

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANA BİLİM DALI



MASTİTİS KÖKENLİ STAFİLOKOK SUŞLARININ  
EBSELENE VE ANTİBİYOTİKLERE KARŞI DUYARLILIK  
DURUMLARININ ARAŞTIRILMASI

Yüksek Lisans Tezi

**Gizem PİR**

Danışman

**Doç. Dr. Arzu FINDIK**

Bu tez çalışması, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırmaları Destekleme Kurulu tarafından PYO.VET.1904.20.023 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN  
2022

## BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Yüksek Lisans tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet  (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır

İmza  
... /01/2022  
Gizem PİR

## TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

**Tez Başlığı:** MASTİTİS KÖKENLİ STAFİLOKOK SUŞLARININ EBSELENE VE ANTİBİYOTİKLERE KARŞI DUYARLILIK DURUMLARININ ARAŞTIRILMASI

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 12.01.2022 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 9

Tek kaynak oranı : % 1 çıkmıştır.

İmza  
... /01/2022  
Doç. Dr. Arzu FINDIK

**ÖZET**  
**MASTITİS KÖKENLİ STAFİLOKOK SUŞLARININ EBSELENE VE**  
**ANTİBİYOTİKLERE KARŞI DUYARLILIK DURUMLARININ**  
**ARAŞTIRILMASI**

Gizem PİR  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü  
Veterinerlik Mikrobiyolojisi Ana Bilim Dalı  
Yüksek Lisans, Şubat/2022  
Danışman: Doç. Dr. Arzu FINDIK

Tüm dünyada büyük ekonomik kayıplara neden olan sığır mastitislerinin en yaygın bakteriyel etkenlerinden biri stafilokoklardır. Stafilokokların neden olduğu mastitis vakalarının tedavisinde zorluklar olup bunun en büyük nedeni antibiyotiklere karşı direnç gelişmesidir (AMR). Etkenlerin çoklu antibiyotik direnci gösterme durumları sorunun boyutunu artırmaktadır. AMR'ye çözüm olarak alternatifler içerisinde "repurposing-yeniden amaçlandırma" yer almaktadır.

Bu çalışmada, antioksidan ve antiinflamatuvar amaçla kullanılan ebselenin, mastitis kökenli, özellikle de metisilin dirençli ve çoklu antibiyotik direnci gösteren stafilokoklarda antibakteriyel etkinliğinin *in vitro* olarak değerlendirilmesi amaçlandı.

Anabilimdalı kültür koleksiyonunda bulunan 24 adet *S.aureus* izolatı, 34 adet non-*S.aureus* izolatı kullanıldı. İzolatların *coa* tiplendirmesinde, *S.aureus*'ların yedi farklı, NSA'ların ise iki farklı grup oluşturduğu belirlendi. İzolatların fenotipik biyofilm üretimlerinin inceleme sonuçları, *S.aureus*'ların 18 (%75)'inin, NSA'ların ise tamamının fenotipik olarak biyofilm ürettiğini gösterdi. *icaA* ve *icaD* gen-hedefli PCR'da, *S.aureus* izolatlarının 3'ünde *icaA*, 6'sında *icaD*, NSA izolatlarından 2'sinde *icaD*, 13'ünde *icaA* geni belirlendi. *S.aureus*'ların tamamının sefoksitin, sefaperazon, tigesiklin, enrofloksasin ve amoksisilin+klavulanik aside duyarlı, 8 izolatın okzasiline duyarlı, 6'sının ise orta derecede duyarlı olduğu belirlendi. İzolatlardan birinin sefalotine, 6'sının tetrasikline, 5'inin daptomisine, birinin vankomisine, 4'ünün trimetoprim+sulfometokzazole, 2'sinin neomisine ve 10'unun linkomisine dirençli olduğu saptandı. NSA'lardan birinin amoksisilin+klavulanik aside, 17'sinin okzasiline, ikisinin sefoksitine, 5'inin sefalotine, 30'unun sefaperazona, 7'sinin tetrasikline, birinin tigesikline, 2'sinin vankomisine, 12'sinin daptomisine, birinin enrofloksasine, 4'ünün trimetoprim+sulfometokzazole, 7'sinin neomisine ve 20'sinin linkomisine dirençli olduğu belirlendi. Ebselenin antibakteriyel etkisinin değerlendirildiği mikrobuyyon dilüsyon testinde, *S.aureus* izolatları için 0,125µg/ml-32µg/ml, NSA izolatları için 0,125µg/ml-4µg/ml MİK değerleri belirlendi.

Sonuç olarak, "repurposing-yeniden amaçlandırma" kapsamında araştırılan ebselenin, tarih sürecinde pek çok antibiyotiğe direnç geliştiren ve hatta çoklu antibiyotik direnci sergileyen stafilokokların neden olduğu mastitislerin tedavisine alternatif bir çözüm olabileceği, ebselenin etkinliğinin hem *in vitro* hem de *in vivo* ileri çalışmalarda değerlendirilmesi gerektiği ve ebselenin pratikte kullanılabilirliğinin araştırılması gerektiği düşünülmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Ebselen, MİK, MRSA, Stafilokok, Yeniden Amaçlandırma

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF SUSCEPTIBILITY OF MASTITIS ORIGINATED STAPHYLOCCUS STRAINS TO EBSELEN AND ANTIBIOTICS

Gizem PİR

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Veterinary Microbiology

Master, February/2022

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Arzu FINDIK

Staphylococci are one of the most common bacterial agents of bovine mastitis, which cause great economic losses all over the world. There are difficulties in the treatment of mastitis cases caused by staphylococci, and the main reason for this is the development of resistance to antibiotics (AMR). The fact that the agents show multiple antibiotic resistance increases the size of the problem. As a resolution to AMR, "repurposing" is among the alternatives.

In this study, it was aimed to evaluate in vitro the antibacterial activity of ebselen, which is used for antioxidant and anti-inflammatory purposes, in mastitis origin, especially methicillin-resistant and multi-antibiotic resistant staphylococci.

24 *S.aureus* isolates and 34 non-*S.aureus* isolates in the culture collection of the department were used. In the coa typing of the isolates, it was determined that *S.aureus* formed seven different groups and NSAs formed two different groups. The phenotypic biofilm production of the isolates, the results of one thousand examinations, showed that 18 (75%) of *S. aureus* and all of the NSAs produced biofilms phenotypically. In *icaA* and *icaD* gene-targeted PCR, *icaA* gene was determined in 3 of *S.aureus* isolates, *icaD* gene in 6 isolates, *icaD* gene in 2 of NSA isolates and *icaA* gene in 13 isolates. It was determined that all *S.aureus* strains were sensitive to ceftiofur, cefepime, tigecycline, enrofloxacin and amoxicillin+clavulanic acid, 8 isolates were susceptible to oxacillin, and 6 were moderately susceptible. It was determined that one of the isolates was resistant to cephalothin, 6 to tetracycline, 5 to daptomycin, 1 to vancomycin, 4 to trimethoprim+sulfamethoxazole, 2 to neomycin and 10 to lincomycin. One of the NSAs is amoxicillin+clavulanic acid, 17 are oxacillin, two are ceftiofur, 5 are cefepime, 30 are cefepime, 7 are tetracycline, one is tigecycline, 2 is vancomycin, 12 is daptomycin, one is enrofloxacin, 4. It was determined that 7 of them were resistant to trimethoprim+sulfamethoxazole, 7 of them were resistant to neomycin and 20 of them were resistant to lincomycin. MIC values of 0.125 µg/ml–32 µg/ml for *S.aureus* isolates and 0.125 µg/ml–4 µg/ml for NSA isolates were determined in the microdilution test, in which the antibacterial effect of Ebselen was evaluated.

As a result, ebselen researched within the scope of "repurposing" may be an alternative resolution to the treatment of mastitis caused by staphylococci that have developed resistance to many antibiotics and even exhibited multi-antibiotic resistance throughout history. It is thought that the usability of ebselen in practice should be investigated.

**Keywords:** Ebselen, MIC, MRSA, Repurposing, Staphylococci

## ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmalarım süresince tüm sabrı ile değerli bilgi ve önerileriyle bana yol gösteren danışman hocam Sayın Doç.Dr. Arzu FINDIK'a Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Timur GÜLHAN, Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ, Prof. Dr. Oktay GENÇ, Araş. Gör. Merve Gizem SEZENER'e, her aşamasında yardımını esirgemeyen Veteriner Hekim Sinan PİR ile doktora öğrencileri Veteriner Hekim Şeyda Yaman ve Veteriner Hekim Volkan Enes ERGÜDEN'e ayrıca tüm bu süreçte desteklerini eksik etmeyen canım ailem ve sevgili arkadaşlarıma teşekkür ederim. Ayrıca tez çalışmasını destekleyen Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırmaları Destekleme Kurulu'na teşekkür ederim.

Gizem PİR

# İÇİNDEKİLER

<b>TEZ KABUL VE ONAYI</b> .....	<b>i</b>
<b>BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI</b> .....	<b>ii</b>
<b>TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI</b> .....	<b>ii</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iv</b>
<b>ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR</b> .....	<b>v</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>vi</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	<b>viii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>TABLOLAR DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1. Mastitis.....	3
2.2. Mastitis Teşhisi.....	3
2.3. Mastitisin Bakteriyel Etiyolojisi.....	4
2.4. Mastitis Etkeni Olarak <i>Staphylococcus</i> spp.....	5
2.5. Mastitis Tedavisinde Kullanılan Antibakteriyeller.....	7
2.6. Antibiyotiklere Karşı Direnç Sorunu.....	8
2.7. Antibiyotik Dirençliliğine Çözüm Stratejileri.....	10
2.8. Yeniden Amaçlandırma (“Repurposing”).....	13
2.9. Ebselen ve Antibakteriyel Etkisi.....	15
<b>3. MATERYAL-METOT</b> .....	<b>17</b>
3.1. <i>Staphylococcus</i> spp. İzolatları.....	17
3.2. Kullanılan Besi Yerleri.....	17
3.3. İzolatların Canlandırılması.....	17
3.4. İzolatların İdentifikasyonu.....	17
3.4.1. Fenotipik İdentifikasyon.....	17
3.4.2. Genotipik İdentifikasyon.....	17
3.5. Koagulaz Üretiminden Sorumlu <i>coa</i> Geninin Belirlenmesi.....	19
3.6. İzolatların Biyofilm Özelliklerinin Belirlenmesi.....	19
3.6.1. Biyofilm Oluşturma Özelliğinin Fenotipik Olarak İncelenmesi.....	19
3.6.2. Biyofilm Oluşturma Özelliğinin Genotipik Olarak Belirlenmesi.....	19
3.7. İzolatların Antibiyotik Duyarlılık Profillerinin Belirlenmesi.....	20
3.8. <i>mecA</i> Geninin Belirlenmesi.....	21
3.9. Ebselenin Antibakteriyel Etkinliğinin Mikrobuyyon Dilüsyon Yöntemi ile Belirlenmesi.....	22
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA</b> .....	<b>24</b>
4.1. İzolatların İdentifikasyonları.....	24
4.2. İzolatların <i>coa</i> Gen Profillerinin Belirlenmesi.....	25
4.3. İzolatların Biyofilm Özelliklerinin Belirlenmesi.....	30
4.3.1. Fenotipik Olarak Biyofilm Özelliklerinin Belirlenmesi.....	30

4.3.2. Genotipik Olarak Biyofilm Özelliklerinin Belirlenmesi.....	32
4.4. Antibiyotik Duyarlılık Profilinin ve Çoklu Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi .....	35
4.5. <i>mecA</i> Gen Varlığının Belirlenmesi .....	45
4.6. Ebselen Antibakteriyel Etkisinin Araştırılması.....	48
4.7. İzolatların Bazı Virülens Faktörlerinin ve Ebselene Duyarlılıklarının Ortak Değerlendirilmesi.....	53
<b>5. SONUÇ .....</b>	<b>57</b>
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>60</b>
<b>ÖZ GEÇMİŞ.....</b>	<b>68</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

AMR	: Antimikrobiyal Direnç
CMT	: California Mastitis Test
CRA	: Kongo kırmızısı Agar
FDA	: Gıda ve İlaç Dairesi
FTS	: Fizyolojik Tuzlu Su
<i>ica</i>	: İntrasellüler adezyon
KNS	: Koagulaz Negatif Stafilokok
KP-SA	: Koagulaz Pozitif <i>S. aureus</i>
KP-NSA	: Koagulaz Pozitif non- <i>S. aureus</i>
MDR	: Çoklu Antibiyotik Direnci
MİK	: Minimal İnhibitör Konsatrasyonu
MRSA	: Metisilin Dirençli <i>S. aureus</i>
MSA	: Mannitol Tuz Agar
NSA	: Non- <i>S. aureus</i>
OD-MRSA	: Okzasilin Duyarlı Metisilin Dirençli <i>S. aureus</i>
OIE	: Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü
PBP	: Penisilin Bağlayıcı Protein
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. MİK hesaplanmasında kullanılan stok solüsyonun hazırlanması.....	22
Şekil 3.2. MİK'te kullanılan ebselenin sulandırma oranları.....	23
Şekil 3.3. Mikrobuyyon dilüsyon metodunun şematik görünüşü.....	23
Şekil 4. 1. MSA'da <i>S. aureus</i> 'un fenotipik identifikasyonu .....	24
Şekil 4. 2. PCR ile yapılan <i>Staphylococcus</i> spp. ve <i>S. aureus</i> 'un genotipik identifikasyonu .....	25
Şekil 4. 3. <i>coa</i> geninin tespit edilmesine yönelik yapılan PCR'ın görüntülemesi .....	26
Şekil 4. 4. <i>coa</i> geninin NSA izolatlarındaki varlığının PCR ile tespit edilmesi .....	26
Şekil 4. 5. Fenotipik olarak biyofilm oluşturan/oluşturmeyen izolatların CRA'da belirlenmesi .....	31
Şekil 4. 6. <i>mecA</i> gen varlığının PCR ile araştırılması .....	46
Şekil 4. 7. MİK belirlenmesinde kullanılan mikrobuyyon dilüsyon tekniğinin temsili görüntüsü.....	49
Şekil 4. 8. Fenotipik/Genotipik olarak metisiline dirençli/duyarlı olan izolatların yüzdeleri ve enselenin MİK aralığı .....	50
Şekil 4. 9. Fenotipik/Genotipik olarak metisiline dirençli/duyarlı olan izolatların yüzdeleri ve enselenin MİK aralığı .....	50

## TABLolar DİZİNİ

Tablo 3. 1. Stafilokokların tür ve cins düzeyinde identifikasyonunda kullanılan oligonükleotidler .....	18
Tablo 3. 2. 16S rRNA ve <i>nuc</i> geni için amplifikasyon koşulları .....	18
Tablo 3. 3.. Biyofilm oluşumundan sorumlu genlerin oligonükleotid dizilimleri ve bant büyüklükleri.....	20
Tablo 3. 4. <i>icaA</i> ve <i>icaD</i> gen varlıklarının tespit edilmesinde kullanılan amplifikasyon koşulları.....	20
Tablo 3. 5. Metisilin direncinden sorumlu genin oligonükleotid dizilimi ve bant büyüklükleri .....	21
Tablo 3. 6. <i>mecA</i> geni için amplifikasyon koşulları.....	21
Tablo 4. 1. <i>S. aureus</i> izolatlarının <i>coa</i> -tiplendirmesi ve oluşan bant büyüklükleri ...	25
Tablo 4. 2. <i>S. aureus</i> izolatlarının fenotipik ve genotipik bulguları .....	33
Tablo 4. 3.. NSAizolatlarının fenotipik ve genotipik bulguları .....	33
Tablo 4. 4. <i>S. aureus</i> izolatlarının çeşitli antibiyotiklere karşı direnç profilleri .....	35
Tablo 4. 5. NSAizolatlarının çeşitli antibiyotiklere karşı direnç profilleri .....	36
Tablo 4. 6. <i>S. aureus</i> izolatlarının antibiyotik sınıflarına göre çoklu antibiyotik direnci.....	40
Tablo 4. 7. NSAizolatlarının antibiyotik sınıflarına göre çoklu antibiyotik direnci ..	42
Tablo 4. 8. <i>S. aureus</i> izolatlarının fenotipik olarak metisiline direnç durumu ve <i>mecA</i> genine sahip izolatlar.....	45
Tablo 4. 9. NSA izolatlarının fenotipik olarak metisiline direnç durumu ve <i>mecA</i> genine sahip izolatlar.....	46
Tablo 4. 10. <i>S. aureus</i> izolatlarına ait fenotipik/genotipik özellikler ve ebselenin MİK değeri.....	54
Tablo 4. 11. NSAizolatlarına ait fenotipik/genotipik özellikler ve ebselenin MİK değeri.....	55

# 1. GİRİŞ

Mastitis ülkemizde birlikte tüm dünyada önemli ekonomik kayıplara neden olan yangısal bir durum olup subklinik mastitis vakalarındaki ekonomik kayıplar, başlangıçta ne sütte ne de memede herhangi bir belirti olmamasından dolayı daha büyük boyutlara varabilmektedir. Mastitisin etimolojisi oldukça komplike olup bakteriyel etkenler bu etimoloji içinde oldukça önemli bir yere sahiptir. Bölgeden bölgeye ve ülkeler arası mastitis patojenlerinin türleri ve dağılımları değişmekle birlikte, özellikle subklinik mastitis vakalarının primer patojenleri arasında stafilokoklar ön sırada yer almaktadır. Sığırlardaki mastitis vakalarından izole edilen *S. aureus* ve non-*S. aureus* olarak tanımlanan stafilokok türlerinin virülens özellikleri, antibiyotik duyarlılık profilleri ile birlikte moleküler karakterizasyonlarına yönelik çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Söz konusu etkenlerin zaman içerisinde geliştirdikleri antibiyotik direnci, günümüzün en önemli sağlık problemlerinden biri haline gelmiştir.

Antibiyotik direnci sorunu global bir problem olup günümüzde hem insan hem de hayvan sağlığında tedaviye direnç gösteren ve önemli kayıplarla sonuçlanan bakteriyel kökenli hastalıklar oldukça yaygındır. Özellikle stafilokoklarında dahil olduğu çoklu antibiyotik direncine sahip bakteri gruplarında görülen antibiyotik direnç sorunu, özellikle WHO, FAO ve OIE arasında “Tek Sağlık” yaklaşımıyla kurulan ittifak ile çözülmeye çalışılmaktadır. Çözüm stratejileri arasında aşılama, immunoterapiye, faj terapisinden modifiye CRISPR-Cas yaklaşımına kadar çeşitli alternatifler bulunmaktadır. Son zamanlarda “repurposing” veya “yeniden amaçlandırma” yaklaşımı ile, halihazırda ruhsatlanmış ve klinik kullanımda olan bir ilacın veya ürünün başka bir amaçla, bazı toksikoloji ve farmakolojik özellikleri ve bu tez çalışmasında olduğu gibi antibakteriyel etki potansiyelleri değerlendirilerek klinik kullanıma sokulmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır.

Tez çalışmasında bir organoselenyum bileşiği olan ve normalde antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri ile bilinen ebselenin, mastitis kökenli metisilin dirençli ve çoklu antibiyotik direnci olan stafilokok suşlarındaki antibakteriyel etkinliğinin in vitro olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Sunulan tez çalışmasında sığır mastitislerinden izole edilmiş *S. aureus* ve non-*S. aureus* sularının virülens özellikleri ve antibiyotik duyarlılık profilleri belirlenerek çeşitli direnç profilleri

sergileyen ve özellikle biyofilm üreten stafilokok suşları üzerinde ebselenin antibakteriyel etkinliğinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Mastitis**

Meme anlamındaki "mastos" ve yangıyı ifade eden "itis" kelimelerinin birleşmesiyle oluşan mastitis, genel olarak memenin deriyi içermeyen glandüler dokusunun yangısı olarak tanımlanabilir (İlhan ve Şendağ, 2018).

Mastitis (memenin yangısı), meme bezlerinin enfeksiyöz veya enfeksiyöz olmayan irritasyonlara karşı göstermiş olduğu tepkidir. Bunların arasında en önemli yangı sebepleri mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyöz kaynaklı mastitislerdir (Özyurtlu, 2011).

Mastitis, süt inekçiliğinde sıklıkla karşılaşılan ve önemli ekonomik kayıplara neden olan bir hastalıktır. Süt inekçiliğinde mastitis sebep olduğu ekonomik kayıplardan dolayı maliyeti en yüksek hastalıktır. Bu ekonomik kayıp hem ineğin sağlığının etkilenmesinden hem de süt kaybı ve süttten yapılan ürünlerin kalitesinin etkilenmesinden dolayı oluşmaktadır. Mastitisin neden olduğu kayıplar, infertilite problemlerinden kaynaklanan kayıplardan daha fazladır (Özyurtlu, 2011).

Mastitis, sadece sütün mikrobiyolojik kalitesini bozmakla kalmayıp, kimyasal yapısını da etkilemektedir. Örneğin, sütte bulunan kazein peynir yapımında rol oynayan önemli bir proteindir. Mastitisli sütlerde kazein oranı düştüğünden, bu nitelikteki sütlerden daha düşük oranlarda peynir elde edilmektedir (İlhan ve Şendağ, 2018).

Mastitis klinik ve subklinik olarak 2 şekilde tanımlanabilir. Klinik mastitiste, sütte (sütün rengi, fiziksel yapısı değişmiş içinde pıhtı ve flakon benzeri yapılar vardır) ve meme dokusunda (şişlik, kızarıklık, ısı artışı, renk değişimi gibi) belirgin değişiklikler vardır. Subklinik mastitiste ise süt ve meme dokusunda gözle görülebilen semptom yoktur (Özyurtlu, 2011).

### **2.2. Mastitis Teşhisi**

Klinik teşhiste meme ve sütteki değişiklikler dikkate alınmaktadır. Klinik mastitis vakalarında meme kaidesindeki şişkinlik, kızarıklık, ağrı ve ısı artışı gibi patolojik değişikliklerle birlikte, sütün renginin değişmesi, pıhtı görülmesi ve lökosit sayısındaki artış dikkati çekmektedir. Ancak, subklinik mastitislerde bu bulgular genellikle fark edilememektedir. Mastitis vakalarının çoğunda sütteki değişikliklerin

gözden kaçması ve memelerdeki değişikliklerin klinik olarak fark edilememesi nedeniyle, subklinik mastitislerin saptanmasında bazı indirekt testler geliştirilmiştir. Bu testlerin çoğu sütteki somatik hücre sayısındaki değişiklikleri saptamaya yönelik olmakla birlikte, bazıları enzim, bazıları ise çeşitli kimyasal parametrelerdeki değişiklikleri saptamaktadır. Söz konusu testler arasında strip cup, asitlik, katalaz, whiteside, Wisconsin, somatik hücre sayımı, elektriksel iletkenlik (Eİ), California mastitis testi (CMT) ve sütte klor saptanması gibi teknikler sayılabilir. Diğer yandan bazı araştırmacılar,  $\beta$ -glukuronidaz, N-asetil- $\beta$ -D-glukoz aminidaz (NAGase) ve laktat dehidrojenaz (LDH) gibi enzimlerin inek mastitislerinin ön teşhisinde bir indikatör olarak kullanılabileceğini bildirmektedir. Uluslararası Sütçülük Federasyonu'nun 1967 yılında aldığı karara göre subklinik mastitisli inek sütlerindeki somatik hücre sayısı  $1 \times 10^5$  hücre/ml olarak belirlenmiş, ancak daha sonra yapılan çalışmalarda bu oranın ülkelere, bölgelere ve hatta işletmelere göre oldukça değişiklik gösterdiği belirlenerek, söz konusu değer son zamanlarda  $2 \times 10^5$  olarak revize edilmiştir (Vural, vd., 2016).

