, P.D.(2006), Antimicrobial resistance of E. coli isolates, from broiler chickens and humans. *BMC Veteranary Research,* 2-7.

Morente, E.A., Fuentes, M.A., Burgos, M.J., Abriouel, H., Pulido R.P., and Galvez, A., (2013). Biocide tolerance in bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 162, 13–25.

Nakipoğlu, Y., Iğnak, S. Gürler N. ve Gürler B., (2012). Klinik *Staphylococcus aureus* suşlarında antiseptik direnç genlerinin (qaca/b ve smr) ve antibiyotik maddelere direnç prevalansının araştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 46(2), 180-189.

Navidinia, M. and Goudarzi, M. (2019). Overview perspective of bacterial strategies of resistance to biocides and antibiotics. *Archives of Clinical Infectious Diseases*, 14(2), 1-8.

Ogbolu, D.O., Alli, O.A.T., Oluremi, A. S. and Onifade, C.O. (2018). Erythromycin resistance determinants in clinical Gram positive cocci isolated from nigerian patients. *Journal of Clinical & Diagnostic Research*, 12(10), 5-10.

Onni, T., Sanna, G., Larsen, J., and Tola, S. (2011). Antimicrobial susceptibilities and population structure of *Staphylococcus* epidermidis associated with ovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 148(1), 45-50.

Özçelik, B., Çıtak, S., (2009) Evaluation of antibiotic resistance of *Bacillus cereus* isolates ice-cream samples sold in Ankara. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6 (3), 231-238.

Özdemir D. (2002). Dezenfektanlara direnç. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 4(3), 39-44.

Özdemir, H. and Keyvan, E. (2016). Isolation and characterisation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from beef, sheep and chicken meat. *Ankara Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi,* 63, 333-338.

Özpinar, N. and Gümüşsoy, K. S. (2013). Phenotypic and genotypic determination of antibiotic resistant and biofilm forming *Staphylococcus aureus* isolated in Erzincan tulum cheese. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 19(3), 517-521.

Öztürk R., (2002). Antimikrobik ilaçlara karşı direnç geliştirme mekanizmaları ve günümüzde direnç durumu. Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi No: 31, *İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri*, 83-100.

Pages, J. M. and Amaral, L. (2009). Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1794(5), 826-833.

Paharik, A. E., Kotasinska, M., Both, A., Hoang, T. M. N., Büttner, H., Roy, P., Fey, P. D., Horswill, A. R. and Rohde, H. (2017). The metalloprotease Sep A governs processing of accumulation-associated protein and shapes intercellular adhesive surface properties in *Staphylococcus epidermidis*. *Molecular Microbiology*, 103(5), 860-874.

Patel, D., Kosmidis, C., Seo, S. M., and Kaatz, G. W. (2010). Ethidium bromide MIC screening for enhanced efflux pump gene expression or efflux activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(12), 5070-5073.

Paul, D., Chakraborty, R., and Mandal, S. M. (2019). Biocides and health-care agents are more than just antibiotics: Inducing cross to co-resistance in microbes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 174, 601-610.

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

Piessens, V., De Vliegher, S., Verbist, B., Braem, G., Van Nuffel, A., De Vuyst, L., Heyndrickx, M., and Van Coillie, E. (2012). Characterization of coagulase-negative *Staphylococcus* species from cows' milk and environment based on bap, icaA, and mecA genes and phenotypic susceptibility to antimicrobials and teat dips. *Journal of Dairy Science*. 95(12), 7027-7038.

Poole, K. (2002). Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 55-64.

Poole, K. (2005). Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(1), 20-51.

Raafat, S.A., Abo-Elmagd, E.K., Awad, R.A., and Hassan, E.M. (2016). Prevalence of vancomycin-resistant *Enterococci* in different food samples. *Egypt Journal of Medical Microbiology*, 25, 47-55.

Resch, M., Nagel, V., and Hertel, C. (2008). Antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci associated with food and used in starter cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 127(1-2), 99-104.

Resende, J. A., Fontes, C. O., Ferreira-Machado, A. B., Nascimento, T. C., Silva, V. L., and Diniz, C. G. (2018). Antimicrobial-Resistance Genetic Markers in Potentially Pathogenic Gram Positive Cocci Isolated from Brazilian Soft Cheese. *Journal Of Food Science*, 83(2), 377-385.

Rodrigues, M. X., Silva, N. C. C., Trevilin, J. H., Cruzado, M. M. B., Mui, T. S., Duarte, F. R. S., Castillo, C. J. C., Canniatti-Brazaca, S.G. and Porto, E. (2017). Molecular characterization and antibiotic resistance of *Staphylococcus* spp. isolated from cheese processing plants. *Journal of Dairy Science*, 100(7), 5167-5175.

Rosenbach, A. J. F. (1884). *Mikro-organismen bei den Wund-infections-krankheiten des Menschen*. JF Bergmann, 187-196.

Saka, E. and Terzi Gulel, G. (2018). Detection of Enterotoxin Genes and Methicillin-Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolated from Water Buffalo Milk and Dairy Products. *Journal of Food Science*, 83(6), 1716-1722.

SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks) (2009). *Assessment of the antibiotic resistance effects of biocides*. *European Commission*, Health & Consumer Protection, 125-217.

Schmitz, F. J., Fluit, A. C., Lückefahr, M., Engler, B., Hofmann, B., Verhoef, J., Heinz, H.P., Hadding, U. and Jones, M. E. (1998). The effect of reserpine, an inhibitor of multidrug efflux pumps, on the in-vitro activities of ciprofloxacin, sparfloxacin and moxifloxacin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 42(6), 807-810.

Schmitz, F.J., Perdikouli, M., Beeck, A., Verhoef, J., and Fluit, A. C. (2001). Resistance to trimethoprim–sulfamethoxazole and modifications in genes coding for dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase in European Streptococcus pneumoniae isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(6), 935-936.

Seasotiya L. and Dalal, S. (2014). Screening of Indian medicinal plants as efflux pump inhibitors of fluoroquinolones. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3 (1), 235-241.

Souza, G. A. A. D., Almeida, A. C., Xavier, M. A. S., Silva, L. M. V., Sousa, C. N., Sanglard, D. A. and Xavier, A. R. E. O. (2019). Characterization and molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* strains resistant to beta-lactams isolated from the milk of cows diagnosed with subclinical mastitis, *Veterinary World*, 12 (12), 1931-1939.

Şencan, İ. (2003). *Dezenfektanlara direnç sorunu ve pratik önem*i. Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon Kongresi, Samsun, 257-268.

Simeoni, D., Rizzotti, L., Cocconcelli, P., Gazzola, S., Dellaglio, F., and Torriani, S. (2008). Antibiotic resistance genes and identification of staphylococci collected from the production chain of swine meat commodities. *Food Microbiology*, 25(1), 196-201.

Suller, M.T.E. and Russel, A.D., (1999). Antibiotic and biocide resistance in methicillin-resistant Stuphylococcus *aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus. Journal of Hospital İnfection*, 43, 28-29.

Sun, J., Deng, Z. And Yan, A., (2014). Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 453(2), 254-67.

Swick, M. C., Morgan-Linnell, S. K., Carlson, K. M., and Zechiedrich, L. (2011). Expression of multidrug efflux pump genes acrAB-tolC, mdfA, and norE in Escherichia coli clinical isolates as a function of fluoroquinolone and multidrug resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(2), 921-924.

Tanrıbuyurdu, E. (2014). *Sığır mastitislerinden izole edilen Staphylococcus aureus suşlarında biofilm oluşumu ve antibiyotiklere dirençliliğinin belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın, 1-38.

Tel, O. Y., Bayraktar, M., and Keskin, O. (2012). Investigation of antibiotic resistance among *Staphylococcus aureus* strains of human and bovine origin. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 59(3), 191-196.

Ullah, F., Malik, S. A., Ahmed, J., Shah, S. M., Ayaz, M., Hussain, S. and Khatoon, L. (2012). Investigation of the genetic basis of tetracycline resistance in *Staphylococcus aureus* from Pakistan. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 11(6), 925-931.

Vakulenko, S. B., Donabedian, S. M., Voskresenskiy, A. M., Zervos, M. J., Lerner, S. A. and Chow, J. W. (2003). Multiplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in enterococci. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(4), 1423-1426.

Weber, D. J., Rutala, W. A., and Sickbert-Bennett, E. E. (2019). Use of germicides in health care settings—is there a relationship between germicide use and antimicrobial resistance: A concise review. *American Journal of Infection Control*, 47, 106-109.

Woo, P. C. Y., Leung, A. S. P., Leung, K. W. and Yuen, K. Y. (2001). Identification of slide coagulase positive, tube coagulase negative *Staphylococcus aureus* by 16S ribosomal RNA gene sequencing. *Molecular Pathology*, 54(4), 244.

Worthing, K. A., Marcus, A., Abraham, S., Trott, D. J., and Norris, J. M. (2018). Qac genes and biocide tolerance in clinical veterinary methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius*. *Veterinary Microbiology*, 216, 153-158.

Yılmaz, ES., Aslantaş, Ö., Önen, S.P., Türkyılmaz, S. and Kürekci, C. (2016). Prevalence, antimicrobial resistance and virulence traits in enterococci from food of animal origin in Turkey. *Food Science and Technology*, 66, 20-26.

Yüce, A. (2001). Antimikrobik İlaçlara Direnç Kazanma Mekanizmaları. *Klimik Dergisi*, 14(2), 41-46.

Yurdakul, N.C., Enginkaya, Z., and 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.

Zarakolu, D. P. (2003). *Mikroorganizmalarda direnç mekanizması olarak aktif pompa sistemleri*. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İnfeksiyon Hastalıkları Ünitesi, Ankara, 1-5.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : KÜLAHCI, Meryem Burcu

Uyruğu : T.C.

Doğum tarihi ve yeri : 24.10.1987, Antakya

Medeni hali : Evli

Telefon : 0 (312) 202 15 15

e-mail : meryemburcu@gazi.edu.tr



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi / Fen Fakültesi, Biyoloji	Devam ediyor
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi / Fen Fakültesi, Biyoloji	2011
Lisans	Gazi Üniversitesi / Fen Fakültesi, Biyoloji	2008
Lise	Hatay Osman Ötken Anadolu Lisesi	2004

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2009-Halen	Gazi Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Çıtak S., Öcal Ş.C. and Külahcı M.B., (2015), Antibiotic Resistance and Slime Production in Coagulase-Negative *Staphylococcus* Strains from Retail Meat Samples, *Gazi University Journal of Science*, 28(3), 359-364.

Gundogan, N., Kulahci, M.B. and Yavas, E.S. (2019). Amino acid decarboxylase activity, biofilm formation and antibiotic resistance of gram-negative bacteria isolated from marine fish, calf meat and chicken. *Journal Of Food Safety And Food Qualıty-Archiv Fur Lebensmıttelhygıene*, 70(4), 99-110.

Hobiler

Kitap okuma, müzik dinleme, sinema



GAZİ GELECEKTİR..