Mastitislerin kesin teşhisi laboratuvar analizleriyle yapılmaktadır. Laboratuvar teşhisinin güvenilir olması için süt örneklerinin uygun şekilde alınması gerekmektedir. Bu amaçla, meme lobları %70'lik alkolle temizlendikten sonra yaklaşık 1 dakika beklenerek, orta sağımdan steril tüplere süt örnekleri alınıp, kısa sürede ve soğuk zincirde laboratuvara ulaştırılmalıdır. Laboratuvara ulaştırılan örnekler kısa sürede analiz edilmeli veya zorunlu durumlarda  $-20^\circ$ 'de saklanmalıdır. Fakat, bazı mastitis patojenlerinin dondurma işleminden sonra izolasyon oranlarının azaldığı dikkate alınmalıdır (İlhan ve Şendağ, 2018).

### **2.3. Mastitisin Bakteriyel Etiyolojisi**

Mastitisin etiyojisinde genel olarak primer etkenler ve sekonder faktörler rol oynamaktadır. Primer etkenler arasında çeşitli bakteriler, virüsler, bazı mikotik ve paraziter ajanlar bulunmaktadır. Sekonder faktörler arasında ise konakçıya (meme loblarının büyük olması, meme başı sfinkterlerinin gevşek olması, immün yetmezlik ve laktasyon dönemi gibi) ve çevreye (uygun sağım yönteminin uygulanmaması ve barınakların fazla kalabalık olması gibi) ait faktörler sayılabilir (Vural, vd., 2016).

Mastitisin bakteriyel etiyojisi dikkate alındığında, hastalığın majör (kontagiyöz) ve minör (çevresel) patojenler tarafından oluşturulduğu

bildirilmektedir. Majör patojenler arasında *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus galactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, çeşitli *Mycoplasma* türleri ve *Escherichia coli*; minör patojenler arasında ise koagulaz negatif stafilokok (KNS)'lar, çeşitli *Corynebacterium*, *Pasteurella* ve *Enterobacter* türleriyle, bazı Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler sayılabilir. Ancak, bu sınıflandırmaların değişik kaynaklarda farklı şekillerde olabileceği unutulmamalıdır (İlhan ve Şendağ, 2018).

Meme bezlerini enfekte eden *Staphylococcus aureus*, patojenitesi, bulaşıcılığı, meme dokusunda kalıcılığı, deri veya mukozal epitel kolonizasyonu ve tedavilere karşı direnç gösterme durumu nedeniyle dünya çapında süt endüstrisi için büyük bir sorun olmaya devam etmektedir. *Staphylococcus aureus* ayrıca gıda güvenliği ve antibiyotik kullanım sorunları ve suşların insanlarla süt hayvanları (inekler ve küçük geviş getiren hayvanlar) arasında çift yönlü bulaşma potansiyeli nedeniyle halk sağlığı için bir tehdit oluşturmaktadır (Markey, et al., 2013).

#### **2.4. Mastitis Etkeni Olarak *Staphylococcus* spp.**

Eubacteria âlemi, Firmicutes şubesi, Bacilli sınıfı, Bacillales takımı, *Staphylococcaceae* ailesi içerisinde yer alan *Staphylococcus* cinsi bakteriler, önemli bir enfeksiyon etkenidir. *Staphylococcus* genusunda 30'dan fazla tür bulunmaktadır. Genel karakter olarak stafilokoklar yuvarlak, 0,8-1,0 µm çapında, çoğu kez düzensiz kümeler, bazen tetrad, ikişerli kok ya da tek tek koklar şeklinde görülen Gram pozitif bakterilerdir. Stafilokoklar hareketsiz, fakültatif anerobik, spor oluşturmeyen genellikle kapsülsüz bakterilerdir. Stafilokoklar, *Enterobacteriaceae* haricinde mikrobiyoloji laboratuvarındaki klinik örneklerden en sık izole edilir. Bu bakteriler doğada yaygındır ve çevreden veya deri, mukoza zarları ve insanlarda ve hayvanlarda diğer vücut bölgelerinde normal flora etkeni olarak bulunur. Erken, zaman zaman oportunistik enfeksiyonlara neden olabilir. Birçok enfeksiyon endojen olmakla birlikte stafilokoklar çevre koşullarında (ısıya, tuz ve bazı dezenfektanlara karşı kısmen dirençli) uzun zaman canlılıklarını sürdürebilirler ve indirekt bulaşma söz konusu olabilir (Markey, et al., 2013).

Stafilokoklar piyojenik bakteriler olup abse oluşumu ve suppurasyonla ilişkili olabilirler. Patojenik stafilokoklar çok çeşitli virülens faktörlerine sahiptir. En önemli patojenin türlerden biri olan *Staphylococcus aureus*'un sahip olduğu virülens faktörleri arasında, koagulaz, protein A, proteazlar, enterotoksinler, hemoliziner,

lipaz ve fosfolirpazlar, deoksiribonükleaz, yüzey proteinleri, kapsül ve biyofilm oluşturma özellikleri yer almaktadır (Markey, et al., 2013; Graf, et al., 2019).

*S. aureus* gibi klasik hastalığa neden olan stafilokokların patojenik potansiyeli, virülens faktörleri olarak kabul edilebilecek bir dizi biyokimyasal fonksiyonla ilişkilidir. Virülens faktörleri; konakçı dokuların kolonizasyonunu destekleyen yüzey proteinlerini, dokularda bakteri yayılımını destekleyen istilaları (lökosidin, hiyalüronidaz), fagositik yutmayı engelleyen yüzey faktörlerini (kapsül), fagositlerde hayatta kalmalarını artıran biyokimyasal özellikleri (katalaz üretimi) ve ökaryotik hücre zarlarını parçalayan zara zarar veren toksinler (hemolizinler, lökotoksin). Farklı koagülaz negatif stafilokok türlerinde benzer aktiviteler gözlemlenmiştir (Türkyılmaz, 2005).

*Staphylococcus aureus* pnömoni, mastitis, flebit, menenjit, idrar yolu enfeksiyonları, osteomyelit, endokardit ve furunküloz gibi yüzeysel deri lezyonlarına neden olur. *S. aureus*, cerrahi yaraların hastane kaynaklı (nozokomiyal) enfeksiyonunun ve kalıcı tıbbi cihazlarla ilişkili enfeksiyonların önemli bir nedenidir. *S. aureus* ayrıca yiyeceklere enterotoksinler salarak gıda zehirlenmesine ve toksik şok sendromuna neden olur. (Markey, et al., 2013).

*S. aureus*, özellikle sığırlarda subklinik mastitisin çok yaygın bir etkeni olup gangrenöz mastitise de neden olmaktadır. Sürüde subklinik taşıyıcı hayvanlar yüksek oranda bulunabilmektedir. *S. aureus* kontagiyöz karakterde mastitise neden olmakta ve sürü içinde sağımıcının elleri, süt kapları gibi yollarla kolayca yayılabilmektedir.

Hem fagositler hem de meme epiteli içerisinde canlılığını sürdürebilme yeteğine sahip olan *S. aureus*, antibakteriyel terapiye karşı da dayanıklı olabilmektedir. Biyofilm oluşumunun persistent enfeksiyonların oluşumunda önemli bir rolünün olduğu kabul edilmektedir (Melchior, et al., 2006). Biyofilm, serbest yaşayan organizmaların uygun bir yüzeye tutunup kümeleşerek ürettikleri matriks ile oluşturdukları tabakadır. Bu tabaka, *S. aureus*'ların antibiyotiğe karşı dirençli olmasını sağladığı ve konak tarafından fagositozuna engel olduğu için, *S. aureus* enfeksiyonlarının tedavisini zorlaştırmaktadır. *S. aureus* türünde biyofilm tabakasının oluşumundan *icaADBC* lokusu ve bazı proteinler sorumlu tutulmaktadır (Yüksekdağ, 2013).

Terapötik sorunların dışında, MRSA'nın bir mastitis nedeni olarak ortaya çıkması, özellikle *S. aureus*'un sığır klonlarında farklı bir *mecA* geninin ortaya çıkması ve sığırların yeni MRSA suşlarının kaynağı olarak rol oynama olasılığı halk sağlığı açısından endişe vericidir (Garcia-Alvarez, et al., 2011; Shore, et al., 2011).

## 2.5. Mastitis Tedavisinde Kullanılan Antibakteriyeller

Genel olarak, süt çiftlikleri, tıbbi açıdan önemli antimikrobiyaller dahil olmak üzere en büyük antimikrobiyal kullanıcılarından biridir. Süt çiftliklerinde kullanılan bazı antimikrobiyaller arasında beta-laktamlar (penisilinler, ampicilin, oksasilin, penisilin-novobiyosin), geniş spektrumlu beta-laktamlar (üçüncü nesil sefalosporinler, örneğin seftiofur), aminoglikozitler (streptomisin), makrolidler (eritromisin), linkozamid (pirlimisin), tetrasiklin, sülfonamidler ve florokinolonlar bulunmaktadır (DeGo, 2020).

Penisiline dirençli stafilokoklardan ileri gelen enfeksiyonlarda spiramisin gibi makrolidlerin kullanımı söz konusu olduğu gibi, penisilinaza dirençli penisilinler ve amoksisilin-klavuloniak asit gibi kombinasyonlar kullanılmaktadır. Ayrıca parenteral sefalosporinler ile sentetik veya aminopenisilinlerin meme dokusunda dağılımları zayıf olduğundan tedavide meme içi uygulama şeklinde sefalosporinler ile tilosin, kinolonlar, trimetoprim ve aminoglikozidler kullanılabilir (Vural, vd., 2016).

Mastitisin tedavisinde en yaygın kullanılan antibiyotik sefalosporinler olup, bunu linkozamidler ve sefalosporin olmayan beta-laktam antibiyotikler izlediği bildirilmiştir. Kuru daki ineklerin tedavisi için en yaygın kullanılan iki antibiyotik, Penisilin G/dihidrostreptomisin ve sefalosporinler olarak bildirilmiştir (DeGo, 2020).

ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan ticari olarak mevcut ürünler arasında yalnızca iki antimikrobiyal sınıf temsil edilmektedir. Bu sınıflar,  $\beta$ -laktamlar (amoksisilin, seftiofur, sefapirin, koksisilin, hetasilin ve penisilin) ve bir linkozamiddir (pirlimisin). ABD pazarından birkaç ürün çekilmiş olsa da, 2006'dan beri süt üretimindeki inekler için yeni meme içi antibiyotikler onaylanmamıştır.

Amerika Birleşik Devletleri'nde mastitisin sistemik tedavisi için ruhsatlanmış antimikrobiyaller yoktur; ancak bazı antibiyotiklerin (diğer hastalıklar için süt sığırları için onaylanmış olan) etiket dışı kullanımına veteriner gözetimi altında izin verilmektedir. Bu ineklerin çoğu septisemik olduğundan, şiddetli mastitisli inekleri tedavi etmek için sistemik antibiyotikler önerilir (Erskine, et al., 2002). Ancak

penisilin, ampisilin (Polyflex®) veya seftiofur (Excenel®, Naxcel®) gibi ilaçların sistemik kullanımı memede terapötik konsantrasyonlara ulaşmaz ve hafif veya orta dereceli klinik vakalarda kullanılması önerilmez. Mastitis tedavilerinin çoğu sadece inflamasyonun gözlemlenmesine dayalı olarak (bakterileri bilmeden) uygulandığından, çoğu sistemik tedaviyi hem tıbbi olarak hem de tüketiciler için haklı çıkarmak zordur (Ruegg, 2021).

## **2.6. Antibiyotiklere Karşı Direnç Sorunu**

Antimikrobiyal direnç (AMR), mikroorganizmaların geçmişte etkili olan antimikrobiyallerin etkilerinin üstesinden gelebildiği zaman ortaya çıkar. 2016 yılındaki EARS-Net verilerine göre AMR, Avrupa'da halk sağlığı için ciddi bir tehdit olmaya devam etmektedir (ECDC, 2017). Ek olarak, AMR küresel sağlık, gıda güvenliği ve kalkınmaya yönelik en büyük tehditlerden biridir (WHO, 2015).

Antibiyotik direnci, global boyutta önemli bir klinik ve halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Bakteriyel direncin seleksiyonunda antibiyotiklerin çok önemli olduğu açıkken, direnç genlerinin ve dirençli bakterilerin yayılması da soruna katkıda bulunur. Dirençli formların seleksiyonu, antimikrobiyal tedavi sırasında veya sonrasında meydana gelebilir; antibiyotik kalıntıları tedaviden sonra uzun süreler boyunca ortamda bulunabilir. Antibiyotiklerin yanı sıra, bakterileri yok etmeyi amaçlayan diğer ajanların, yani artık birçok ev ürününde bulunan yüzey antibakteriyellerin artan kullanımı söz konusudur. Bunlar da çevre için önemli kirleticilerdir. Şu anda başarılı bir şekilde tedavi edilmesi zor ve bazen imkansız olan çok dirençli bulaşıcı hastalık organizmalarıyla karşı karşıyayız (Levy, 2002).

Başlangıçta insan sağlığı sorunu olarak görülmesine rağmen, antimikrobiyal direncin kontrol altına alınması insan, hayvan ve çevre sağlığı uzmanlarını içeren çok sektörlü bir yaklaşımı gerektirir. Düşük gelirli ülkelerdeki koşullar, aşılama gibi nitelikli veteriner sağlık hizmetlerine düşük erişilebilirlik ve antibiyotik kullanımına ilişkin yetersiz farkındalık ve düzenleme dahil, durumu daha da kötüleştirmektedir.

Tek Sağlık, yerel, ulusal ve küresel düzeylerde insanlar, hayvanlar ve çevre bakımından ideal sağlık elde etmek için farklı disiplinlerin işbirlikçi çalışması olarak tanımlanmakta olup bu konsept dahilinde yer alan birçok önemli konu ile birlikte antimikrobiyal direnç sorununun multidisipliner ve sektörler arası işbirlikçi çabalarla çözülmesi gerekmektedir (Puyvelde et al., 2018).

Penisilinin keşfedilmesiyle antibiyotikler kullanılmaya başlanmış ve tıpta yıllarca önemli bir yere sahip olmuştur. Bununla birlikte, son zamanlarda, hem beşeri hem de veteriner hekimlik alanında bakteriyel hastalıkların tedavisinde mevcut antibiyotiklerin kötüye kullanımı, bakterilerdeki antibiyotik direncinin artmasına yol açmıştır. Bu durum, bakteriyel infeksiyonların gelecekteki tedavisi için endişe oluşturmakta olup, antimikrobiyal direnç, şu anda en çok dikkat çeken konulardan biri haline gelmiştir. Yapılan çalışmalarda antibiyotik direncinin geniş çapta çeşitli mikroorganizmalara yayıldığı ve genişlediği bildirilmiştir. Ve bu durumun sonuç olarak bakteriyel aracılı hastalıklarda artan sayıda klinik başarısızlığa neden olacağı ve bu durumun da küresel halk sağlığı açısından önemli olduğu rapor edilmiştir (Hussein, et al., 2009). Önceki çalışmalara dayanarak, *S. aureus*'un penisilin direnci, mastitise neden olan bakteriler arasında AMR'nin en yaygın şekli olduğu söylenebilir (Hendriksen, et al., 2008; Kalmus, et al., 2011).

Metisilin ve oksasilin gibi beta-laktamaz dirençli penisilinler, süt ineklerinde meme içi uygulama amaçlı ürünlerde kullanılan kloksasilin dışında kullanılmaz. Metisiline dirençli (MRSA), mastitis sütü örneklerinden izole edilmiştir ve sığır mastitisinin tedavisini karmaşık hale getirme potansiyeli bulunmaktadır. Sığır mastitisinde MRSA'nın varlığı, diğer maruz kalan sığırlar ve veteriner hekimler dahil çiftlik çalışanları için potansiyel bir risktir. Genel olarak, AMR bakterilerinin veya genetik belirleyicilerin hayvanlardan insan popülasyonlarına besin zinciri yoluyla ortaya çıkması ve aktarılması da giderek artan bir endişe kaynağıdır (Chandrasekaran, et al., 2014).

MRSA suşlarının, mastitis tedavisinde sıklıkla kullanılan aminoglikozitler, makrolidler, linkozamidler, streptograminler, tetrasiklinler vb. gibi çoklu ilaca dirençli olduğu gözlenmiştir. Üç veya daha fazla antibiyotik sınıfına karşı direnç gösteren bakteriler için "multidrug resistant" (MDR) terimi kullanılmakta olup MDR-SA'nın belirlenmesi, zoonotik potansiyele sahip olduğu için insan sağlığı için endişe vericidir. Hayvancılık, halk sağlığı, çiftlik işçileri ve veteriner hekimler için büyük bir tehdit oluşturabilecek süt yoluyla bakterilerin insanlara bulaşmasında önemli bir rol oynayabilmektedir. Son yıllarda, *S. aureus* insidensi artmaktadır ve halk sağlığı üzerinde büyük bir etkisi olan sağlık bakımıyla ilişkili MRSA ve çiftlik hayvanları ile ilişkili MRSA yaygın olarak rapor edilmiştir (Chandrasekaran, et al., 2014).

1981 yılında antimikrobiyal direnç sorunu konusunda paydaşları ve toplumları bilinçlendirmek, bu alanda yapılacak yasal ve bilimsel çalışmalara yön vermek amacıyla A.B.D. Tufts Üniversitesi profesörlerinden Stuart Levy'nin önderliğinde "Alliance for Prudent Use of Antibiotics (APUA)" adlı uluslararası bir organizasyon kurulmuştur. 1990'lı yıllardan başlayarak metisilin ve vankomisine dirençli *S.aureus* suşları, izoniazid ve rifamisine dirençli MDR-tipi *M.tuberculosis*, makrolide dirençli *S. pneumoniae*, ampisiline dirençli *H. influenzae*, klasik ilaçlara dirençli *N. gonorrhoeae* ve ESBL, AmpC ve metalo-beta laktamaz enzimleri üreten Gram-negatif bakteri türleri, karbapenem dirençli *K. pneumoniae* ve plazmid aracılı kolistin dirençli *Enterobacteriaceae*'da görülen küresel artış ve yayılış, buna paralel olarak çoğul dirençli *Salmonella*, *Campylobacter*, *L. monocytogenes*, VTEC *E.coli* ve *Enterococcus* gibi gıda kökenli zoonotik bakterilerin prevalans ve insidansındaki global yükseliş başta A.B.D ve Avrupa Birliği olmak üzere birçok ülkenin insan ve hayvan sağlığından sorumlu kuruluşlarıyla WHO, OIE ve FAO gibi, insan sağlığı, hayvan sağlığı ve gıda güvenliği konularında faaliyet gösteren uluslararası kuruluşları harekete geçirmiştir. Kısa bir zaman sürecinde "antimikrobiyal direnç sorunu" tüm bu kuruluşların belli başlı çalışma konuları arasına girmiştir (Thangamani, et al., 2016).

Mastitis vakalarından ve süt çiftliği ortamlarından bakteri izolatlarının antimikrobiyal direnç modellerinin izlenmesi, tedavi kararları ve antimikrobiyal direnç azaltma önlemlerinin uygun şekilde tasarlanması için önemlidir. Aynı zamanda, antimikrobiyal dirençli bakterilerin ve bu rezervuarlardan gelen antimikrobiyal dirençli bakterilerin insanlara, hayvanlara ve çiftlik ortamlarına yayılmasının ortaya çıkışını, kalıcılığını ve potansiyel riskini belirlemeye yardımcı olur. Süt çiftliklerinde antimikrobiyallerin ihtiyatlı kullanımı, antimikrobiyal dirençli bakterilerin ortaya çıkışını, kalıcılığını ve yayılmasını ve mandıralardan insana, hayvana ve çevreye yayılmasını azaltır (Sharma, et al., 2018).

## **2.7. Antibiyotik Dirençliliğine Çözüm Stratejileri**

AMR'yi ele almak için bireysel, topluluk, yerel, bölgesel, ulusal ve uluslararası düzeyde küresel işbirliği çabaları gerekmektedir ve sağlanmaktadır. Özünde, tüm stratejiler antibiyotik kullanımını optimize etmeyi, patojenik mikroorganizma ile antibiyotikler arasındaki istenmeyen etkileşimi en aza indirmeyi, dirençli suşların

yayılmasını sınırlamayı ve enfeksiyonları akılcı antibiyotik kullanımıyla tedavi etmeyi hedeflemelidir (Tanwar, et al., 2014). Bu hedefe ulaşmak için WHO, FAO ve OIE arasında Tek Sağlık yaklaşımıyla Üçlü İttifak kurulmuştur. Üçlü ittifak, 2015 yılında AMR ile ilgili Küresel Eylem Planını yayınlamıştır. Benzer şekilde, FAO, gıda ve tarım sektörlerinde DSÖ Küresel Eylem Planının uygun şekilde yürütülmesini desteklemek için 2016 yılında AMR Stratejisini de başlattı (FAO, 2016). DSÖ Küresel Eylem Planı, AMU (Antimikrobiyel Kullanım) ve ilgili AMR hakkında artan farkındalık ve anlayışa vurgu yapmaktadır; uygun sorveyans ve araştırma yoluyla AMR ile ilgili bilgi birikimi oluşturmak; antibiyotiklerin optimal ve akılcı kullanımı; bulaşıcı hastalıkların insidansını azaltmak ve antibiyotik direncinin uygun şekilde entegre bir şekilde önlenmesi ve kontrol altına alınması için kaynakları, araştırmaları ve geliştirmeleri organize etme üzerinedir (WHO, 2015).

Hem insan hem de veteriner patojenlerinde AMR'nin yönetimi, araştırmacıların, politika yapımcıların, veteriner hekimlerin, sanayicilerin ve ayrıca son kullanıcıların ideal ve uyumlu eylemini gerektirir. Daha yeni ve güçlü antimikrobiyallerin geliştirilmesinin yanı sıra, AMR'yi kontrol etmeye yardımcı olabilecek olası müdahale önlemlerinin başında, sıkı mevzuat yoluyla AMU kontrolü ve reçetesiz satışların izlenmesi gelmektedir. Hem reçete yazana hem de dağıtıcıya yönelik olarak akılcı olmayan kullanıma yol açan mali teşviklerin sıkı bir şekilde düzenlenmesi gerekir. Standart tedavi kılavuzlarının daha basit, yerel olarak ilgili, kanıta dayalı ve erişimi kolay belgelere periyodik olarak güncellenmesi esastır. Performansa göre ödeme politikası gibi bazı motivasyonel önlemler, bireysel pratisyenlerin ve sağlık tesislerinin ilaç reçeteleme oranlarına ilişkin tarafsız denetim geri bildirim mekanizmasıyla birlikte hükümet yetkilileri tarafından uygulanmalıdır. Enfeksiyon kontrol müdahalelerinin yeniden değerlendirilmesi ve iyileştirilmesi gerekmektedir. İlgili tüm paydaşların dâhil olduğu, sektörler arası geniş kapsamlı koordinasyon rolüne sahip ulusal iş (görev) güçleri arzu edilmektedir. Bu tür görev güçleri, sorveyans, düzenleme, tedavi kılavuzları, enfeksiyon kontrolü, eğitim ve farkındalık gibi farklı alanlarda yıllık eylem planlarını ve kilometre taşlarının ana hatlarını belirlemelidir (Laxminarayan, et al., 2013).

AMR'nin yeni antibiyotiklerin yavaş ortaya çıkmasıyla birlikte yayılması; mikrobiyal bozukluklara karşı etkili tedavilerde bir eksiklik yaratmıştır. Hali hazırda, daha yeni bir ilacın keşif, klinik etkinlik ve güvenlik değerlendirmesi aşamasından

onaya kadar olan mobilitesinin maliyetinin iki katından fazla olduğu tahmin edilmektedir (DiMasi, et al., 2014; Elder, et al., 2016). Bu nedenle, yeni antibiyotiklerin bulunması ve tanıtılması daha zorlu hale gelmiştir ve antimikrobiyel araştırmalar artık hızlı ve önemli geridönütler arayan yatırımcılar için çekici bir seçenek olmaktan çıkmaktadır. Antibiyotiklere direnci azaltmak ve antibiyotiklere yeni, güvenli, dirençsiz ve ekonomik alternatiflerin keşfedilmesini ve sunulmasını hızlandırmak için daha yenilikçi ve cesur çözümlerin tam zamanıdır (Founou, et al.,2016). Antibiyotiklere ideal alternatifler, vücuttan kolayca atılabilen, toksik olmayan, gastrointestinal geçiş yoluyla stabil, kolayca parçalanan ve çevre dostu, yerleşik bağırsak florası üzerinde minimum veya hiç etkisi olmayan patojenlere karşı seçici olarak aktif, yem verimliliğini artıran ve hayvan büyümesini teşvik eden nitelikte olmalıdır ve her şeyden önce dirençsiz olmalıdır (Cheng, et al., 2014). Günümüzdeki antibiyotiklerin yerini almaya ve/veya bunlara ek olarak hizmet etmeye yönelik umut vaat eden ve MDR suşlarına karşı aktivite gösteren yeni stratejiler arasında şunlar yer almaktadır:

1. Aşılama,
2. Tavuk yumurta sarısı antikorları,
3. Probiyotikler, prebiyotikler ve simbiyotikler,
4. Litik bakteriyofajlar veya onların saflaştırılmış gen ürünleri,
5. Quorum sensing söndürücüler,
6. Antimikrobiyal peptidler, bakteriyosinler and fitobileşikleri,
7. Modifiye CRISPR-Cas yaklaşımı,
8. Metal-temelli nanopartiküller
9. İmmunostimulant ve sitokinler.

Bakteriyel enfeksiyonlarla başa çıkmanın bir başka yaklaşımı, mevcut ilaçları antibiyotik veya virülens inhibitörleri olarak yeniden kullanmaktır. Yeni bazı çalışmaların yansıttığı gibi, son on yılda ilaçların başka amaçla yeniden kullanımı ("repurposing") ilgi kazanmıştır (Miró-Canturri, et al., 2019). O zamandan beri, 314 kurumdan klinik öncesi antibiyotik projelerinin %4'ü, bakteriyel enfeksiyonlara karşı değerlendirilen ilaçların yeniden kullanılmasıyla ilgilidir. Bu ilaç sınıfına artan ilginin bir başka kanıtı, başka amaçlarla kullanılan ilaçlar için geliştirme sürecinin

geniş bir mevcut bilgi birikiminden faydalanması ve geliştirme zamanını ve maliyetini azaltmasıdır. Bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek için geliştirilen amaca uygun yeniden tasarlanmış ilaçların çoğu, antikanser ilaçlar, anti-enflamatuar/immünomodülatör ilaçlar, antipsikotik ve antidepresan ilaçlar, statinler ve demir depolayan ilaçlar olarak onaylanmış veya ileri klinik aşamalarda (Theuretzbacher, et al., 2020).

## 2.8. Yeniden Amaçlandırma (“Repurposing”)

İlacın yeniden amaçlandırılması, yeniden konumlandırılması veya yeniden yönlendirilmesi, yeni endikasyonlar veya hali hazırda pazarlanan ilaçlar için yeni ticari fırsatlar aracılığıyla bilinen onaylanmış ilaçlar için yeni klinik fırsatlar oluşturma sürecini tanımlamak için kullanılan yaygın terimlerdir. Genel olarak, ilaçların yeniden amaçlandırılması vaadi çok farklı iki prensipten gelir. Birincisi, birçok ilacın, ilaçların birçok yan etkisi ile ortaya çıkan bir olgu olan “gizli biyolojik aktivitelere” sahip olmasıdır. İkincisi, farklı hastalıkların sıklıkla ortak moleküler yolları ve/veya genetik faktörleri paylaşmasıdır (Farha and Brown, 2019). Bu yaklaşımın, yeni antimikrobiyaller üretmek için yüksek maliyetlerden ve uzun geliştirme sürelerinden kaçınmak ve ayrıca bilinen farmakolojik özelliklere sahip bileşikleri kullanabilmek gibi çeşitli avantajları vardır. Başka bir deyişle farmakolojik, toksikolojik ve biyoyararlanım verileri zaten mevcuttur. Kullanımları nispeten yeni olmasına rağmen *in vitro* ve *in vivo* (en azından bazıları için) umut verici özelliklere sahip, en az onlarca uygulanabilir aday vardır (Rangel-Vega, et al., 2015).

Yeniden amaçlandırılmış antibiyotik olmayan ilaçlar, kendi aralarında ve antimikrobiyallerle birlikte kullanıldıklarında antibiyotik etkileri gösterdiğinden, bu kombinasyonlar şu anda bireysel ilaçların zayıf aktivite probleminin üstesinden gelmek için yararlı bir seçenek oluşturmaktadır. Bununla birlikte, küresel bilim camiasında sadece başlangıç noktası olduğu konusunda bir fikir birliği mevcut olup etki mekanizmaları ve ilaveten *in vivo* çalışmalar bu ilaçların güvenli kullanımı için hayati önem taşımaktadır (Serafin and Hörner, 2014).

Yeniden amaçlandırma ve etiket dışı kullanımı karşılaştırıldığında, bu uygulamalar arasında bir benzerlik olduğu görülür. Bu, ilacın normalden farklı yeni bir endikasyonudur. Bununla birlikte, etiket-dışı kullanım bunun ötesindedir, çünkü

farklı yaş grupları, dozaj veya uygulama yolunu içerebilir. Bu yasal ve yaygın bir uygulama olarak kabul edilmesine rağmen, genellikle yeterli bilimsel verilerin yokluğunda gerçekleştirilir ve hastaları sağlık riski bilinmeyen ilaçların sınırsız ve etkisiz deneylerine maruz bırakabilir (Serafin and Horner, 2018).

Cesaret verici verilerden biri de yeniden konumlandırılmış ilaçların yeni ilaçlara göre daha yüksek olan başarı oranları olup, son birkaç yılda% 30'a ulaşmıştır. Ayrıca, Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanma da yeniden konumlandırmanın pozitif yönünü oluşturmaktadır (Jin and Wong, 2014). Bununla birlikte, bu yöntem ilaç endüstrilerinin ilgisizliği nedeniyle akademik veya küçük laboratuvarlar için uygundur. Patentler olmadan, bu endüstriler, hızlı ortaya çıkan direnç ve daha dar bir faaliyet yelpazesi nedeniyle gereken verimli ilgiyi görmemektedir. Öte yandan, bu çözüm tamamen mucizevi olamaz. İlaç replasmanı (yeniden konumlandırması), yüksek minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) veya insanlarda tolere edilen tutarsız plazma konsantrasyonları nedeniyle her zaman çalışmaz. Bu yeni endikasyon için test edilen doz önemlidir ve toplumun korktuğu insan toksisitesine neden olabilir. Galenik ile ilgili olarak, bir fiziko-kimyasal uyumsuzluk gözlenirse formülasyonun bir optimizasyonu da öngörülebilir (Peyclit, et al., 2019).

İlaçların antimikrobiyal aktivite için yeniden kullanılması bağlamında, onaylanmış bazı ilaçların antimikrobiyal aktivitelerine yönelik olarak tanımlandığına dair artan raporlar vardır. Daha belirgin örneklerden bazıları, ABD FDA tarafından 2012'de yetim ilaç statüsünde varsayılan, geniş spektrumlu bir antimikrobiyal olarak yeniden kullanılan ve gastrointestinal protozoa tedavisi için klinik bir deneyden geçen bir antiromatizmal artrit ilacı, auranofin (Debnath, et al., 2012); antiviral olarak bir anti-alerjik olan klorosiklizin (He, et al., 2015); insan Afrika tripanozomiyazisinin tedavisi için yeniden tasarlanmış bir antitümör ajan olan eflornitin (Simarro, et al., 2012); viseral Leishmaniasis'i hedef almak üzere kullanılan başka bir antitümör ajan olan miltefosin (Smorenburg, et al., 2000); antiviral ve antibakteriyel aktivite için yeniden tasarlanmış bir antelmintik ilaç olan niklozamid (Imperi, et al., 2013); pentamidin, antibakteriyel olarak yeniden tasarlanmış bir antiprotozoal (Stokes, et al., 2017); antifungal olarak bir antidepresan olan sertralin (Villanueva-Lozano, et al., 2018); bir antifungal olarak bir antitümör olan tamoksifen (Krysan, et al., 2008); antibakteriyel olarak bir antikistik fibroz ilacı

olan ivacaftor (Thakare, et al., 2017); DPIC, geniş spektrumlu bir antibakteriyel olarak bir nitrik oksit sentaz inhibitörü (Pandey, et al., 2017); disülfiram, bir anti-alkolik ilaç, antibakteriyel olarak (Thakare, et al., 2019); ve nöroprotektör olarak kullanılan ebelsen, bir antibakteriyel (Thangamani, et al., 2015a) olarak yeniden tasarlanmıştır.

## **2.9. Ebselen ve Antibakteriyel Etkisi**

Ebselen, PZ51 veya DR3305 olarak da bilinen bir organoselenyum bileşiği olup, yaygın anti-enflamatuar, anti-aterosklerotik ve antioksidatif özelliklerine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu özel ilacın iyi incelenmiş toksikolojik ve farmakolojik bir profili vardır ve şu anda artritis, kardiyovasküler hastalık, inme, ateroskleroz ve kanser gibi farklı rahatsızlıklar için bir tedavi seçeneği olarak klinik çalışmalarda da yer almaktadır (Thangamani, et al., 2016). Thangamani, et al. (2015b), ebselenin, stafilokok, streptokok ve enterokok da dahil olmak üzere bir çok Gram-pozitif patojene karşı güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu, ancak Gram-negatif patojenlere karşı etkili olmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca, Gram-pozitif patojenlere karşı ebselenin aktivitesi, enterokok ve stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde tercih edilen ilaçlar olan vankomisin ve linezolid için belirlenen aktiviteleri aştığı belirlenmiştir. Enterokok ve stafilokok izolatlarının %90'ının inhibe edildiği ebselenin minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK90) sırasıyla 0.5 ve 0.25 mg/L olarak bulunmuştur. Ebselen, vankomisin ve linezolid ile karşılaştırıldığında hücre içi MRSA'da belirgin klerens göstermiştir. Aynı çalışmada, ebselen'in mitokondriyal biyogenezi etkilemeden bakteriyel translasyon sürecini inhibe ettiğini gösterilmiştir. Ayrıca ebselenin MRSA'ya karşı geleneksel antimikrobiallerle sinerjik faaliyetler gösterdiği, güçlü antimikrobiyal aktivite ve güvenlik profilleri ile, potansiyel olarak tek başına veya diğer antibiyotikler ile birlikte çoklu ilaca dirençli gram-pozitif bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilir olduğu belirlenmiştir (Thangamani, et al., 2015a).

Ebselen, "repurposing" yaklaşımında ele alınan moleküller içinde, tiyoredoksin sistemini hedef alan antibakteriyeller olarak değerlendirilen moleküllerdendir. Tiyoredoksinler, sistein tiyol-disülfid değişimi ile diğer proteinlerin indirgenmesini kolaylaştırarak antioksidan görevi gören proteinlerdir. Tiyoredoksinler bilinen tüm organizmalarda bulunur ve memelilerde yaşam için gereklidir. Potansiyel

antimikrobiyal ajanlar olarak bazı mevcut tiyoredoksin sistemi inhibitörleri incelenmiştir. Bunlar arasında auranofin ve ebselen de yer almaktadır. Bugüne kadar, Gram-negatif bakterilerin çoğunun hem bir tiyoredoksin hem de GSH (glutation) sistemi içerirken, Gram-pozitif bakterilerin çoğunun sadece bir tiyoredoksin sistemi içerdiği belirlenmiştir. Bu, tiyol-redoks homeostazının mikrobiyal üreme için kritik rolünü vurgular ve antimikrobiyal ilaç potansiyelinin altını çizmektedir. Ebselen, GSH peroksidaz benzeri aktivitesi nedeniyle antioksidan ve antiinflamatuvar bir ajan olarak görev yapan organoselenium bir ilaçtır (May, et al., 2018). Hayvan çalışmalarından alınan son raporlar, tiyoredoksinin bakteriyel patogenezdaki önemli rolüne ek ışık tutmuştur. Güçlü *in vitro* anti-stafilokok aktivitesi göz önüne alındığında, ebselenin antibakteriyel etki mekanizması üzerine yapılan çalışmalar ve *S. aureus*'a karşı *in vivo* aktivitesini değerlendirmek, ebselen'in çoklu ilaca dirençli stafilokok enfeksiyonlarını tedavi etmek için antibakteriyel bir ajan olarak geliştirilmesi için yararlı olabilir (Thangamani, et al., 2015a).

### **3. MATERYAL-METOT**

#### **3.1. *Staphylococcus* spp. İzolatları**

Tez çalışmasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonunda yer alan, çeşitli dönemlerde Samsun ili ve çevresindeki mastitis olgularından izole edilen 58 adet *Staphylococcus* spp. izolatu kullanıldı.

#### **3.2. Kullanılan Besi Yerleri**

Tez çalışmasında izolatların canlandırılması için Kanlı Agar, saflaştırmak amacıyla Triptik Soy Agar (TSA), biyofilm özelliklerinin belirlenmesi için Congo Red Agar (CRA), *S. aureus* kolonilerinin belirlenmesi amacıyla Mannitol Salt Agar (MSA), antibiyotik duyarlılık testleri için Muller-Hinton Agar (MHA) ve MIC belirlemek amacıyla Muller-Hinton Buyyon kullanıldı.

#### **3.3. İzolatların Canlandırılması**

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonunda bulunan 58 adet *Staphylococcus* spp. izolatının Kanlı Agar'a ekimleri yapılarak 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda üreyen izolatların subkültürleri Triptik Soy Agar'da gerçekleştirildi.

#### **3.4. İzolatların İdentifikasyonu**

##### **3.4.1. Fenotipik İdentifikasyon**

İzolatların fenotipik olarak identifikasyonu amacıyla MSA'a ekimleri yapıldı. Besi yerleri 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda sarı renkli koloniler mannitol pozitif, pembe koloniler mannitol negatif olarak değerlendirildi. Mannitol pozitif izolatlar *S. aureus*, negatif izolatlar ise diğer stafilokoklar olarak tanımlandı (Boynukara, vd., 1999; Murray, 2003).

##### **3.4.2. Genotipik İdentifikasyon**

Stafilokokların cins düzeyinde identifikasyonu 16S rRNA ve *S. aureus* türü için *nuc* spesifik genleri kullanılarak multipleks PCR yapıldı (Çiftci, vd., 2009). PCR'da kullanılan spesifik oligonükleotidler ve bant büyüklükleri Tablo 3.1.'de verildi.

Tablo 3. 1. Stafilokokların tür ve cins düzeyinde identifikasyonunda kullanılan oligonükleotidler

Hedef	Oligonükleotid Dizilimi	Bant Büyüklüğü (bp)	Referans
<i>Staphylococcus</i> spp.	F: AACTCTGTTATTAGGGAAGAACA R: CCACCTTCCTCCGGTTTGTCCACC	756	Çiftci ve vd., 2009
<i>S. aureus</i>	F: GCGATTGATGGTGATACGGTT R: AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	279	

PCR çalışmasında 12,3 ml steril distile, 2,5 µl 10x PCR buffer, 2,5 µl MgCl<sub>2</sub>, 0,7 µl dNTP, her bir primerden 0,4 µl ve 0,4 µl Taq polimeraz konularak toplam 20 µl hacminde PCR karışımı hazırlandı. Karışımın üzerine 5 µl hedef DNA eklenerek hacim 25 µl tamamlandı ve amplifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Amplifikasyon işlemi 94°C'de 5 dakika ön denatürasyon, 10 siklus, 94°C'de 40 saniye denatürasyon, 68°C'de 40 saniye bağlanma, 72°C'de 1 dakika uzama, 25 siklus 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 58°C'de 1 dakika bağlanma, 72°C'de 2 dakika uzama ve 72°C'de 10 dakika olmak üzere ayarlandı. Amplifikasyon koşulları Tablo 3.2.'de verildi. Amplikonlar etidyum bromid (2 mg/ml) içeren %1,5'lik agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi. 756 bp'de spesifik bant oluşumu olan izolatlar *Staphylococcus* spp., 279 bp'de bant oluşturan izolatlar ise *S. aureus* olarak identifiye edildi.

Tablo 3. 2. 16S rRNA ve *nuc* geni için amplifikasyon koşulları

Ön Denatürasyon	Denatürasyon	Bağlanma	Uzama	Final Uzaması	Siklus
94°C/5 dk					
	94°C/40 sn	68°C /40 sn	72°C /1 dk		10
	94°C /1 dk	58°C /1 dk	72°C /2 dk		25
				72°C /10 dk	

### **3.5. Koagülaz Üretiminden Sorumlu *coa* Geninin Belirlenmesi**

Stafilokokların sahip olduğu önemli bir virülens faktörü olan koagülaz enzimi, *coa* geni kullanılarak PCR ile araştırıldı (Fındık, vd., 2018). PCR'da kullanılacak karışım, 12,1 µl steril distile su, 2,5 µl 10X PCR Buffer, 2,5 µl MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl dNTP, her bir primerden 1'er µl, 0,4 µl Taq polimeraz ve 5 µl hedef DNA içerek şekilde 25 µl olarak hazırlandı. Amplifikasyon 95°C'de 2 dakika ön denatürasyon, 30 siklus, 95°C'de 30 saniye denatürasyon, 58°C'de 2 dakika bağlanma, 72°C'de 4 dakika uzama ve 72°C'de 10 dakika son uzama olacak şekilde ayarlandı. Ampliconlar etidyum bromid (2 mg/ml) içeren %1,5'lik agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi. Görüntüleme sonrasında oluşan bant yerleşim yerlerine göre izolatlar polimorfizmlerine göre gruplandırıldı.

### **3.6. İzolatların Biyofilm Özelliklerinin Belirlenmesi**

#### **3.6.1. Biyofilm Oluşturma Özelliğinin Fenotipik Olarak İncelenmesi**

İzolatların fenotipik olarak biyofilm oluşumları Kongo kırmızı agar (CRA) metodu ile kullanılarak araştırıldı.

TSA firmanın belirttiği şekilde hazırlandıktan sonra içerisine %0,01 Kongo kırmızısı eklenerek 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilizasyon işlemi gerçekleştirildi. Besi yeri dökme sıcaklığına geldikten sonra steril filtre kullanılarak %3 glikoz eklendi ve homojen hale getirilerek petri kaplarına döküldü. Sterilite kontrolleri yapıldı.

Taze kültürlerden tek koloni alınarak CRA'ya ekimleri yapıldı ve petriler 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda siyah koloni oluşturan izolatlar fenotipik olarak biyofilm oluşumu yönünden pozitif, pembe renkte koloni oluşumu ise negatif olarak değerlendirildi (Yazdani, et al., 2006).

#### **3.6.2. Biyofilm Oluşturma Özelliğinin Genotipik Olarak Belirlenmesi**

İzolatların genotipik olarak biyofilm oluşumları *icaA* ve *icaD* primerleri kullanılarak PCR ile araştırıldı (Vasudevan, et al., 2003). Genlere ait spesifik oligonükleotid dizilimleri ve bant büyüklükleri Tablo 3.3'te verildi.

Tablo 3. 3.. Biyofilm oluşumundan sorumlu genlerin oligonükleotid dizilimleri ve bant büyüklüğü

Hedef	Oligonükleotid Dizilimi	Bant (bp)	Büyüküğü	Referans
<i>icaA</i>	F: CCTAACTAACGAAAGGTAG R: AAGATATAGCGATAAGTGC		1315	Vasudevan, et al., 2003
<i>icaD</i>	F: AAACGTAAGAGAGGTGG R: GGCAATATGATCAAGATA		381	

*icaA* geni için 12,2 µl steril distile su, 2,5 µl 10x PCR buffer, 2,5 µl MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl dNTP, her bir primerden 1'er µl, 0,3 µl Taq polimeraz konularak 20 µl hacminde karışım hazırlandı ve üzerine 5 µl hedef DNA eklenerek toplam 25 µl'lik karışım amplifiye edildi.

*icaD* geni için 12,2 µl steril distile su, 2,5 µl 10x PCR buffer, 2,5 µl MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl dNTP, her bir primerden 1'er µl, 0,3 µl Taq polimeraz konularak 20 µl hacminde karışım hazırlandı ve üzerine 5 µl hedef DNA eklenerek toplam 25 µl'lik karışım amplifiye edildi. Amplifikasyon koşulları Tablo 3.4.'te verildi.

Tablo 3. 4. *icaA* ve *icaD* gen varlıklarının tespit edilmesinde kullanılan amplifikasyon koşulları

Ön Denatürasyon	Denatürasyon	Bağlanma	Uzama	Final Uzaması	Siklus
	92°C/5 dk				1
	92°C/45 sn	49°C /45 sn	72°C /1 dk		30
				72°C /7 dk	1

Amplikonlar etidyum bromid (2 mg/ml) içeren %1,5'lik agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi. 1315 bp'de bant oluşumu *icaA*, 381 bp'de bant oluşumu ise *icaD* genleri yönünden pozitif olarak değerlendirildi.

### 3.7. İzolatların Antibiyotik Duyarlılık Profillerinin Belirlenmesi

İzolatların saf, taze kültürlerinden FTS içerisinde 0,5 McFarland yoğunluğunda bakteri süspansiyonları hazırlanarak MHA yüzeyine yayma ekim yapıldı. Agar yüzeyine amoksisilin+klavulonik asit (20 µg+10 µg), enrofloksasin (5 µg), okzasilin

(5 µg), sefoksitin (30 µg), vankomisin (30 µg), trimetoprim+sülfametokzazol (1,25/23,75 µg), tetrasiklin (30 µg), neomisin (10 µg), linkomisin (2 µg), sefalotin (30 µg), sefaperazon (75 µg), daptomisin (30 µg), tigesiklin (15 µg) diskleri yerleştirilerek 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında oluşan zon çapları ölçülerek CLSI (2019)’ye göre değerlendirildi.

Antibiyotik duyarlılık sonuçlarına göre izolatların 3 veya daha fazla antibiyotik sınıfına karşı dirençli olması izolatın çoklu antibiyotik direncine sahip olduğu şeklinde değerlendirildi (Magiorakos, et al., 2012).

### 3.8. *mecA* Geninin Belirlenmesi

İzolatların metisilin direnci, bu dirençten sorumlu düşük affiniteli penisilin bağlayıcı protein (PBP 2A)'yı kodlayan *mecA* geni hedefli PCR ile araştırıldı (Çiftci ve vd., 2009). *mecA* genine ait spesifik oligonükleotid dizilimi ve bant büyüklüğü Tablo 3.5’te verildi.

Tablo 3. 5. Metisilin direncinden sorumlu genin oligonükleotid dizilimi ve bant büyüklüğü

Hedef	Oligonükleotid Dizilimi	Bant Büyüklüğü (bp)	Referans
<i>mecA</i>	F: GTAGAAATGACGAACGTCGATA R: CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA	310	Çiftci ve vd., 2009

PCR için 7,40 µl steril distile su, 2,5 µl 10x PCR buffer, 2,5 µl MgCl<sub>2</sub>, 1,4 µl dNTP, her bir primerden 0,4’er µl, 0,4 µl Taq polimeraz ve 10 µl hedef DNA içerecek şekilde 25 µl hacminde karışım hazırlandı. Literatürde bildirilen şekilde amplifiye edildi. Amplifikasyon koşulları Tablo 3.6.’da verildi.

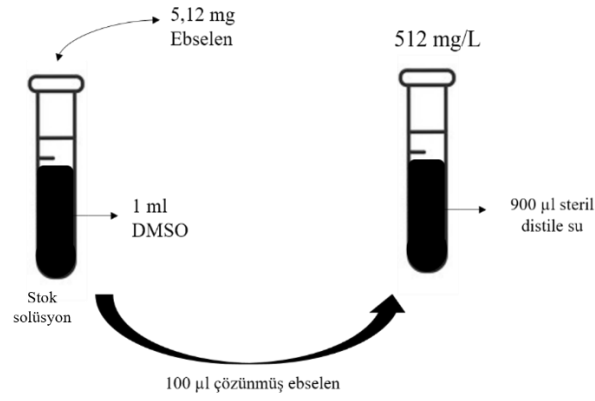
Tablo 3. 6. *mecA* geni için amplifikasyon koşulları

Ön Denatürasyon	Denatürasyon	Bağlanma	Uzama	Final Uzaması	Siklus
94°C/5 dk					1
	94°C/1 dk	50°C /1 dk	72°C /2 dk		35
				72°C /10 dk	1

Amplikonlar etidyum bromid (2 mg/ml) içeren %1,5’lik agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi. 310 bp’deki bant oluşumu *mecA* geni yönünden pozitif olarak değerlendirildi.

### 3.9. Ebselenin Antibakteriyel Etkinliğinin Mikrobuyyon Dilüsyon Yöntemi ile Belirlenmesi

Tez çalışmasında ticari olarak temin edilen ebselen (TCI, E0946) kullanıldı. Antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi için ebselenin sulandırması dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılarak yapıldı. Bu amaçla steril şekilde 5,12 mg tartılan ebselen, 1 ml DMSO içerisinde çözdürüldü. Bu stok solüsyondan 100 µl alınarak, 900 µl steril distile su içerisinde eklendi ve 512 mg/L yoğunluğunda solüsyon elde edildi. MİK hesaplanmasında kullanılan stok solüsyon ve sulandırılması Şekil 3.1.'de verildi.



Şekil 3. 1. MİK hesaplanmasında kullanılan stok solüsyonun hazırlanması

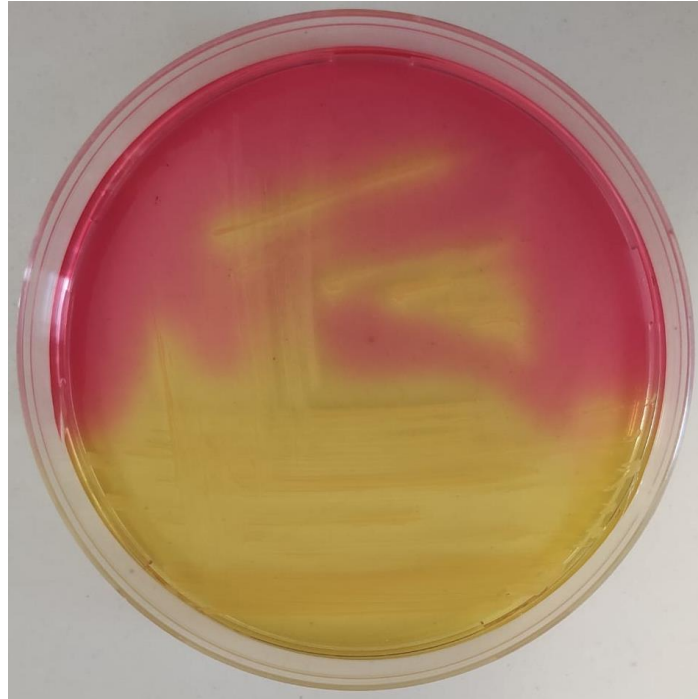
Mikrobuyyon dilüsyon yöntemi için 96 kuyucuklu U-tabanlı mikroplyet kullanıldı. Pleytin tüm kuyularına 100 µl katyon ayarlı Mueller-Hinton Buyyon (KAMHB) eklendi. Ebselenin etkinliği 128 µg/ml - 0,125 µg/ml arasında test edildi. İlk kuyucuğa 100 µl ebselen eklenerek KAMHB karışması sağlandı. Karışımdan 100 µl alınarak ikinci kuyucuğa ilave edilerek karıştırıldı ve bu şekilde test edilecek tüm kuyucuklara bir önceki dilüsyondan 100µl alınarak çift katlı sulandırma işlemi yapıldı. Test edilecek izolatların FTS içerisinde 0,5 McFarland yoğunluğunda bakteri süspansiyonları hazırlandı ve süspansiyonlar 1:10 oranında FTS içerisinde dilüe edilerek kuyucukların üzerine 100 µl inoküle edildi. İnkübasyon esnasında buharlaşmanın önlenmesi için pleyt üzerine steril kapak kapatılarak 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklara üremenin olmadığı son konsantrasyon minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) olarak hesaplandı.



## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

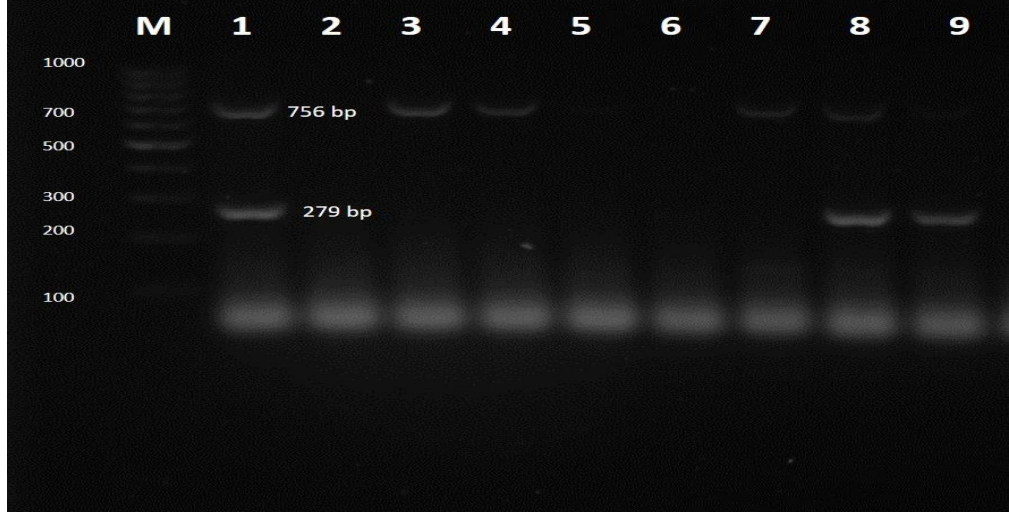
### 4.1. İzolatların İdentifikasyonları

Tez çalışması kapsamında Koyun Kanlı Agar'da canlandırılan izolatların fenotipik ve genotipik identifikasyonları sonucunda 58 izolatın tamamının *Staphylococcus* spp. olduğu belirlendi. İzolatlar içerisinde 24 tanesinin *S. aureus* (%41,3), 34 tanesinin (%58,7) ise non-*S. aureus* (NSA) olduğu tespit edildi. Fenotipik identifikasyon amacıyla MSA'ya yapılan ekimler sonucunda temsili üremeler Şekil 4.1.'de sunuldu.



Şekil 4. 1. MSA 'da *S. aureus* 'ün fenotipik identifikasyonu

Genotipik identifikasyonlarında kullanılan 16S rRNA (*Staphylococcus* spp.) ve *nuc* geninin (*S. aureus*) tespit edilmesine yönelik yapılan PCR'a ait görüntüleme sonucu Şekil 4.2'de verildi.



Şekil 4. 2. PCR ile yapılan *Staphylococcus* spp. ve *S. aureus* 'ün genotipik identifikasyonu

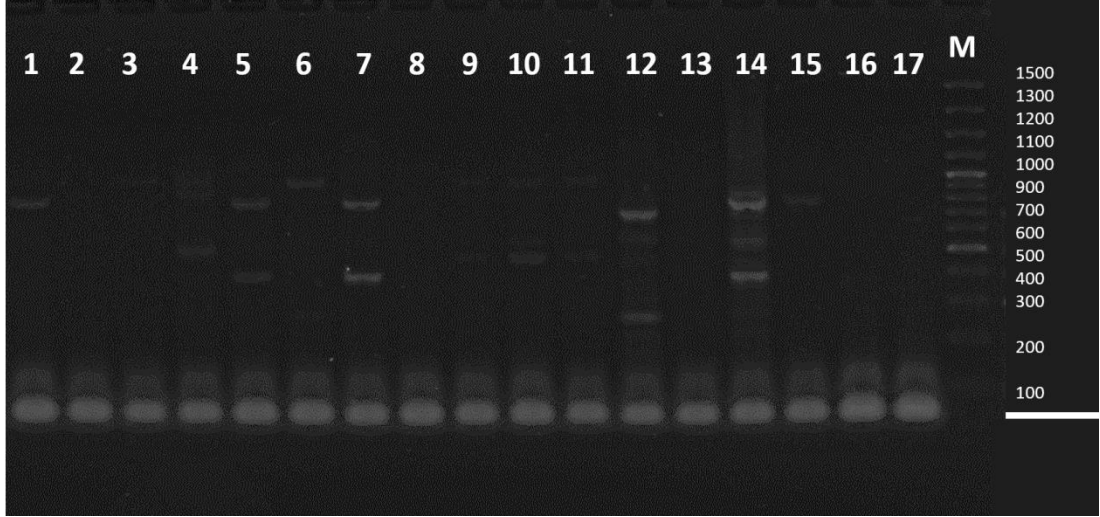
(M: Marker; 3,4,7: *Staphylococcus* spp. izolatları, 1;8;9: *S. aureus* izolatları; 2;5;6: Negatif kontrol)

#### 4.2. İzolatların *coa* Gen Profillerinin Belirlenmesi

Yapılan PCR sonucunda *S. aureus* izolatlarından 11 (%45,8) tanesinin *coa* genine sahip olduğu diğer 13 (%54,2) izolatın ise *coa* geni içermediği tespit edildi. Pozitif izolatlar arasındaki polimorfizm değerlendirildiğinde izolatların yedi (C1-C7) farklı *coa* tipine sahip olduğu saptandı. Ayrıca *coa* pozitif *S. aureus* izolatlarının 300 – 1000 bp arasında bant aralığında varyasyon gösterdiği belirlendi. *coa* genine sahip *S. aureus* izolatlarının gösterdiği polimorfizm ve tespit edilen gruplar, Tablo 4.1.'de sunuldu. Ayrıca *coa* geninin saptanması için gerçekleştirilen PCR sonucunda elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.3.'te verildi.

Tablo 4. 1. *S. aureus* izolatlarının *coa*-tiplendirmesi ve oluşan bant büyüklükleri

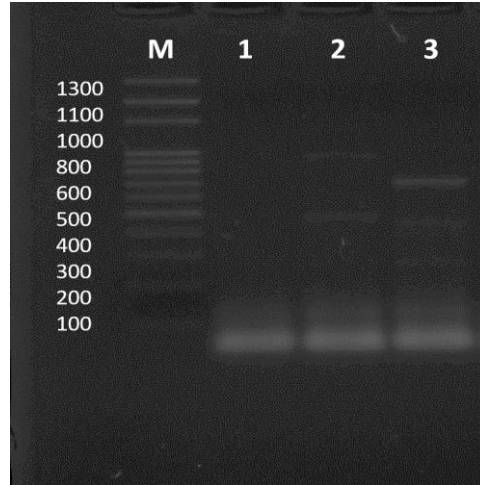
İzolat Numarası	İzolatın yer aldığı <i>coa</i> tipi	Oluşan Bant Büyüklüğü
6	C1	800 bp
7	C4	500 bp + 900 bp
31	C3	400 bp + 700 bp
50	C5	1000 bp
66	C3	400 bp + 700 bp
72	C2	500 bp + 1000 bp
74	C2	500 bp + 1000 bp
76	C2	500 bp + 1000 bp
91	C6	300 bp + 600 bp + 700 bp
96	C7	400 bp + 500 bp + 800 bp
98	C1	800 bp



Şekil 4. 3. *coa* geninin tespit edilmesine yönelik yapılan PCR'ın görüntülemesi

(M: Marker; 2,3,8,13,16,17: *coa* genine sahip olmayan *S. aureus* izolatları; 1,4,5,6,7,9,10,11,12,14,15: *coa* genine sahip *S. aureus* izolatları)

NSA izolatlarından 2 (%5,8) tanesinin *coa* genine sahip olduğu diğer 32 izolatın ise *coa* geni içermediği ortaya konuldu. Yapılan *coa* tiplendirmesine göre pozitif iki izolatın da birbirinden farklı profil gösterdiği belirlendi. 63 numaralı NSA izolatının 450 ve 900 bp'de bant oluşturduğu, 80 numaralı izolatın ise 250, 450 ve 900 bp'de bant oluşturduğu saptandı. NSA izolatlarına ait PCR görüntüsü Şekil 4.4.'de sunuldu.



Şekil 4. 4. *coa* geninin NSA izolatlarındaki varlığının PCR ile tespit edilmesi

(M: Marker; 1: *coa* genine sahip olmayan NSA izolatı; 2,3: *coa* genine sahip NSA izolatları)

Koagülaz negative stafilokoklar (KNS), hayvan ve insanlarda kommensal bakteri olarak düşünülmesine rağmen, son yapılan çalışmalarla KNS'nin mastitis başta olmak üzere birçok enfeksiyondan izole edildiği bildirilmektedir (Goetz et al., 2017). KNS'lerin tanımı halen, patojen olmayan stafilokoklar olarak yapılmasına rağmen, günümüzde bu durum değişiklik göstermiş olup hastalık olgularından izole edilmeye başlanmıştır. Bu nedenle stafilokokların ayırt edilmesi klinik ihtiyacın karşılanmasında büyük önem arz etmektedir. KNS'ler içerisinde nozokomiyal enfeksiyonlara da neden olan *S. epidermidis* ve *S. haemolyticus* iki önemli tür olarak ön plana çıkmaktadır (Becker et al., 2014). Stafilokoklarda, insan ve hayvanlarda kolonize olma, enfeksiyona neden olma, immun sistemden kaçış, adezyon ve agresyon mekanizmaları türe özgü şekilde gelişmiştir. Ayrıca, *S. aureus* ile kıyaslandığında, *S. epidermidis*'in biyofilm oluşumu haricinde diğer virülens faktörleri şu anda tam olarak tanımlanmamıştır. Genel olarak KNS izolatlarının agresyondan sorumlu virülens özelliklerinin olmadığı düşünülmektedir (Becker et al., 2014).

Karahan ve Çetinkaya (2007) tarafından yapılan çalışmada, 700 farklı subklinik mastitis vakasından örnekleme yapılmıştır. İzolasyon sonunda 367 (%52,4) izolat *Staphylococcus* spp. olarak tanımlanmıştır. *S. aureus* izolatlarının tespit edilmesine yönelik yapılan PCR ile 200 (%28,7) izolatın *S. aureus* olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada izolatların *coa* gen varlığı ve gösterdikleri polimorfizm de değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeye göre 161 (%80,5) *S. aureus* izolatının *coa* genine sahip olduğu ortaya konulmuştur. Bu izolatlardan 135 (%83,9) tanesinin 500-1400 bp aralığında tek bant oluşturduğu, 26 (%16,1) tanesinin ise çift bant oluşturduğu tespit edilmiştir. Polimorfizmin belirlenmesi amacıyla *AluI* ve *Hin6I* genleri kullanılarak yapılan PCR çalışmasında sırasıyla 23 ve 22 farklı *coa* genine sahip *S. aureus* grubu olduğu rapor edilmiştir. Su et al. (2000) tarafından yapılan çalışmada *S. aureus* izolatlarının 41 farklı *coa* genotipi olduğu tespit edilmiştir. Fındık vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada stafilokok izolatlarından 23 (%51,1) izolatın *coa* genine sahip olduğu, negatif olan 11 izolatın 3 (%27,2) tanesinin *S. aureus*, 8 (%72,7) tanesinin ise NSA olduğu bildirilmiştir. *coa* genine sahip izolatların polimorfizmleri değerlendirildiğinde, 190 – 990 bp aralığında bant içeren on farklı grubun varlığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada tanımlanan 5 MRSA izolatının 3 farklı *coa* tipine sahip olduğu bildirilmiştir. Çalışmada yer alan

*coa* genine sahip NSA izolatlarının ise 300 bp'de tek bant içerdiği ve aynı *coa* grubunda yer aldığı bildirilmiştir.

Tez çalışmasındaki *S. aureus* izolatları *coa* ve *mecA* genlerine sahip olmaları açısından değerlendirildiğinde; 6 izolatın hem *coa* hem de *mecA* genine sahip olduğu belirlendi. Bu 6 izolattan 3 tanesinin fenotipik olarak da metisiline dirençli olduğu tespit edildi. *mecA* ve *coa* genlerine sahip 6 izolatın *coa* tiplendirmelerine göre gruplandırılmaları sonucunda 31 ve 66 numaralı *S. aureus* izolatlarının C3 grubunda olduğu saptandı. Fındık vd. (2018) tarafından yapılan çalışmaya göre tespit edilen MRSA izolatlarının farklı *coa* tiplerinde olduğu, tez çalışmasıyla da benzerlik göstermektedir. Bu izolatların aynı zamanda antibiyotiklere karşı dirençli olduğu bu nedenle halk sağlığını da tehdit etme potansiyeli taşıdığı düşünülmektedir. NSA izolatlarında ise *coa* genine sahip olan izolatlarda *mecA* geninin olmadığı ve izolatların fenotipik olarak metisiline dirençli olmadığı tespit edildi. Daha önce yapılan çalışmalar ile metisiline dirençli olan KNS izolatlarının büyük çoğunluğunun klasik *mecA* genini içerdiklerini belirlenmiştir. Bunun yanı sıra hayvan orijinli olan NSA izolatları içerisinde yer alan *S. sciuri* ve *S. vitulinus* izolatlarının *mecA* geninin allotipi olan *mecA1* ve *mecA2*'ye sahip oldukları ortaya konulmuştur (Wu et al., 1998; Tsubakishita et al., 2010).

Bazı KNS izolatlarının bakteriyosin üreterek süt sığırlarında mastitise neden olan KNS'ler, *S. aureus*, *S. uberis*, *S. agalactiae* gibi patojenlere karşı antibakteriyel aktivite ortaya çıkarttığı bildirilmektedir (dos Santos Nascimento et al., 2005; Ceotto et al., 2010; Brito et al., 2011; Braem et al., 2014). Bu bakteriyosinler, meme dokusunda türler arası rekabette rol oynamaktadır (De Vuyst and Leroy, 2007). Ayrıca bakteriyosinler, epitel yüzeyinde kommensal olarak bulunan bakteriler tarafından sentezlenen biyofilm sayesinde bazı patojenlerin kolonize olmasını da önlemektedir (Rickard et al., 2003; Kuboniwa et al., 2006). Biyofilm oluşturan KNS izolatlarının, süt sığırlarından izole edildiği çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Piessens et al., 2012; Simojoki, et al., 2012; Tremblay et al., 2013), fakat bu bulgunun SCC'deki artışla ilişkili olmadığı bildirilmiştir (Simojoki et al., 2012; Tremblay et al., 2013). Buna rağmen KNS'ler tarafından oluşturulan biyofilm formasyonunun izolatların çevrede taşınmasının ve çevresel koşullardan daha az etkilenmesini sağladığı düşünülmektedir (Tremblay et al., 2013). KNS izolatları arasında güçlü biyofilm formasyonunun olduğu izolatların genellikle laktasyon

döneminin ileriki safhalarında görülmesi arasında bir ilişki olduğu rapor edilmiştir (Tremblay et al., 2013).

Tez çalışmasındaki izolatların *coa* gen varlığı ve biyofilm oluşturmaları/biyofilm oluşumundan sorumlu *icaA* ve *icaD* gen varlıkları ortak olarak değerlendirildiğinde; *S. aureus* izolatlarının C1 grubundaki 98 numaralı izolatın *icaA* genine sahip olduğu ve fenotipik olarak biyofilm oluşturduğu belirlenirken, 6 numaralı izolatta sadece fenotipik olarak biyofilm oluşumunun olduğu tespit edildi. Diğer 9 (%81,8) izolatta ise fenotipik olarak biyofilm oluşumunun olmadığı saptandı. Ayrıca izolatlar *coa* ve *icaA* gen varlıklarına göre değerlendirildiğinde sadece C1 grubundaki 98 numaralı izolatın (%9,1) hem *icaA* hem de *coa* genine sahip olduğu tespit edildi. Hem *icaD* hem de *coa* gen varlıklarına sahip izolatların ise C3 ve C5 *coa* tipinde yer alan birer izolat (%18,1) olduğu ortaya konuldu. NSA izolatları içerisinde ise CNSA2 grubunda yer alan 80 numaralı izolatın genotipik olarak *icaA* genine sahip olduğu fakat fenotipik olarak biyofilm oluşumunun olmadığı belirlendi. CNSA1 grubunda yer alan 63 numaralı izolatın ise fenotipik olarak biyofilm oluşturmadığı ve *icaA*, *icaD* genlerine sahip olmadığı tespit edildi.

Biyofilm oluşumu KNS'nin önemli bir virülens faktörü olarak patojenitede görev aldığı düşünülmektedir. Ayrıca bazı araştırmacılar, KNS'nin meme dokusundaki kolonizasyonunun diğer çevresel patojenlerin bulaşmasının önlenmesinde önemli rol oynadığını düşünmektedir. KNS'nin meme dokusunun korunmasında ve diğer patojenlerin bulaşmasının önlenmesindeki rolü henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Goetz et al., 2017). Pyörälä and Taponen (2009) tarafından yapılan araştırmanın sonucuna göre KNS'nin diğer esas mastitis patojenleri kadar patojenin olmadığı ve enfeksiyonun çoğunlukla subklinik kaldığı bildirilmektedir. Bununla birlikte, KNS'nin de içinde bulunduğu mastitis olgularında, somatik hücre sayısında artış ve süt kalitesinde düşüşle sonuçlanan persiste enfeksiyonlara neden olabileceği rapor edilmektedir. Ayrıca biyofilm formasyonu, süt sığırlarında görülen mastitis ve diğer bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde bilinçsiz ve aşırı antibiyotik kullanımı nedeniyle KNS izolatlarının antibiyotiklere karşı duyarlılığının azalmasına sebep olmaktadır (Tremblay et al., 2014). Biyofilm formasyonunun oluşumunun, KNS ve diğer mastitise neden olan bakteriyel etkenler üzerindeki etkisi tam olarak araştırılmamıştır. Goetz, et al. (2017) tarafından yapılan çalışmada bu durum açıklanmaya çalışılmıştır. Çalışmaya göre, bazı KNS izolatlarının, üreme

inhibisyonunun olmadığı bir mekanizma ile diğer stafilokokların biyofilm oluşturma yeteneklerini olumsuz etkileyebileceğini rapor etmiştir.

Son on yılda, KNS izolatlarının piyasada konvansiyonel tedavide sık olarak kullanılan antibakteriyellere karşı duyarlılıklarının azaldığı bildirilmiştir. Özellikle, penisilin, oksasilin, siprofloksasin, klindamisin, eritromisin ve gentamisin kullanımının sık olmasına bağlı olarak sözü geçen antibakteriyellere karşı ciddi direnç artışlarının olduğu rapor edilmiştir (Lyytikäinen, et. al., 1996; Kresken and Hafner, 1999). Tez çalışmasında belirlenmiş olan antibakteriyel direncin KP-NSA izolatlarında, koagülaz pozitif *S. aureus* (KP-SA)'lara kıyasla daha az oranda görüldüğü tespit edildi fakat KNSA izolatlarından bir izolatın ve KP-NSA izolatlarından ise üç tanesinde çoklu antibiyotik direncinin olduğu saptandı.

*coa* genine sahip izolatlarda ebselenin MİK değerleri farklılık göstermektedir. KP-SA izolatlarında MİK değerinin 0,125 µg/ml – 32 µg/ml arasında değişiklik gösterdiği belirlendi. Çalışmadaki 91 numaralı *S. aureus* izolatı için ebselene MİK değerinin oldukça yüksek olduğu (32 µg/ml), 6 numaralı izolat için ise daha düşük olmakla beraber diğer izolatlar için elde edilen değerlerden yüksek olduğu (8 µg/ml), diğer koagülaz pozitif *S. aureus* izolatları için ebselenin MİK değerlerinin çok daha düşük olduğu belirlendi. KP-NSA izolatlarında ebselenin MİK değerinin 0,25 µg/ml olduğu saptandı. Koagülaz pozitif ve negatif stafilokoklarla birlikte özellikle çoklu antibiyotik direnci gösteren başka etkenlerin (*Enterococcus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas* gibi) da yer aldığı çok daha geniş çaplı daha ileri çalışmalarla ebselenin antibakteriyel etkinliğinin değerlendirilmesinin önemli olduğu düşünüldü. Ayrıca çalışmadaki KNS suşlarının ne derecede biyofilm oluşturduğu, bu suşların diğer stafilokokların biyofilm oluşumuna veya üremesine olan etkilerinin incelenmesi de önemli görülmektedir.

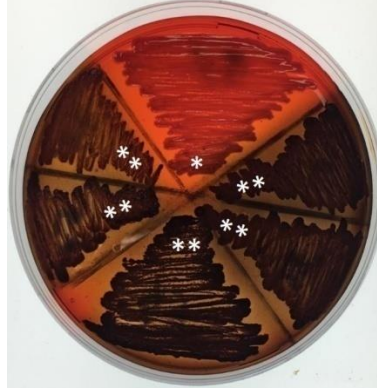
### **4.3. İzolatların Biyofilm Özelliklerinin Belirlenmesi**

#### **4.3.1. Fenotipik Olarak Biyofilm Özelliklerinin Belirlenmesi**

58 izolatın saf kültürlerin tek koloni alınarak CRA'ya yapılan ekimleri sonucunda izolatlar biyofilm oluşturma yeteneğine göre ayrıldı.

24 adet *S. aureus* izolatının 18 tanesinin (%75), NSA olan 34 izolatın tamamının CRA'da siyah koloni oluşturduğu belirlenerek bu izolatların fenotipik

olarak biyofilm oluşturduğu belirlendi. Fenotipik olarak biyofilm oluşturan ve oluşturmeyan izolatlara ait agar görüntüleri Şekil 4.5.'te sunuldu.



Şekil 4. 5. Fenotipik olarak biyofilm oluşturan/oluşturmeyan izolatların CRA 'da belirlenmesi (\*: Biyofilm oluşturmeyan izolat, \*\*: Biyofilm oluşturan izolatlar)

*S. aureus*, biyofilm oluşturabilen gıda kaynaklı önemli bir patojendir. Bu patojen, süt ve süt ürünleri tüketimi ile ilişkili gıda kaynaklı hastalıkların salgınlarından sorumludur. Avila-Novoa, et al. (2018), toplam 84 *S. aureus* suŐunun biyofilm oluşumunu, Kongo kırmızısı agar plaklarında kültür ile fenotipik olarak karakterize etmişlerdir. CRA'da, *S. aureus* izolatlarının %75'i biyofilm üreticisi, %16.6'sı biyofilm oluşumu yönünden negatif bulunmuŐ, %8.3' ise karakteristik olmayan bir fenotip sergilemiŐtir.

Çiftci, vd. (2006) tarafından yapılan çalışmada 59 adet *S. aureus* izolatının fenotipik olarak biyofilm oluşumu aynı metotla incelenmiş olup izolatlardan 22 tanesinin (%37,2) biyofilm oluşturduğu belirlenmiştir. Melo, et al. (2013) tarafından yapılan çalışmada ise sublinik mastitis vakalarından 94 adet *S. aureus* izole edilmiş olup CRA'da biyofilm oluşumu yönünden fenotipik olarak değerlendirilme yapılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre izolatların 80 tanesinin (%85,11) biyofilm ürettiği ortaya konulmuştur.

Tez alıŐması sonucunda elde edilen stafilokokların biyofilm oluŐurma yetenekleri karşılaştırıldığında yapılan diğer çalışmalarla verilerimizin paralellik gösterdiği ve stafilokok izolatlarının büyük bir kısmının biyofilm oluşturduğu belirlenmiştir.

### 4.3.2. Genotipik Olarak Biyofilm Özelliklerinin Belirlenmesi

Tez çalışmasında stafilokok olarak doğrulanan 58 izolatın biyofilm oluşumundan sorumlu *icaA* ve *icaD* genleri PCR ile araştırıldı. PCR sonucunda 24 adet *S. aureus* izolatının 3 adedinde *icaA* genine rastlanırken, 6 izolatta *icaD* geni olduğu tespit edildi. Toplam olarak 9 (%37,5) suşun genotipik olarak biyofilm pozitif olduğu belirlendi. *icaA* genine sahip 2 izolatın CRA'da fenotipik olarak biyofilm oluşturduğu belirlenirken, bu gene sahip diğer izolatın ise fenotipik olarak biyofilm oluşturmadığı tespit edildi. Bunun yanı sıra 14 adet *S. aureus* izolatının (%58,3) CRA'da biyofilm oluşumunun olduğu fakat *icaA* ve *icaD* genlerine sahip olmadığı belirlendi.

NSA izolatlarında, 2 izolatın *icaD* genine, 13 izolatın ise *icaA* genine sahip olduğu belirlendi. Toplam olarak NSA suşlarında genotipik olarak biyofilm oluşumu %44,11 olarak belirlendi. *icaD* genine sahip bir izolatın CRA'da fenotipik olarak biyofilm oluşturduğu tespit edilirken diğer izolatın biyofilm oluşturmadığı belirlendi. *icaA* geni içeren 6 izolatın genotipikfenotipik olarak biyofilm oluşturduğu pozitif olduğu fakat 7 izolatın fenotipik olarak biyofilm oluşturmadığı tespit edildi. 11 NSA izolatının ise fenotipik olarak biyofilm oluşturduğu fakat *icaA* ve *icaD* genlerine sahip olmadığı PCR ile ortaya konuldu. *S. aureus* izolatlarının ve NSA izolatlarının fenotipik biyofilm oluşumu ve genotipik bulguları Tablo 4.2.'de ve Tablo 4.3.'e sunuldu.

Tablo 4. 2. *S. aureus* izolatlarının fenotipik ve genotipik bulguları

İzolat No	CRA	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>
6	‡		
7	‡		
39	‡		
58	‡		
65	‡		
66	‡		
72	‡		
74	‡		
76	‡		
79	‡		
81	‡		
91	‡		

İzolat No	CRA	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>
92	‡		
96	‡		
41	‡		‡
50	‡		‡
47	—	‡	
19	—		‡
28	—		‡
31	—		‡
40	—		‡
30	—		
93	‡	‡	
98	‡	‡	

Tablo 4. 3.. NSAizolatlarının fenotipik ve genotipik bulguları

İzolot No	CRA	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>
38	‡		
60	‡		
70	‡		
71	‡		
82	‡		
87	‡		
90	‡		
94	‡		
101	‡		
105	‡		
107	‡		
29	‡		‡
64	—	‡	
67	—	‡	
73	—	‡	
80	—	‡	
86	—	‡	

İzolot No	CRA	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>
95	—	‡	
97	—	‡	
15	—		‡
18	—		
48	—		
54	—		
63	—		
84	—		
85	—		
103	—		
104	—		
49	‡	‡	
53	‡	‡	
62	‡	‡	
77	‡	‡	
88	‡	‡	
102	‡	‡	

Salina, et al. (2020) tarafından yapılan çalışmada *S. aureus* izolatlarında *icaA*, *icaD* ve *bap* genlerinin sırasıyla %82, %83 ve %58 oranında olduğu saptanmıştır. Bunun yanı sıra 100 adet *S. aureus* izolatının %56'sının her üç geni de içerdiği belirlenmiştir. CRA'da fenotipik olarak biyofilm oluşturan *S. aureus* izolatlarının 25 adet olduğu ve 17 tanesinin ise *icaD* genine sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada 2 *S. aureus* izolatının biyofilm oluşumundan sorumlu genlere sahip olmadığı fakat CRA'da fenotipik olarak biyofilm oluşturduğu ortaya konulmuştur.

Avila-Novoa, et al. (2018), düşük dereceli biyofilm oluşumuna sahip *S. aureus* izolatlarının %76.1'inde en az bir hücreler arası adhezyon (PIA) geni tespit etmişlerdir. *icaADBC* lokusunun genlerinden bazıları suşların çoğunda tespit edilmiş, *icaADBC* genleri ve CRA arasında pozitif bir korelasyon bulunmuştur. Kırdört suşun (%52,38), biyofilm oluşturma yeteneklerini destekleyen *icaADBC* lokusunun 4 genini barındırdığı bulunmuştur. *S. aureus* suşlarının çoğu, biyofilmi *ica* genine bağlı bir mekanizma içinde oluşturmuştur. Bu bulgu, çeşitli kaynaklardan (tavuk, gıda

numuneleri ve keçiler) izole edilen *S. aureus* suşlarının %87.5'inde *icaAD* ve *icaBC* tespit eden Tang, et al. (2013)'nın bulguları ile benzer bulunmuştur. Ayrıca Gutierrez, et al. (2012) süt, et ve deniz ürünleri endüstrilerindeki çeşitli gıda temas yüzeylerinden toplanan *S. aureus* suşlarının %100'ünün *icaA* ve *icaD* genleri için pozitif olduğunu göstermiştir.

Ülkemizde Çiftci, vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada, sığır mastitis olgularından izole edilen 59 adet *S. aureus* izolatının 16'sının *icaA* genine 38 tanesinin ise *icaD* genine sahip olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca izolatlardan 15 tanesinin (%25.4) hem *icaA* hem de *icaD* genlerine sahip olduğu, bu izolatlardan 8 tanesinin ise CRA'da fenotipik olarak biyofilm oluşumunun olduğu tespit edilmiştir. 59 suşun ise 16'sı (%27.1) *icaA* için pozitif ve 38'i (%64.4) *icaD* geni için pozitif bulgularını elde etmişlerdir.

Darwish and Asfour (2013), tüm mastitis kökenli stafilokok izolatlarını, biyofilm ile ilgili genler, *icaA*, *icaD* varlığı açısından taramışlardır. *S. aureus* izolatlarında, *icaA* ve *icaD* genlerinin pozitif oranlarını sırasıyla %15 ve 62.5, CNS'de ise sırasıyla %5.9 ve %47.1 olarak belirlemişlerdir. Bu çalışmada da, *S. aureus* sularında *icaA* ve *icaD* genleri sırasıyla %12,5 ve %25, koagulaz negatif *S. aureus* suşlarında *icaA* ve *icaD* genleri sırasıyla %15,38 ve %30,76, koagulaz negatif NSA suşlarında ise, sırasıyla %34,37 ve %6,25 bulunmuştur. Bu haliyle gen varlığı yüzdeleri bakımından *S. aureus* suşlarındaki oranlar uyumlu görülürken, bu çalışmadaki NSA suşlarında *icaA* gen yüzdesi *icaD*'ye göre daha yüksek bulundu. Nasr ve ark. (2012), beklenmedik bir şekilde, izolatların %36'sının *icaAD* negatifken CRA pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca *icaAD* geninin varlığının da *in vitro* biyofilm oluşumu ile her zaman korele olmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada da *icaA* ve *icaD* genleri negatif olan 14 (%58,3) *S. aureus* izolatının ve 11 (%32,3) NSA izolatının fenotipik olarak CRA'da pozitif olduğu belirlenmiş olup yukarıdaki çalışmanın sonuçları ile uyumlu görülmektedir. Benzer şekilde, *ica* genlerinden birine sahipken fenotipik olarak negatif olan 5 (%20,8) *S. aureus* ve 8 (%23,5) NSA suşu tespit edildi. *icaAD* geninin yokluğunda bazı izolatların biyofilm oluşturma yeteneği, *ica*'dan bağımsız biyofilm oluşum mekanizmalarının daha ileri genetik araştırmalarının önemini vurgulamaktadır.

#### 4.4. Antibiyotik Duyarlılık Profilinin ve Çoklu Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi

İzolatların antibiyotik duyarlılıkları Kirby-Bauer Disk Difüzyon metodu kullanılarak belirlendi. Taze kültürlerden yapılan antibiyotik duyarlılık testi sonucunda oluşan zon çapları CLSI (2019) tarafından bildirilen kılavuza uygun şekilde değerlendirildi.

24 adet *S. aureus* izolatının değerlendirilmesi sonucunda, izolatların tamamının sefoksitin, sefaperazon, tigesiklin, enrofloksasin ve amoksisilin + klavulanik asitde duyarlı olduğu, 8 izolatın (%33,3) oksasiline dirençli, 6'sının (%25) ise orta derecede duyarlı olduğu belirlendi. İzolatlardan bir tanesinin (%4,1) sefalotine, 6 izolatın (%25) tetrasikline, 5 izolatın (%20,8) daptomisine, bir izolatın (%4,1) vankomisine, 4 tanesinin (%16,6) trimetoprim + sulfometokzazole, 2 tanesinin (%8,3) neomisine ve 10 tanesinin (%41,6) ise linkomisine dirençli olduğu tespit edildi. *S. aureus* izolatlarının antibiyotik duyarlılık /dirençlilik durumlarının profili Tablo 4.4.'te sunuldu.

Tablo 4. 4. *S. aureus* izolatlarının çeşitli antibiyotiklere karşı direnç profilleri

		Antibiyotik Etken Maddeleri												
		A <sup>1</sup>	E <sup>2</sup>	OX <sup>3</sup>	FOX <sup>4</sup>	V <sup>5</sup>	SXT <sup>6</sup>	T <sup>7</sup>	N <sup>8</sup>	MY <sup>9</sup>	CT <sup>10</sup>	CP <sup>11</sup>	DP <sup>12</sup>	TiG <sup>13</sup>
R	n	0	0	8	0	1	4	6	2	10	1	0	5	0
	%	0	0	33,3	0	4,1	16,6	25	8,3	41,6	4,1	0	20,8	0
I	n	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	%	0	0	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S	n	24	24	10	24	23	20	18	22	14	23	24	19	24
	%	100	100	41,6	100	95,8	83,3	75	91,6	58,3	95,8	100	79,1	100

1: amoksisilin+klavulonik asit, 2: enrofloksasin, 3: oksasilin, 4: sefoksitin, 5: vankomisin, 6: trimetoprim+sulfometokzazol, 7: tetrasiklin, 8: neomisin, 9: linkomisin, 10: sefalotin, 11: sefaperazon, 12: daptomisin, 13: tigesiklin, R: dirençli, I: orta derecede duyarlı, S: duyarlı

34 adet NSA izolatının antibiyotiklere direnç durumları belirlendi. Değerlendirme sonucunda bir izolatın (%2,9) amoksisilin + klavulanik aside, 17 izolatın (%50) oksasiline, iki izolatın sefoksitine (%5,8), 5 izolatın (%14,7) sefalotine, 30 izolatın (%88,2) sefaperazona, 7 izolatın (%20,5) tetrasikline, bir izolatın (%2,9) tigesikline, 2 izolatın (%5,8) vankomisine, 12 izolatın (%35,2) daptomisine, bir izolatın (%2,9) enrofloksasine, 4 izolatın (%11,7) trimetoprim +

sülfometokzazole, 7 izolatın (%20,5) neomisine ve 20 izolatın (%58,2) ise linkomisine dirençli olduğu belirlendi. İzolatların duyarlılık durumları Tablo 4.5.'te verildi.

Tablo 4. 5. NSAizolatlarının çeşitli antibiyotiklere karşı direnç profilleri

		Antibiyotik Etken Maddeleri												
		A <sup>1</sup>	E <sup>2</sup>	OX <sub>3</sub>	FOX <sup>4</sup>	V <sup>5</sup>	SXT <sup>6</sup>	T <sup>7</sup>	N <sup>8</sup>	MY <sup>9</sup>	CT <sup>10</sup>	CP <sup>11</sup>	DP <sup>12</sup>	TiG <sup>13</sup>
R	n %	1 2,9	1 2,9	17 50	2 5,8	2 5,8	4 11,7	7 20,5	7 20,5	20 58,8	5 14,7	30 88,2	12 35,9	1 2,9
I	n %	0 0	0 0	9 37,5	0 0	0 0	0 0	0 0	27 79,4	0 0	4 16,6	4 16,6	0 0	0 0
S	n %	33 97,1	33 97,1	8 23,5	32 94,1	32 94,1	30 88,2	79,1	0 0	14 41,1	25 73,5	0 0	22 64,7	33 97,1

1: amoksisilin+klavulonik asit, 2: enrofloksasin, 3: oksasilin, 4: sefoksitin, 5: vankomisin, 6: trimetoprim+sülfometokzazol, 7: tetrasiklin, 8: neomisin, 9: linkomisin, 10: sefalotin, 11: sefaperazon, 12: daptomisin, 13: tigesiklin, R: dirençli, I: orta derecede duyarlı, S: duyarlı

Çoklu antibiyotik direnci, bir bakteri izolatının üç veya daha fazla antibiyotik sınıfına karşı dirençli olması olarak tanımlanmaktadır (Magiorakos, et al., 2012). Tez çalışmasında kullanılan 24 adet *S. aureus* izolatından 6 tanesinin (%25) çoklu antibiyotik direncine sahip olduğu belirlendi. İzolatlardan 5 tanesinin 3 farklı antibiyotik sınıfına, diğer izolatın ise 4 sınıfa dirençli olduğu tespit edildi. 18 izolatın ise çoklu antibiyotik direncine sahip olmadığı belirlendi.

NSA izolatlarında çoklu antibiyotik direncinin varlığı değerlendirildiğinde, 34 izolattan 9 tanesinin 3 farklı antibiyotik sınıfına karşı dirençli olduğu, 2 tanesinin ise 4 farklı antibiyotik sınıfına karşı dirençli olduğu belirlendi. Tüm NSA izolatları arasında %32,35 oranında çoklu antibiyotik direnci belirlendi. 23 izolatın ise çoklu antibiyotik direncine sahip olmadığı tespit edildi.

Chandrasekaran, et al. (2014) tarafından yapılan çalışmada 401 adet sığır mastitis kökenli izolatlardan 235 tanesinin antibiyotiklere dirençli olduğu bildirilmiştir. Dirençli olan stafilocok izolatlarının %5,11'inin MRSA olduğu tespit edilmiştir. İzolatların yüksek oranda duyarlı olduğu antibiyotikler ise, enrofloksasin, amoksisilin + sülbaktam, gentamisin ve seftriakson olarak bildirilmiş olup penisilin, amoksisilin, oksitetrasiklin ve metisiline yüksek oranda direnç olduğu rapor edilmiştir. Aynı zamanda çalışmada, MRSA izolatları dışındaki izolatlarda çoklu

antibiyotik direncinin olmadığı da belirlenmiştir. Bu çalışmada okzasilin direnci *S. aureus* suşları arasında %33,3 (8/24) olmakla birlikte disk difüzyon testinde duyarlı ve intermediyer duyarlı suşların oranı sırasıyla %25 ve %41,6 bulundu. Bununla birlikte *mecA* geni pozitif olup disk difüzyon testinde (fenotipik olarak) yetişilin direnci negatif olan suşların oranı ise %20,8 (5/24) olarak bulundu. Bu çalışmada, fenotipik olarak MRSA şeklinde tanımlanan suşların %83,3'ünün aynı zamanda MDR olduğu, fenotipik olarak yetişilin dirençli olduğu belirlenen NSA suşlarında ise MDR oranının %54,54 olduğu belirlendi. Ayrıca Chandrasekaran, et al. (2014)'nın bulgularındaki benzer şekilde metisilin direnci fenotipik olarak negatif olan suşlarda sadece 1 suş dışında çoklu antibiyotik direncinin olmadığı belirlendi.

Salauddin, et al. (2020) tarafından Bangladeş'te yapılan çalışmada, 48 tane sığır mastitis vakasından *S. aureus* izolasyonu yapılmıştır. 15 farklı antibiyotik etkeni kullanılarak yapılan antibiyotik duyarlılık testine göre izolatlardaki çoklu antibiyotik direnci belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, izolatların tetrasiklin, novobiyosin, metisilin, vankomisin ve sefradine dirençli olduğu, siprofloksasin, azitromisin, norfloksasin, levofloksasin, gentamisin ve amoksisiline ise duyarlı olduğu rapor edilmiştir.

Awandkar, et al. (2021) tarafından yapılan çalışmada ise *S. aureus* izolatlarının %90'ının beta laktam sınıfı antibiyotiklere dirençli olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra izolatların %30'unun amoksisilin + suülbaktam kombinasyonuna dirençli olduğu rapor edilmiştir. İzolatların %70'i vankomisine, %60'i amikasine ve %50'sinin ise oksitetrasikline dirençli olduğu bildirilmiştir. Ayrıca izolatların %10'unun gentamisin ve siprofloksasine, %20'sinin kloramfenikol, doksisisilin, azitromisine, %40'ının ise enrofloksasine dirençli olduğu ortaya konulmuştur. Aynı çalışmada NSA izolatlarının antibiyotik direnç durumların ise, izolatların tamamının penisiline, %96,5'inin siprofloksasine, %86,66'sının doksisisiline, %86,21'inin kloramfenikole, %79,31'inin vankomisine, %62,07'sinin ise oksitetrasikline dirençli olduğu tespit şeklinde bildirilmiştir edilmiştir. Bu çalışmada, izolatların aminoglikozid grubu antibiyotiklere duyarlı olduğu ve tedavide etkili şekilde kullanılabileceği bildirilmiştir.

Tez çalışması sonucunda *S. aureus* izolatlarının %91,6'sının aminoglikozidlere duyarlı olduğu belirlenmiştir fakat NSA izolatlarının %20,5'inin duyarlı olduğu tespit

edildi. Awandkar, et al. (2021) tarafından yapılan bu çalışma ile tez çalışmasının sonuçları *S. aureus* izolatlarında benzerlik göstermesine rağmen NSA izolatlardaki bulgular zıtlık göstermektedir. Bu durum NSA izolatlarında bölgesel farklılık nedeniyle oluşan suş farklılığı kaynaklı olmasıyla varyasyonla birlikte, antibiyotiklere dirence neden olan biyofilm oluşumlarındaki farklılığın neden olabileceği gösterebileceği ile açıklanabilmektedir. *S. aureus* izolatlarının bir tanesinin tetrasiklinlere, aminoglikozidlere, kinolonlara, sefalosporin ve makrolidlere dirençli olduğu bildirilmiştir. Bunun yanı sıra iki izolatın glikopeptidler, tetrasiklinler, kinolonlar, sefalosporin, beta laktam ve kloramfenikole dirençli olduğu tespit edilmiştir. Üç izolatın glikopeptidler, tetrasiklin, sefalosporin, beta laktamlara dirençli olduğu, dört izolatın glikopeptidler, aminoglikozidler, sefalosporin, beta laktam, tetrasikline direnç gösterdiği rapor edilmiştir. Bu çalışmadaki çoklu antibiyotik direncine sahip 10 *S. aureus* izolatının çoklu antibiyotik direncine sahip olduğu ortaya konulmuştur.

Tez çalışmasında elde edilen veriler ile yukarıda sözü edilen diğer çalışmalardaki beta laktam sınıfındaki antibiyotiklere direnç durumları benzerlik göstermesine rağmen, diğer antibiyotik sınıfları ile uyumsuzlukta bir benzerlik göstermektedir görülmektedir. Bu durumun, bölgeler arasındaki suş farklılıklarından kaynaklanan kazanılmış direnç ve sahada yaygın olarak farklı antibiyotik etkenlerinin kullanılmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalar ve tez çalışmasındaki bulgular karşılaştırıldığında beta laktam antibiyotiklere karşı yüksek oranda direnç gözlenmektedir. Aynı zamanda bu izolatların birçoğunun da çoklu antibiyotik direncine sahip olduğu tespit edilmiştir. Beta laktam sınıfı antibiyotiklere yüksek oranda direncin olmasının nedeninin sığır mastitis vakalarının tedavisinde yaygın ve bilinçsiz kullanılmasından kaynaklanabilmektedir (Pitkala, et al., 2004; Hendriksen, et al., 2008; Kalmus, et al., 2011). Yapılan daha önceki çalışmalarda çoklu antibiyotik direncinin gözlemlendiği *S. aureus* izolatlarının vankomisine de dirençli olduğu ortaya konulmuştur (Kateete, et al., 2013; Nobrega, et al., 2018). Gram pozitif kokların koklarla ilişkili enfeksiyonların tedavisinde kritik öneme sahip olan bu antibiyotiğin ileriki zamanlarda hem halk sağlığını hem de veteriner sağlığını tehdit etmekte ve enfeksiyonların tedavi şansının azalma riski söz konusudur.

*S. aureus* izolatlarının antibiyotik sınıflarına direnç durumu ve çoklu antibiyotik direnci Tablo 4.6.'da, NSA izolatlarına ait aynı bulgular ise Tablo 4.7.'de verildi.

Tablo 4. 6. *S. aureus* izolatlarının antibiyotik sınıflarına göre çoklu antibiyotik direnci

İzolasyon No	Beta laktamlar					Tetrasiklinler		Polipeptidler		Kinonlar	Antimetabolik Etkililer	Aminoglikozid	Linkozamid	Dirençli Olduğu Antibiyotik Sınıfı Sayısı
	A <sup>1</sup>	OX <sup>2</sup>	FOX <sup>3</sup>	CT <sup>4</sup>	CP <sup>5</sup>	T <sup>6</sup>	TİG <sup>7</sup>	DP <sup>8</sup>	V <sup>9</sup>	E <sup>10</sup>	SXT <sup>11</sup>	N <sup>12</sup>	MY <sup>13</sup>	
6	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
7	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
19	S	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S	S	R	3
28	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	3
30	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	1
31	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	2
39	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
40	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	1
41	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
47	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
50	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	3
58	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	1

Tablo 4.6. (devamı)

İzolasyon No	Beta laktam					Tetrasiklin Sınıfı		Polipeptid Sınıfı		Kinonlar	Antimetabolik Etkili	Aminoglikozid	Linkozamid	Dirençli Olduğu Antibiyotik Sınıfı Sayısı
	A <sup>1</sup>	OX <sup>2</sup>	FOX <sup>3</sup>	CT <sup>4</sup>	CP <sup>5</sup>	T <sup>6</sup>	TİG <sup>7</sup>	DP <sup>8</sup>		V <sup>9</sup>	E <sup>10</sup>	SXT <sup>11</sup>	N <sup>12</sup>	
65	S	I	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	2
66	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	R	4
72	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	3
74	S	I	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	2
76	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	1
79	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R	S	3
81	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
91	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
92	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	2
93	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	2
96	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
98	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	1

Tablo 4. 7. NSAizolatlarının antibiyotik sınıflarına göre çoklu antibiyotik direnci

İzolasyon No	Beta laktam					Tetrasiklin Sınıfı		Polipeptid Sınıfı	V <sup>9</sup>	Kinonlar	Antimetabolik Etkili	Aminoglikozid	Linkozamid	Dirençli Olduğu Antibiyotik Sınıfı Sayısı
	A <sup>1</sup>	OX <sup>2</sup>	FOX <sup>3</sup>	CT <sup>4</sup>	CP <sup>5</sup>	T <sup>6</sup>	TİG <sup>7</sup>	DP <sup>8</sup>		E <sup>10</sup>	SXT <sup>11</sup>	N <sup>12</sup>	MY <sup>13</sup>	
15	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	2
18	S	I	S	I	S	S	S	R	S	S	S	I	R	0
29	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	4
38	S	R	R	S	I	R	S	R	S	S	S	I	R	2
48	S	S	S	I	S	S	S	R	S	S	S	R	S	0
49	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	2
53	S	R	S	I	I	S	S	R	S	S	S	I	R	0
54	S	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	I	S	4
60	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	0
62	S	S	S	R	I	S	R	S	S	S	S	I	S	3
63	S	S	S	R	I	S	S	S	S	R	R	I	S	3
64	S	R	S	R	S	S	S	R	S	S	R	I	R	2

Tablo 4.7. (devamı)

İzolat No	Beta laktam					Tetrasiklin Sınıfı		Polipeptid Sınıfı		Kinonlar	Antimetabolik Etkili	Aminoglikozid	Linkozamid	Dirençli Olduğu Antibiyotik Sınıfı Sayısı
	A <sup>1</sup>	OX <sup>2</sup>	FOX <sup>3</sup>	CT <sup>4</sup>	CP <sup>5</sup>	T <sup>6</sup>	TİG <sup>7</sup>	DP <sup>8</sup>		V <sup>9</sup>	E <sup>10</sup>	SXT <sup>11</sup>	N <sup>12</sup>	MY <sup>13</sup>
67	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	2
70	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	I	R	2
71	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I	S	1
73	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	0
77	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	1
80	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	1
82	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	3
84	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	I	R	3
85	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	I	R	2
86	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	2
87	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	2
88	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	3

Tablo 4.7. (devamı)

İzolasyon No	Beta laktam					Tetrasiklin Sınıfı		Polipeptid Sınıfı		Kinonlar	Antimetabolik Etkili	Aminoglikozid	Linkozamid	Dirençli Olduğu Antibiyotik Sınıfı Sayısı
	A <sup>1</sup>	OX <sup>2</sup>	FOX <sup>3</sup>	CT <sup>4</sup>	CP <sup>5</sup>	T <sup>6</sup>	TİG <sup>7</sup>	DP <sup>8</sup>	V <sup>9</sup>	E <sup>10</sup>	SXT <sup>11</sup>	N <sup>12</sup>	MY <sup>13</sup>	
90	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R	I	S	1
94	S	I	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I	S	3
95	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	2
97	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	3
101	S	I	S	R	S	S	S	R	S	S	S	I	S	1
102	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I	S	2
103	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I	R	2
104	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I	R	3
105	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I	R	3
107	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I	S	2

#### 4.5. *mecA* Gen Varlığının Belirlenmesi

Metisilin direncinden sorumlu *mecA* genin PCR ile araştırılması sonucunda; 8 (%33,3) *S. aureus* izolatının ve 10 (%29,4) NSA izolatının gene sahip olduğu tespit edildi. İzolatlar fenotipik ve genotipik olarak değerlendirildi. *S. aureus* izolatlarının 4 tanesinin fenotipik olarak metisiline duyarlı olmasına rağmen *mecA* genine sahip olduğu belirlendi. Bunun yanı sıra ise 5 izolatta *mecA* geni tespit edilemezken fenotipik olarak metisiline dirençli olduğu belirlendi. *mecA* genine sahip ve fenotipik olarak metisiline dirençli izolat sayısının ise 3 (%37,5) olduğu belirlendi. NSA izolatlarının değerlendirilmesi yapıldığında, 10 izolatın *mecA* genine sahip olduğu tespit edildi. Ayrıca 17 izolatın ise fenotipik olarak metisiline dirençli olduğu ortaya konuldu. İzolatların fenotipik ve genotipik değerlendirilmesi yapıldığında, 2 izolatta *mecA* geni varlığı tespit edilmesine rağmen fenotipik olarak metisiline duyarlı olduğu belirlendi. Ayrıca 10 izolatın bu gene sahip olmamasına karşın fenotipik olarak metisiline dirençli oldukları tespit edildi. NSA izolatlarının 8 tanesinin hem *mecA* genine sahip olduğu hem de fenotipik olarak metisilin direncinin olduğu ortaya konuldu. *S. aureus* izolatlarının fenotipik olarak metisiline direnç durumu ve dirençten sorumlu *mecA* genine ait izolatlar Tablo 4.8.'de, NSA izolatlarınınki ise Tablo 4.9'da sunuldu.

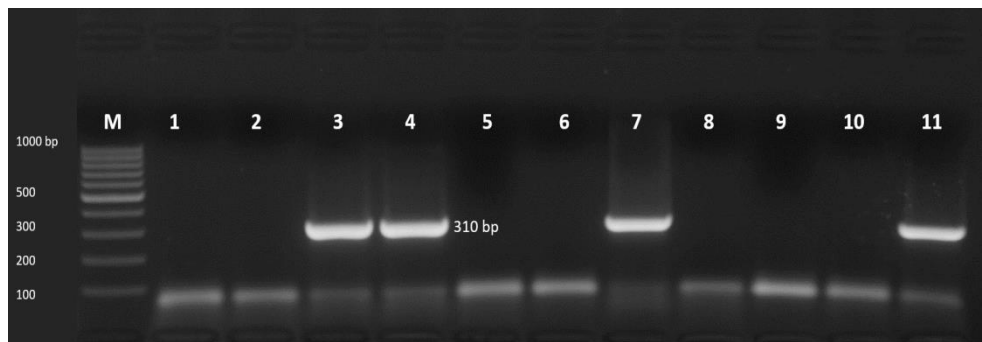
Tablo 4. 8. *S. aureus* izolatlarının fenotipik olarak metisiline direnç durumu ve *mecA* genine sahip izolatlar

İzolat No	<i>mecA</i> geni varlığı	Fenotipik Metisilin Direnci
7	⚡	S
19	—	R
28	—	R
31	⚡	S
47	—	R
50	—	R
66	⚡	R
72	⚡	R
81	⚡	S
91	⚡	R
92	⚡	S
93	—	R
98	⚡	S

Tablo 4. 9. NSA izolatlarının fenotipik olarak metisiline direnç durumu ve *mecA* genine sahip izolatlar

İzolat No	<i>mecA</i> geni varlığı	Fenotipik Metisilin Direnci
29	⊥	I
38	—	R
53	—	R
60	—	R
62	⊥	S
64	—	R
67	⊥	R
70	—	R
71	⊥	R
82	—	R
84	—	R
86	⊥	R
84	—	R
88	⊥	R
90	⊥	R
95	—	R
97	⊥	R
104	—	R
105	⊥	R
107	⊥	R

İzolatlardaki *mecA* gen varlığının belirlenmesine yönelik yapılan PCR sonucunda elde edilen sonuçların temsili görüntüsü Şekil 4.6’da verildi.



Şekil 4. 6. *mecA* gen varlığının PCR ile araştırılması  
(M: Marker; 1: Negatif kontrol (*S. aureus* ATCC 25913), 2;5;6;8;9;10: Negatif izolatlar, 3: *S. aureus* ATCC 43330, 4;7;11: Pozitif izolatlar)

Fındık, vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada, stafilokok izolatlarının %53'ünün, *S. aureus* izolatlarının %17'sinin ve NSA izolatlarının ise %17'sinin fenotipik olarak metisiline dirençli olduğu belirlenmiştir. *mecA* geninin araştırılmasına yönelik yapılan PCR çalışmasında, tüm stafilokok izolatlarının %22,22'sinin, *S. aureus* izolatlarının %11,11'inin ve NSA izolatlarının %4,44'ünün bu gene sahip olduğu bildirilmiştir. Pu, et al. (2014) tarafından Çin'in farklı bölgelerindeki sığır işletmelerinde yapılan çalışmada mastitis orijinli 103 *S. aureus* izolatı incelenmiştir. İzolatların 13 (%12,6) tanesinin fenotipik olarak oksasiline dirençli olduğu tespit edilmiştir. Bu izolatların 49 (%47,5) tanesinin *mecA* genine sahip olduğu tespit edildi. 37 (%75,5) *S. aureus* izolatının *mecA* genine sahip olmasına rağmen fenotipik olarak oksasiline duyarlı olduğu tespit edilmiş ve bu izolatlar oksasilin duyarlı *S. aureus* (OD-MRSA) olarak sınıflandırılmıştır. Bu çalışmada da *S. aureus* izolatları arasında %20,8 oranında OD-MRSA fenotipi gözlenmiş olup, *mecA* geninin varlığı, oksasiline karşı yüksek düzeyde bir direnç sağlamamıştır. Bu fenotipin nedeni açıklanmaya devam etmektedir. Bir çalışmada (Giannouli, et al., 2010) , FemXAB proteinlerindeki (hücre duvarı sentezinde yer alan) amino asit mutasyonlarının OD-MRSA fenotipine katkıda bulunabileceğini öne sürülmüştür, ancak mutasyonların fenotip ile ilişkisi daha önce kanıtlanmamıştır. *mecA* geni test edilmeden, bu izolatların, geleneksel antimikrobiyal duyarlılık testlerinin sonucuna göre MSSA olarak yanlış sınıflandırılması söz konusu olabilir. *mecA* taşıyan OD-MRSA,  $\beta$ -laktam antibiyotiklerle tedavi edildiğinde yüksek dirençli MRSA'nın ortaya çıkmasına neden olabilir, bu da OD-MRSA enfeksiyonlarının tedavisi sırasında önlem alınması gerektiğini vurgulamaktadır. Bu risk nedeniyle OD-MRSA tedavisinde  $\beta$ -laktam antibiyotiklerden kaçınılmalıdır. Giannouli, et al. (2010) identifiye ettikleri MRSA'ların genellikle gentamisin, siprofloksasin, kanamisin ve vankomisin gibi diğer antibiyotik sınıflarına duyarlı olduklarını belirlemişler ve bu nedenle OD-MRSA'nın neden olduğu mastitisin  $\beta$ -laktam olmayan antibiyotikler kullanılarak tedavisinin, antibiyotik direnci gelişiminin istenmeyen sonucunu önleyebileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada da OD-MRSA fenotipi sergileyen izolatların hiçbirinin çoklu antibiyotik direnci göstermediği ve beta laktam dışındaki antibiyotiklere duyarlı oldukları gösterildi.

OD-MRSA fenotipinden başka,  $\beta$ -laktam direnci *mecA*'ya atfedilemeyen istisnai *S. aureus* suşları da tanımlanmıştır. Bu çalışmada da *mecA* genine sahip

olmayan ancak okzasiline karşı fenotipik direnç gösteren 5 (%20,83) adet *S. aureus* izolatı identifiye edildi. Düşük seviyeli metisilin direnci (MIC 2-4 mg/L), McDougal and Thornsberry (1986) tarafından rapor edilmiş ve penisilinazın aşırı üretimine bağlanmıştır. Tomasz, et al. (1989), değiştirilmiş metisiline bağlanma afiniteleri ve PBP4'ün aşırı üretimi ile PBP1 ve PBP2'ye sahip başka bir sınırdaki metisiline dirençli suş sınıfını bildirmişlerdir. Hackbarth, et al. (1995) bu son sınıftaki suşlara ait PBP2 geninin nükleotid dizisini analiz etmişler ve transpeptidazın penisilin bağlama motifine yakın bir nokta mutasyonu belirlemişlerdir. Chambers, et al. (1994), mutasyona uğramış PBP2'nin metisilin için afinitesinin azaldığını ve bağlı metisilin PBP2'den salım hızının arttığını göstermişlerdir. *S. aureus* PBP'lerinin penisilin bağlama profilinde değişiklik, artan  $\beta$ -laktam antibiyotik konsantrasyonları ile in vitro seçilen *S. aureus* mutantlarında da rapor edilmiştir (Berger-Bächi, et al.,1989;Tonin and Tomasz; 1986). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada da *mecA* negatif ancak okzasilin direnci mevcut olan *S. aureus* suşları tanımlanmış olup araştırma sonuçlarının, MRSA'yı saptamaya yönelik enfeksiyon önleme sürveyansı çabaları için önemli etkileri olduğu ve bu fenotipi gösteren izolatları olan hastalarda optimal antibiyotik tedavisine ilişkin soruları gündeme geldiği bildirilmiştir.

#### **4.6. Ebselen Antibakteriyel Etkisinin Araştırılması**

Ebselenin antibakteriyel etkisi *S. aureus*, NSA ve metisilin dirençli *S. aureus* izolatlarında, ebselenin 128  $\mu\text{g/ml}$  - 0,125  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyon aralığında araştırıldı. Yapılan değerlendirme sonucunda, *S. aureus* izolatları için 0,125  $\mu\text{g/ml}$  – 32  $\mu\text{g/ml}$  arasında, NSA izolatları için ise 0,125  $\mu\text{g/ml}$  – 4  $\mu\text{g/ml}$  arasında minimal inhibitör konsantrasyonları belirlendi.

Tez çalışmasında ebselenin kontrol suşu olarak kullanılan, metisiline dirençli olduğu bilinen *S. aureus* ATCC 43300 suşu için MİK değerinin 8  $\mu\text{g/ml}$  olduğu, metisiline duyarlı olduğu bilinen *S. aureus* 29213 suşu için MİK değerinin ise 0,125  $\mu\text{g/ml}$  olduğu belirlendi. Tez çalışmasında, fenotipik olarak okzasiline dirençli olan 8 *S. aureus* izolatının 5 tanesinin MİK değeri 0,125  $\mu\text{g/ml}$ , 2 tanesinin MİK değeri 0,25  $\mu\text{g/ml}$  ve bir izolatın değeri ise 32  $\mu\text{g/ml}$  olarak tespit edildi. Genotipik olarak *mecA* genine sahip 8 *S. aureus* izolatının, 4 adedinin MİK değeri 0,125  $\mu\text{g/ml}$ , bir izolatın 0,25  $\mu\text{g/ml}$ , bir izolatın 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , bir izolatın 2  $\mu\text{g/ml}$  ve bir izolatın ise 32  $\mu\text{g/ml}$  olduğu belirlendi. *S. aureus* izolatları içerisinde fenotipik olarak metisiline dirençli olduğu belirlenen ve *mecA* genine sahip 3 izolatın, bir tanesinin minimal

intibitör konsantrasyonu 0,125 µg/ml, bir izolatın 0,25 µg/ml ve diğer izolatın ise 32 µg/ml olduğu tespit edildi. Ayrıca fenotipik olarak hem okzasiline hem de vankomisine dirençli bir *S. aureus* izolatının MİK 0,125 µg/ml olarak belirlendi. NSA izolatlarında fenotipik olarak okzasiline dirençli 17 izolatın MİK değerlerinin 0,125 µg/ml – 4 µg/ml aralığında değişkenlik gösterdiği tespit edildi. Bu izolatlardan 9 tanesi için (%52,9) ebselen MİK değeri 0,125 µg/ml olarak belirlenirken, 5 tanesi (%29,4) için 0,25 µg/ml, birer izolatın ise sırasıyla 0,5 µg/ml, 1 µg/ml ve 4 µg/ml MİK değerleri belirlendi. Genotipik olarak *mecA* genine sahip 10 izolatın minimal inhibitör konsantrasyonlarının 0,125 µg/ml – 4 µg/ml arasında değişkenlik gösterdiği tespit edildi. Bu izolatlardan 6 tanesinin (%60) minimal inhibitör konsantrasyonu 0,125 µg/ml, iki izolatın (%20) 0,5 µg/ml, birer izolatın ise sırasıyla 0,5 µg/ml ve 4 µg/ml konsantrasyonları MİK değeri olarak saptandı.

MİK değerinin belirlenmesinde kullanılan mikrobuyyon dilüsyon tekniğine ait temsili görüntü Şekil 4.7.'de sunuldu.

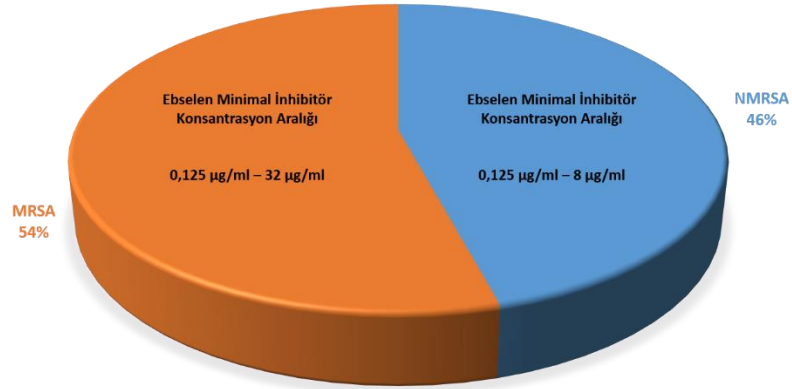


Şekil 4. 7. MİK belirlenmesinde kullanılan mikrobuyyon dilüsyon tekniğinin temsili görüntüsü

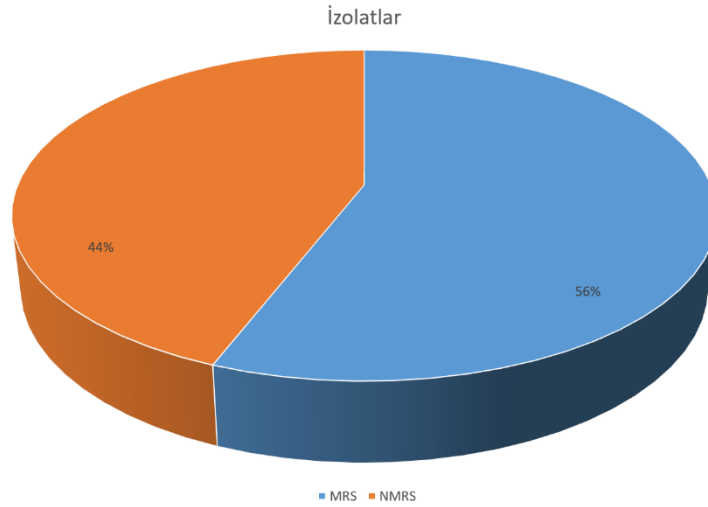
(PK1: *S. aureus* ATCC 25913, PK2: *S. aureus* ATCC 43300, PK3: *S. pseudointermedius*, NK: Negatif Kontrol)

Fenotipik veya genotipik olarak metisilene dirençli ve duyarlı olan izolatların yüzde grafikleri, ebselenin MİK aralığı Şekil 4.8'de (*S. aureus* izolatları) ve Şekil 4.9.'da (Non- *S. aureus* izolatları) sunuldu.

#### İZOLAT YÜZDESİ



Şekil 4. 8. Fenotipik/Genotipik olarak metisiline dirençli/duyarlı olan izolatların yüzdeleri ve enselenin MİK aralığı (MRSA: Metisilin Dirençli *S. aureus*, NMRSA: Non-Metisilin Dirençli *S. aureus*)



Şekil 4. 9. Fenotipik/Genotipik olarak metisiline dirençli/duyarlı olan izolatların yüzdeleri ve enselenin MİK aralığı (MRS: Metisilin Dirençli *Staphylococcus* spp., NMRS: Non-Metisilin Dirençli *Staphylococcus* spp.)

Antibiyotiklere karşı dirençte önemli rol oynayan biyofilm özelliği yönünden izolatlar incelendiğinde fenotipik olarak biyofilm oluşumunun tespit edildiği 18 (%75) *S. aureus* izolatı için ebselen MİK değerinin 0,125 µg/ml – 32 µg/ml arasında olduğu belirlendi. Bu izolatların 11 (%61,1) tanesi için 0,125 µg/ml, bir tanesi (%5,5) için 0,25 µg/ml, bir tanesi (%5,5) için 0,5 µg/ml, bir tanesi (%5,5) için 1 µg/ml, bir tanesi için (%5,5) 2 µg/ml, iki tanesi (%8,3) için 8 µg/ml ve bir (%5,5) izolat için ise 32 µg/ml konsantrasyonlarının minimal inhibitör konsantrasyonu olarak

belirlendi. Suşlardan sadece 4'ü (%16,66) hem fenotipik olarak hem de genotipik olarak (*ica A* veya *D* genlerinden birine sahip) biyofilm özelliği göstermekteydi ve hepsi için ebselenin MİK değeri 0,125 µg/ml idi. Biyofilm oluşumunda rol oynayan *icaAD* genlerinden en az birisine sahip 9 (%37,5) *S. aureus* izolatı için ebselen MİK değerinin 0,125 µg/ml – 0,5 µg/ml arasında olduğu saptandı. Bu izolatlardan 7 tanesi (%77,77) için MİK değerleri 0,125 µg/ml bulunurken, bir tanesi (%11,11) için 0,25 µg/ml ve diğer bir izolat için de 0,5 µg/ml minimal inhibitör konsantrasyonu belirlendi. Fenotipik olarak biyofilm oluşumunun tespit edildiği ve *icaAD* genlerinden en az birisine sahip 4 (%16,66) *S. aureus* izolatı için ebselen MİK değerinin 0,125 µg/ml olduğu saptandı.

NSA izolatlarından fenotipik olarak biyofilm oluşumunun gözlemlendiği 18 (%52,94) izolat için ebselen MİK değerlerinin 0,125 µg/ml – 1 µg/ml arasında olduğu tespit edildi. Değerlendirme sonucunda 11 (%61,1) izolat için ebselen MİK değerinin 0,125 µg/ml, 5 (%27,7) izolat için 0,5 µg/ml, bir (%5,5) izolat için 0,5 µg/ml ve diğer bir (%5,5) izolat için ise 1 µg/ml olduğu saptandı. Genotipik olarak *icaAD* genlerinden en az birisine sahip 15 (%44,11) izolat için MİK değerlerinin 0,125 µg/ml – 4 µg/ml arasında değişkenlik gösterdiği belirlendi. İzolatlardan 9 (%60) tanesi için ebselen minimal inhibitör konsantrasyonunun 0,125 µg/ml olduğu, 2 (%13,33) izolat için 0,5 µg/ml olduğu, 3 (%20) izolat için 0,25 µg/ml ve bir (%6,66) izolat için ise 4 µg/ml olduğu tespit edildi. NSA izolatları arasında fenotipik olarak biyofilm oluşumunun tespit edildiği ve *icaAD* genlerinden en az birisine sahip 7 (%20,58) izolat için ebselen MİK değerlerine bakıldığında 5 (%71,42) izolatın 0,125 µg/ml bir (%14,28) izolat için 0,25µg/ml ve bir izolat (%14,28) için ise 0,5 µg/ml MİK belirlendi.

Ebselen'in antimikrobiyal aktivitesinin, çoklu ilaca dirençli *S. aureus'un* klinik izolatlarından oluşan bir panele karşı test edildiği bir çalışmada (Thanghamani, et al., 2015a), ebselenin, 0.125 µg/ml ile 0.5 µg/ml arasında değişen MİK değerlerinde, MRSA, vankomisine dirençli *S. aureus* (VRSA), linezolid dirençli *S. aureus*, mupirosin dirençli *S. aureus*, metisiline dirençli *S. epidermidis* ve çoklu ilaca dirençli suşlara karşı güçlü bakterisidal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Aynı araştırmacılar başka bir çalışmada (Thanghamani, et al., 2015b), *Enterococcus* ve *Staphylococcus* klinik izolatlarının %90'ının inhibe edildiği (MIC90) minimum ebselen inhibitör konsantrasyonlarını sırasıyla 0,5 ve 0,25 mg/L olarak bulmuşlar, ebselenin,

vankomisin ve linezolid ile karşılaştırıldığında, hücre içi metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) için önemli klirens gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, ebselenin, MRSA'ya karşı geleneksel antimikrobiallarla sinerjik aktiviteler gösterdiğini ve birlikte ele alındığında, sonuçlarının güçlü antimikrobiyal aktivitesi ve güvenlik profilleri ile ebselenin potansiyel olarak çoklu ilaca dirençli Gram pozitif bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek için tek başına veya diğer antibiyotiklerle kombinasyon halinde kullanılabileceğini ve klinik olarak daha fazla çalışma gerektiğini ifade etmişlerdir. Boyd, (2020) tarafından yapılan çalışmada *mecA* genine sahip ve fenotipik olarak okzasiline dirençli iki *S. aureus* izolatının MİK değerlerinin 0,25 µg/ml – 1 µg/ml arasında olduğu belirlenmiştir. Tez çalışmasında da *mecA* genine sahip, fenotipik olarak da okzasiline dirençli üç izolatın MİK değerlerinin 0,25 µg/ml – 32 µg/ml arasında olduğu belirlendi.

Dong, et al. (2020) tarafından yapılan çalışmada klinik örneklerden izole edilen *S. aureus* izolatlarında ebselenin *in vitro* etkisi test edilmiştir. Çalışmada bu izolatlar üzerinde ebselenin ortalama 2,2 µg/ml konsantrasyonunda etkili olduğu bildirilmiştir.

Mohammad, et al. (2021) tarafından yapılan çalışmada, klinik örneklerden izole edilen metisilin dirençli *S. aureus*, vankomisin dirençli *S. aureus*, linezolid dirençli *S. aureus*, mupirosin dirençli *S. aureus*, metisilin dirençli *S. epidermidis* izolatlarına karşı ebselenin *in vitro* antimikrobiyal aktivitesi ve bakteriyel biyofilm üzerindeki inhibitör etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre MİK değerlerinin 0,125 µg/ml – 0,5 µg/ml arasında olduğu belirlenmiştir. Biyofilm oluşturan *S. aureus* ve *S. epidermidis* izolatlarında, ebselenin ve konvansiyonel tedavide kullanılan antibiyotiklerin (linezolid, mupirosin, vankomisin ve rifampisin) biyofilm üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çalışmada, ebselenin biyofilm kütlelerini önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. Konvansiyonel tedavide kullanılan antibiyotikler ve ebselenin biyofilm üzerindeki etkin dozu hesaplanmıştır. Ebselenin 2 µg/ml konsantrasyonunun biyofilm oluşumunun yaklaşık %60'ını azalttığı tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, konvansiyonel antibiyotiklerin (linezolid, mupirosin, vankomisin, rifampisin) biyofilm üzerindeki etkin dozları sırasıyla 256 µg/ml, 16 µg/ml, 128 µg/ml ve 0,5 µg/ml olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda kullanılan bu dozlarda linezolid, mupirosin ve vankomisin biyofilm oluşumunu azaltmada yaklaşık %20, rifampisin ise %40 oranında katkı sağladığı ortaya konulmuştur. 8 µg/ml konsantrasyonunda ebselenin, *S. epidermidis*'in biyofilm oluşumunu %50'den fazla

bir oranda azalttığı rapor edilmiştir. Tez çalışmasında elde edilen veriler ile ebselenin çeşitli stafilokok izolatlarındaki etkinliği karşılaştırıldığında, ebselenin düşük konsantrasyonlarda hem bakterisidal aktivite gösterdiği hem de bakteriyel biyofilm oluşumunu azalttığı ortaya konulmuştur. Bu çalışmadaki bulgular ile dünya genelinde yapılan diğer *in vitro* çalışmalar uyum göstermekle birlikte, hem *S. aureus* (4 izolatta) hem de NSA izolatları (1 izolatta) için sayıları az olmakla birlikte, diğer çalışmalarda bildirilen ebselen MİK değerlerinden daha yüksek MİK değerleri de elde edildi. Üstelik bu izolatlarının tamamının biyofilm pozitif oldukları fark edildi. Günümüzde global çapta önemli bir sorun haline gelen antibiyotik direnci nedeniyle, ebselenin tedavide tek başına veya başka antimikrobiyallerle veya yine yeniden amaçlandırılmış başka moleküllerle birlikte kombinasyon halinde kullanılabilmesi, bu madde üzerinde *in vitro* çalışmaların yanı sıra *in vivo* çalışmaların da yapılmasının önem arz ettiği düşünülmektedir.

#### **4.7. İzolatların Bazı Virülens Faktörlerinin ve Ebselene Duyarlılıklarının Ortak Değerlendirilmesi**

Tez çalışmasında 24 adet *S. aureus* izolatı, 34 adet NSA izolatı olmak üzere toplam 58 adet sığır mastitisi orijinli stafilokok izolatı incelendi. Çalışma kapsamında fenotipik olarak biyofilm oluşumu, oksasilin direnci ve vankomisin direnci belirlendi. Genotipik olarak ise oksasilin direncinden sorumlu *mecA* gen varlığı, biyofilm oluşumunda rol oynayan *icaAD* gen varlıkları, koagülaz enziminin üretiminden sorumlu *coa* gen varlıkları araştırıldı. Aynı zamanda ebselenin bu izolatlarda minimal inhibitor konsantrasyonları (MİK) belirlendi. *S. aureus* izolatlarına ait fenotipik/genotipik özellikler ve ebselenin MİK değeri Tablo 4.10.'da NSA izolatları ise Tablo 4.11'de sunuldu.

Tablo 4. 10. *S. aureus* izolatlarına ait fenotipik/genotipik özellikler ve ebselenin MİK değeri

İzolat	Okzasiline Fenotipik Direnç	Vankomisine Fenotipik Direnç	Fenotipik Biyofilm Oluşturma	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	<i>mecA</i>	<i>coa</i>	Ebselenin MİK değeri (µg/ml)
6	I	S	⚡	—	—	—	⚡	8
7	S	S	⚡	—	—	⚡	⚡	2
19	R	R	—	—	⚡	—	—	0,125
28	R	S	—	—	⚡	—	—	0,25
30	I	S	—	—	—	—	—	1
31	S	S	—	—	⚡	⚡	⚡	0,5
39	S	S	⚡	—	—	—	—	0,125
40	I	S	—	—	⚡	—	—	0,125
41	S	S	⚡	—	⚡	—	—	0,125
47	R	S	—	⚡	—	—	—	0,125
50	R	S	⚡	—	⚡	—	⚡	0,125
58	S	S	⚡	—	—	—	—	8
65	I	S	⚡	—	—	—	—	0,125
66	R	S	⚡	—	—	⚡	⚡	0,25
72	R	S	⚡	—	—	⚡	⚡	0,125
74	I	S	⚡	—	—	—	⚡	1
76	S	S	⚡	—	—	—	⚡	0,5
79	S	S	⚡	—	—	—	—	0,125
81	S	S	⚡	—	—	⚡	—	0,125
91	R	S	⚡	—	—	⚡	⚡	32
92	S	S	⚡	—	—	⚡	—	0,125
93	R	S	⚡	⚡	—	—	—	0,125
96	I	S	⚡	—	—	—	⚡	0,125
98	S	S	⚡	⚡	—	⚡	⚡	0,125

R: Dirençli, I: Orta Derecede Duyarlı, S: Duyarlı, CRA: Kongo Kırmızılı Agar

Tablo 4. 11. NSAizolatlarına ait fenotipik/genotipik özellikler ve ebselenin MİK değeri

İzolasyon No	Okzasiline Fenotipik Direnç	Vankomisine Fenotipik Direnç	Fenotipik Biyofilm Oluşumu	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	<i>mecA</i>	<i>coa</i>	Ebselenin MİK değeri (µg/ml)
15	I	S	—	—	‡	—	—	0,5
18	I	S	—	—	—	—	—	0,25
29	I	S	‡	—	‡	‡	—	0,5
38	R	S	‡	—	—	—	—	1
48	S	R	—	—	—	—	—	0,125
49	I	R	‡	‡	—	—	—	0,125
53	R	S	‡	‡	—	—	—	0,125
54	I	S	—	—	—	—	—	0,125
60	S	S	‡	—	—	—	—	0,125
62	S	S	‡	‡	—	‡	—	0,125
63	S	S	—	—	—	—	‡	0,25
64	R	S	—	‡	—	—	—	0,25
67	R	S	—	‡	—	‡	—	0,125
70	R	S	‡	—	—	—	—	0,25
71	R	S	‡	—	—	‡	—	0,25
73	S	S	—	‡	—	—	—	0,125
77	S	S	‡	‡	—	—	—	0,25
80	S	S	—	‡	—	—	‡	0,25
82	R	S	‡	—	—	—	—	0,25
84	R	S	—	—	—	—	—	0,125
85	S	S	—	—	—	—	—	0,25
86	R	S	—	‡	—	‡	—	0,125
87	R	S	‡	—	—	—	—	0,125
88	R	S	‡	‡	—	‡	—	0,125

İzolat No	Okzasiline Fenotipik Direnç	Vankomisine Fenotipik Direnç	Fenotipik Biyofilm Oluşumu	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	<i>mecA</i>	<i>coa</i>	Ebselenin MİK değeri (µg/ml)
90	R	S	⦿	—	—	⦿	—	0,125
94	I	S	⦿	—	—	—	—	0,125
95	R	S	—	⦿	—	—	—	0,125
97	R	S	—	⦿	—	⦿	—	4
101	I	S	⦿	—	—	—	—	0,125
102	I	S	⦿	⦿	—	—	—	0,125
103	S	S	—	—	—	—	—	0,125
104	R	S	—	—	—	—	—	0,5
105	R	S	⦿	—	—	⦿	—	0,125
107	R	S	⦿	—	—	⦿	—	0,25

## 5. SONUÇ

Mastitis, itlaftan kaynaklanan kayıplar, azalan üretim, azalan doğurganlık ve tedavi maliyetleri nedeniyle ülkeyi büyük bir mali yük altına soktuğu için küresel bir sorundur. Subklinik mastitis ayrıca, halk sağlığı yönünden de önemli ve sessiz bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu tip mastitis vakaları, sütte veya memenin görünümünde başlangıçta gözle görülür bir değişiklik olmaksızın daha yüksek ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bununla birlikte en önemli endişelerden biri de, subklinik olarak enfekte olmuş hayvanların her zaman sürekli bir enfeksiyon kaynağı olarak kalabilmesidir.

Birçok batı ülkesinde, bulaşıcı mastitis için kontrol programları on yıllardır uygulanmaktadır, bu da *Streptococcus agalactiae* ve *Staphylococcus aureus* kökenli mastitis vakalarında azalmaya neden olmuştur. Bununla birlikte bazı ülkelerde başka bakteriyel patojenler (*Klebsiella* spp. veya *Streptococcus dysgalactiae* gibi) dominant mastitis nedenleri olarak görünmektedir. Ülkeler arasındaki mevzuat, veterinerlik ve laboratuvar hizmetleri ile çiftçi yönetim uygulamaları arasındaki farklılıklar mastitis patojenlerinin dağılımını ve etkisini etkilemektedir. Ülkemizde yıllar içinde mastitis vakalarına neden olan patojenler ve bunların dağılımlarında farklılıklar meydana gelmekle birlikte stafilokoklar önemli ve endişe verici problem olmaya devam etmektedir. Bu endişenin en büyük nedenlerinden biri de etkenlerin çeşitli mekanizmalarla geliştirdikleri antibiyotik direncidir.

Antimikrobiyal direnç (AMR), patojenler, daha önce etkili olan antimikrobiallerin etkisinin üstesinden gelebildiğinde ortaya çıkmaktadır ve Türkiye'de AMR, süt endüstrisinde önemli bir tehdit olmaya devam etmektedir. WHO'ya (2015) göre AMR, uluslararası gıda güvenliği, sağlık ve ilerleme için en büyük tehlikelerden biridir. Türkiye dahil birçok ülkede, muhtemelen süt sektöründeki belirgin değişiklikler nedeniyle, zaman içinde birincil mastitis etkenlerinin mutlak ve göreceli öneminde farklılıklar tespit edilmiştir.

İnsanlarda AMR'ye önemli bir vurgu yapılmış olmasına rağmen, hayvanlardaki problem ve gidişat çok fazla vurgulanmamıştır. Süt çiftçiliği, profilaktik ve büyümeyi teşvik edici ajanlar olarak antibiyotiklerin fazla kullanımını içermektedir. Antibiyotiklerin bu terapötik olmayan uygulaması, dozajı ve yarılanma süresi yeniden değerlendirilmeli ve rasyonel olarak tanımlanmalıdır. Bir süt hayvanı ayrıca

dirençli suşların insanlara ve çevreye bulaşması açısından ciddi bir risk oluşturmaktadır. AMR'ye çözüm bulmak için bireysel, topluluk, yerel, bölgesel, ulusal ve uluslararası düzeyde küresel işbirliği çabaları ve multidisipliner bir yaklaşım, “Tek Sağlık” yaklaşımı gerekmektedir. Özünde, tüm stratejiler antibiyotik kullanımını optimize etmeyi, patojenik mikroorganizma ve antibiyotikler arasındaki istenmeyen etkileşimi en aza indirmeyi, dirençli suşların yayılmasını sınırlamayı ve tedaviyi etkilemek için enfeksiyonları akıllıca antibiyotik kullanımıyla tedavi etmeyi hedeflemelidir.

Yeni antibiyotiklerin yavaş ortaya çıkmasıyla birlikte AMR'nin yayılması; mikrobiyal hastalıklara karşı etkili tedavilerde bir eksiklik yaratmıştır. Halihazırda, daha yeni bir ilacın keşfi için, klinik etkinlik ve güvenlik değerlendirmesi aşamasından onaya kadar olan süreçte çok ciddi maliyet söz konusudur. Bu nedenle, yeni antibiyotikler bulmak ve kullanıma sunmak daha zorlayıcı hale gelmiştir. Antibiyotiklere direnci azaltmak ve antibiyotiklere yeni, güvenli, dirençsiz ve ekonomik alternatiflerin keşfedilmesini ve sunulmasını hızlandırmak için daha yenilikçi ve cesur çözümlerin tam zamanıdır. Bu bağlamda, halihazırda onaylanmış ilaçları iyi karakterize edilmiş toksikoloji ve farmakoloji ile yeniden kullanmak (“repurposing”), antibiyotik inovasyonu ile ilişkili zamanı, maliyeti ve riski azaltmanın yeni bir yoludur. Bu yaklaşımla ele alınan bir organoselenyum bileşiği olan ebselen, tez çalışmamızda mastitis vakalarından izole edilmiş stafilokok şunları, özellikle de MRSA ve biyofilm oluşturma kabiliyetine sahip suşlar üzerindeki antibakteriyel etkinliğini değerlendirmek üzere seçilmiştir. Ebselenin klinik olarak güvenli olduğu ve iyi bilinen bir farmakoloji profiline sahip olduğu bilinmektedir. Tez çalışmasında, bu bileşiğin hem MRSA ve OD-MRSA hem de metisiline dirençli non-*S. aureus* (NS-MRSA) izolatları üzerine inhibitor etkileri olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca ebselen, çalışmada koagulaz ve biyofilm oluşturma gibi önemli virülens özellikleri yönünden karakterize edilmiş suşlar üzerinde de antibakteriyel etki göstermiş, tedavide en büyük problemlerden birini oluşturan biyofilm oluşturan stafilokoklar üzerindeki etkisi de ortaya konulmuştur.

Tez çalışmasının sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde, antibiyotik direncine çözüm stratejileri arasında daha yakın zamanlarda yer almaya başlayan “repurposing- yeniden amaçlandırma” yaklaşımı kapsamında ele alınan ebselenin, tarih sürecinde penisilin, metisilin ve vankomisin başta olmak üzere pek çok

antibiyotiğe direnç geliştiren ve hatta çoklu antibiyotik direnci sergileyen stafilokokların neden olduğu mastitislerin tedavisine alternatif bir çözüml olabileceği görölmektedir. Bununla birlikte ebselenin etkinliğinin hem in vitro hem de in vivo başka çalışmalarda ileri düzeyde değerlendirilmesi, antimikrobiyel başka bileşiklerle olan sinerjistik etkilerinin belirlenmesi ve bunların pratikte kullanılabilirliğinin araştırılması gerekmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- Avila-Novoa, M., Iñíguez-Moreno, M., Solís-Velázquez, O., González-Gómez, J., Guerrero-Medina, P., and Gutiérrez-Lomeli, M. (2018). Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from Food Contact Surfaces in the Dairy Industry of Jalisco, Mexico. *Journal of Food Quality*. 1746139 (8).
- Awandkar, S. P. and Kulkarni, M. B. (2020). Bacteria from bovine clinical mastitis showed multiple drug resistance. *Veterinary Research Communications*. 2020 (27).
- Becker, K., Heilmann, C. and Peters G. (2014). Coagulase-Negative Staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*. 27 (4). 870–926.
- Berger-Bächi, B., Strässle, A. and Kayser, F. H. (1989). Natural methicillin resistance in comparison with that selected by in-vitro drug exposure in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 23. 179–88.
- Boyd, N. K. (2020). The *in vitro* antibiotic activity of non-antibiotic drug against *S. aureus* clinical strains. Presented to the Faculty of the Graduate School of The University of Texas at Austin in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy The University of Texas at Austin.
- Boynukara, B., Gürtürk, K., Gülhan T., Ekin, İ.H., ve Ögün, E. (1999). Comparison of latex agglutination test with protein a, clumping factor and coagulase tests for identification of staphylococci isolated from avian. *Eastern Journal of Medicine*. 4. 58-60.
- Braem, G., Stijlemans, B., Van Haken, W., De Vlieghe, S., De Vuyst, L. and Leroy, F. (2014). Antibacterial activities of coagulase-negative staphylococci from bovine teat apex skin and their inhibitory effect on mastitis-related pathogens. *Journal of Applied Microbiology*. 116. 1084–1093.
- Brito, M. A., Somkuti G. A. and Renye Jr, J. A. (2011). Production of antilisterial bacteriocins by staphylococci isolated from bovine milk. *Journal of Dairy Science*. 94. 1194–1200.
- Ceotto, H., Holo H., da Costa K. F., dos Nascimento S. J., Salehian Z., Nes I. F., and Mdo Bastos C. (2010). Nukacin 3299, a lantibiotic produced by *Staphylococcus simulans* 3299 identical to nukacin ISK-1. *Veterinary Microbiology*. 146. 124–131.
- Chambers, H. F., Sachdeva, M. J. and Hackbarth, C. J. (1994). Kinetics of penicillin binding proteins of *Staphylococcus aureus*. *Biochemical Journal*. 301. 139–44.
- Chandrasekaran, D., Venkatesan, P., Tirumurugaan, K. G., Nambi, A. P., Thirunavukkarasu, P. S., Kumanan, K., Vairamuthu, S. and Ramesh, S. (2014). Pattern of antibiotic resistant mastitis in dairy cows. *Veterinary World*. 7 (6). 389-394.
- Cheng, G, Hao, H., Xie, S., Wang, X., Dai, M., Huang, L., and Yuan, Z. (2014). Antibiotic alternatives:the substitution of antibiotics in animal husbandry. *Frontiers in Microbiology*. 5. 69–83.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2019). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. 4th ed. CLSI supplement VET08. Wayne, PA.
- Çiftci, A., Ica, T., Onuk, E. E., Baş, B., ve Tosun, G. (2003). Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında slime faktor üretimi ve antibiyotik dirençliliği. *Veteriner Hekimler Mikrobiyoloji Dergisi*. 3 (1-2). 51-55

- Çiftçi, A., Fındık, A., Onuk, E. E., ve Savaşan, S. (2009). Detection of methicillin resistance and slime factor production of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. *Brazilian Journal of Microbiology*. 40 (2). 254–261.
- Darwish, S. F., and Asfour, H. A. E. (2013). Investigation of biofilm forming ability in Staphylococci causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. *The Scientific World Journal*. 2013 (378492). 9.
- Debnath, A., Parsonage, D., Andrade, R. M., He, C., Cobo, E. R., Hirata, K., Chen, S., Garcia-Rivera, G., Orozco, E., Martinez, M. B., Gunatilleke, S., Barrios, A. M., Arkin, M. R., Poole, L. B., McKerrow, J. H., and Reed, S. L., (2012). A high-throughput drug screen for *Entamoeba histolytica* identifies a new lead and target. *Nature Medicine*. 18 (6). 956-60.
- Dego, O.K. (2020). Current status of antimicrobial resistance and prospect for new vaccines against major bacterial bovine mastitis pathogens. animal reproduction in veterinary medicine. *Animal Reproduction in Veterinary Medicine*.
- De Vuyst, L. and Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 13. 194–199.
- DiMasi, J. A., Grabowski, H. G., Hansen, R. W. (2016). Innovation in the Pharmaceutical Industry: New Estimates of R & DCosts. *Journal of Health Economics*. 47. 20-33.
- Dong, C., Zhou, J., Wang, P., Li, T., Zhao, Y., Ren, X., Lu, J., Wang, J., Holmgren, A., Zou, L. Topical Therapeutic Efficacy of Ebselen Against Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* LT-1 Targeting Thioredoxin Reductase. *Frontiers in Microbiology*. 15 (10). 3016.
- dos Santos Nascimento, Fagundes J. P. C., de Paiva Brito M. A., dos Santos K. R. and do Carmo de Freire Bastos M. (2005). Production of bacteriocins by coagulase-negative staphylococci involved in bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*. 106. 61–71.
- ECDC. (2017). Summary of the latest data on antibiotic resistance in the European Union. European Centre for Disease Prevention and Control. Stockholm. <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/summary-latest-data-antibiotic-resistance-european-union>.
- Elder, D. P., Kuentz, M., and Holm, R. (2016). Antibiotic resistance: the need for a global strategy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 105 (8). 2278–2287.
- Erskine, R. J., Walker, R. D., Bolin, C. A., Bartlett, P. C., White, D. G. (2002). Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. *Journal of Dairy Science*. 85 (5). 1111-1118.
- Farha, M. A. and Brown, E. D., (2019). Drug repurposing for antimicrobial discovery. *Nature Microbiology*. 4. 565–577.
- Fındık, A., Çiftçi, A., Önyay, T., Sezener, M. G., Koçak, Y., Gülhan, T. (2018). Determination of methicillin resistance and some genotypic characteristics of staphylococci isolated from dogs and their owners. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 42. 549-555.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2016). The FAO Action Plan on Antimicrobial Resistance 2016–2020. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Founou, L. L., Founou, R. C., and Essack, S. Y. (2016). Antibiotic resistance in the food chain:a developing country-perspective. *Frontiers in Microbiology*. 7. 1881.

- Garcia-Alvarez, L., Hoşden, M. T., and Lindsay, H. (2011). Methicillin resistant *S. aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infectious Diseases*. 11 (8). 595-603.
- Giannouli, S., Labrou, M., Kyritsis, A., Ikonomidis, A., and Pournaras, S. (2010) Detection of mutations in the FemXAB protein family in oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 65. 626–633.
- Goetz, C., Tremblay, Y. D. N., Lamarche, D., Blondeau, A., Gaudreau, A. M., Labrie, J., Malouin, F., and Jacques, M. (2017). Coagulase-negative staphylococci species affect biofilm formation of other coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci. *Journal of Dairy Science*. 100. 6454–6464.
- Graf, A. C., Leonard, A., Schauble, M., Rieckmann, L. M., Hoyer, J., Maass, S., Lalk, M., Becher, D., Pane-Farre, J., and Riedel, K. (2019). Virulence factors produced by *Staphylococcus aureus* biofilms have a moonlighting function contributing to biofilm integrity. *Molecular & Cellular Proteomics*. 18 (6). 1036-1053.
- Gutiérrez, D., Delgado, S., Vázquez-Sánchez, D., Martínez, B., Cabo, M.L., Rodríguez, A., Herrera, J.J., Garcia, P., (2012). Incidence of *Staphylococcus aureus* and analysis of associated bacterial communities on food industry surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*. 78. (24). 8547–8554.
- Hackbarth, C. J., Kocagoz, T., Kocagoz, S., and Chambers, H. F. (1995). Point mutation in *Staphylococcus aureus* PBP2 gene affect penicillin-binding kinetics and are associated with resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 39. 103–136.
- He, S., Lin, B., Chu, V., Hu, Z., Xiao, J., Wang, A. Q., Schweitzer, C. J., Li, Q., Imamura, M., Hiraga, N., Southall, N., Ferrer, M., Zheng, W., Chayama, K., Marugan, J. J. and Liang, T. J. (2015). Repurposing of the antihistamine chlorcyclizine and related compounds for treatment of hepatitis C virus infection. *Science Translational Medicine*. 7 (282). 282ra49
- Hendriksen, R. S., Mevius, D. J., Schroeter, A., Teale C., Meunier, D., Butaye, P., Franco, A., Utinane, A., Amado, A., Moreno, M., Greko, C., Stärk, K., Berghold, C., Myllyniemi, A. L., Wasyl, D., Sunde, M. and Aarestrup, F.M. (2008). Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from cattle in different European countries: 2002-2004. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 50 (28).
- Hussein, K., Sprecher, H., Mashiach, T., Oren, I., Kassis, I., Finkelstein, R. (2009). Carbapenem resistance among *Klebsiella pneumoniae* isolates: risk factors, molecular characteristics, and susceptibility patterns. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 30 (7). 666-671.
- Imperi, F., Massai, F., Pillai C. R., Longo, F., Zennaro, E., Rampioni, G., Visca, P., Leoni, L. (2013). New life for an old drug: the anthelmintic drug niclosamide inhibits *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 57. 996–1005.
- İlhan, Z. (2018). Mastitiste Teşhis ve İmmünoprofilaksi. Şendağ S, editör. Mastitis. Ankara: Türkiye Klinikleri. p.1-6.
- Jin, G., Wong, S. T. C. (2014). Toward better drug repositioning: prioritizing and integrating existing methods into efficient pipeline. *Drug Discovery Today*. 19 (5). 637-644.

- Kalmus, P., Aasmäe, B., Kärssin, A., Orro, T., and Kask, K. (2011). Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 53 (2011).
- Karahan M. ve Çetinkaya B. (2007). Coagulase gene polymorphisms detected by PCR in *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in Turkey. *The Veterinary Journal*. 174 (2007). 428–431.
- Kateete, D. P., Kabugo, U., Baluku, H., Niyakarahuka, L., Kyobe, S., Okee, M., Najjuka, C. F. and Joloba, M.L. (2013). Prevalence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from milkmen and cows with clinical mastitis in and around Kampala, Uganda. *PLoS One*. 7;8. (5). e63413.
- Kuboniwa, M., Tribble, G. D., James, C. E., Kilic, A. O., Tao, L., Herzberg, M. C., Shizukuishi, S. and Lamont, R. J. (2006). *Streptococcus gordonii* utilizes several distinct gene functions to recruit *Porphyromonas gingivalis* into a mixed community. *Molecular Microbiology*. 60. 121–139.
- Kresken, M. and Hafner, D. (1999). Drug resistance among clinical isolates of frequently encountered bacterial species in central Europe during 1975–1995. *Infection*. 27 (2). 2–8.
- Krysan, D.J. and Didone, L. (2008). A high-throughput screening assay for small molecules that disrupt yeast cell integrity. *Journal of Biomolecular Screening*. 13. 657–664
- Laxminarayan, R., Duse, A., Watal, C., Zaidi, A. K., Wertheim, H. F., Sumpradit, N., Vlieghe, E., Hara, G. L., Gould, I. M., Goossens, H., Greko, C., So, A. D., Bigdeli, M., Tomson, G., Woodhouse, W. and Ombaka, E. (2013). Antibiotic resistance – the need for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases*. 13 (12). 1057–1098.
- Levy, S. B. (2002). Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 49. 25-30.
- Lyytikäinen, O., Vaara, M., Järviluoma, E., Rosenqvist, K., Tiittanen, L. and Valtonen, V. (1996). Increased resistance among *Staphylococcus epidermidis* isolates in a large teaching hospital over a 12- year period. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 15. 133–138.
- Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B. and Stelling, J. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*. 18 (3). 268-281.
- Markey, B. K., Leonard F. C., Archambault, M., Cullinane, A. and Maguire, D. (2013). *Clinical Veterinary Microbiology*. Edinburgh Second edition: Elsevier.
- May, H. C., Yu, J. J., Guentzel, M. N., Chambers, J. P., Cap, A. P. and Arulanandam, B. P. (2018). Repurposing Aurano-fin, Ebselen, and PX-12 as Antimicrobial Agents Targeting the Thioredoxin System. *Frontiers in Microbiology*. 9. (336).
- McDougal, L. K. and Thornsberry, C. (1986). The role of  $\beta$ -lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. *Journal of Clinical Microbiology*. 23. 832–839.
- Melchior, M. B., Vaarkamp, H. and Fink-Gremmels, J. (2006). Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? *Veterinary Journal*. 171 (3). 398-407.

- Melo, P. C., Ferreira, L. M., Filho, A. N., Zafalon, L. F., Vicente, H. I. G. and de Souza, V. (2013). Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Veterinary Microbiology Brazilian Journal of Microbiology*. 44 (1).
- Miró-Canturri, A., Ayerbe-Algaba, R. and Smani, Y. (2019). Drug repurposing for the treatment of bacterial and fungal infections. *Frontiers in Microbiology*. 10. 41.
- Mohammad, H., Abutaleb, N. S., Dieterly, A. M., Lyle, L. T. and Seleem, M. N. (2021). Evaluation of ebselen in resolving a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection of pressure ulcers in obese and diabetic mice. *PLoS One*. 22. 16. (2).
- Nasr, R. A., AbuShady, H. M. and Hussein, H. S. (2012). Biofilm formation and presence of *icaAD* gene in clinical isolates of staphylococci. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 13 (3). 269-274.
- Nobrega, F. L., Vlot, M., Jonge, P. A., Dreesens, L. L., Beaumont, H. J. E., Lavigne, R., Dutilh, B. E. and Brouns, S. J. J. (2018). Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. *Nature Reviews Microbiology*. 16. 760–773.
- Özyurtlu, N. (2011). İneklerde mastitisin ekonomik ve sağlık açısından önemi. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 1 (5). 36-38.
- Pandey, M., Singh, A. K., Thakare, R., Talwar, S., Karaulia, P., Dasgupta, A., Chopra, S. and Pandey, A. K. (2017). Diphenyleneiodonium chloride (DPIC) displays broad-spectrum bactericidal activity. *Scientific Reports*. 7 (1). 11521.
- Peyclit, L., Baron, S. A. and Rolain, J. M. (2019). Drug repurposing to fight colistin and carbapenem-resistant bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 9. 193.
- 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. 7027–7038.
- Pitkala, A., Haveri, M., Pyörälä, S., Mylly, V. and Honkanen-Buzalski, T. (2004). Bovine mastitis in Finland 2001—prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *Journal of Dairy Science*. 87 (8). 2433-2441.
- Pu, W., Su, Y., Li, J., Li, C., Yang, Z., Deng, H. and Ni, C. (2014). High incidence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with bovine mastitis in China. *PLoS ONE*. 9 (2). e88134.
- Puyvelde, S. V., Deborggraeve, S. and Jacobs, J. (2018). Why the antibiotic resistance crisis requires a one health approach. *The Lancet Infectious Diseases*. 18 (2). 132-134.
- Pyörälä, S. and Taponen. S. (2009). Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens. *Veterinary Microbiology*. 134. 3–8.
- Rangel-Vega, A., Bernstein, L. R., Mandujano-Tinoco, E. A., García-Contreras, S. J. and García-Contreras, R. (2015). Drug repurposing as an alternative for the treatment of recalcitrant bacterial infections. *Frontiers in Microbiology*. 6 (282). 1-8.
- Rickard, A. H., Gilbert P., High N. J., Kolenbrander P. E. and Handley P. S. (2003). Bacterial coaggregation: An integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends in Microbiology*. 11. 94–100.

- Ruegg, P. L. (2021). What Is Success? A Narrative Review of Research Evaluating Outcomes of Antibiotics Used for Treatment of Clinical Mastitis. *Frontiers in Veterinary Science*. 8. 639641.
- Salaudin, M. D., Akter, M. R., Hossain, M. D. K., Nazir, K. H. M. N. H., Noreddin, A. and Zowalaty, M. E. E. (2020). Molecular detection of multidrug resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis milk in Bangladesh. *Journal of Veterinary Science*. 7 36.
- Salina, A., Guimarães F. F., Rall, V. L. M., Richini Pereira, V. B., Menozzi, B. D. and Langoni, H. (2020). Detection of icaA, icaD, and bap genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* and non-aureus staphylococci isolated from subclinical and clinical bovine mastitis. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 72 (3). 1034-1038.
- Serafin, M. B. and Hörner, R. (2018). Drug repositioning, a new alternative in infectious diseases. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 22 (3).
- Sharma, C., Rokana, N., Chandra, M., Singh, B. P., Gulhane, R. D., Gill, J. P. S., Ray, P., Puniya, A. K. and Panwar, H. (2018) Antimicrobial Resistance: Its Surveillance, Impact, and Alternative Management Strategies in Dairy Animals. *Frontiers in Veterinary Science*. 4. 237.
- Shore, A. C., Deasy, E. C. and Slickers, P. (2011). Detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 55 (8). 3765-3773.
- Simarro, P. P., Franco, J., Diarra, A., Postigo, J. A. and Jannin, J. (2012). Update on field use of the available drugs for the chemotherapy of human African trypanosomiasis. *Parasitology*. 139. 842-46.
- Simojoki, H., Hyvönen, P., Plumed Ferrer, C., Taponen, S. and Pyörälä S. (2012). Is the biofilm formation and slime producing ability of coagulase-negative staphylococci associated with the persistence and severity of intramammary infection? *Veterinary Microbiology*. 158. 344–352.
- Smorenburg, C. H., Seynaeve, C., Bontenbal, M., Planting A. S., Sinderman, H. and Verweij, J. (2000). Phase II study of miltefosine 6% solution as topical treatment of skin metastases in breast cancer patients. *Anticancer Drugs*. 11 (10). 825–828.
- Su, C., Kanevsky, I., Jayarao, B.M., Sordillo, L.M. (2000). Phylogenetic relationship of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis based on coagulase gene polymorphism. *Veterinary Microbiology*. 71. 53–58.
- Stokes, J. M., MacNair, C. R., Ilyas, B., French, S., Cote, J. P., Bouwman, C., Farha, M. A., Sieron, A. O., Whitfield, C., Coombes, B. K. and Brown, E.D. (2017). Pentamidine sensitizes gram-negative pathogens to antibiotics and overcomes acquired colistin resistance. *Nature Microbiology*. 6 (2). 17028.
- Tang, J., Chen, J., Li, H., Zeng, P. and Li, J. (2013). Characterization of adhesin genes, staphylococcal nuclease, hemolysis, and biofilm formation among *Staphylococcus aureus* strains isolated from different source. *Foodborne Pathogens and Diseases*. 10 (9). 757–763.
- Tanwar, J., Das, S., Fatima, Z. and Hameed, S. (2014) Multidrug resistance: an emerging crisis. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 7. 541340.
- Thakare, R., Singh, A.K., Das, S., Vasudevan, N., Jachak, G.R., Reddy, D.S., Dasgupta, A. and Chopra, S. (2017). Repurposing Ivacaftor for treatment

- of *Staphylococcus aureus* infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 50 (3). 389–392.
- Thakare, R., Shukla, M., Kaul, G., Dasgupto, A. and Chopra, S. (2019). Repurposing disulfiram for treatment of *Staphylococcus aureus* infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 53 (6). 709–715.
- Thangamani, S., Younis, W. and Seleem, M. N. (2015a). Repurposing ebselen for treatment of multidrug-resistant staphylococcal infections. *Scientific Reports*. 5. 11596.
- Thangamani, S., Younis, W. and Seleem, M. N. (2015b) Repurposing Clinical Molecule Ebselen to Combat Drug Resistant Pathogens. *PLoS ONE*. 10 (7). e0133877.
- Thangamani, S., Mohammad, H., Abushahba, M. F., Sobreira, T. J., Hedrick, V. E. and Paul, L. N. (2016). Antibacterial activity and mechanism of action of auranofin against multi-drug resistant bacterial pathogens. *Scientific Reports*. 6. 22571.
- Theuretzbacher, U., Outtersson, K., Engel, A. and Karlén, A. (2019). The global preclinical antibacterial pipeline. *Nature Reviews Microbiology*. 18 (5). 275–285.
- Tomasz, A., Drugeon, H. B., de Lencastre, F. H., Jabes, D., McDougal, L. and Bille, J. (1989). New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 33. 1869–1874.
- Tonin, E. and Tomasz, A. (1986).  $\beta$ -Lactam-specific resistant mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 30. 577–883. 18.
- Tremblay, Y. D. N., Lamarche, D., Chever, P., Haine, D., Messier, S. and Jacques, M. (2013). Characterization of the ability of coagulase negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms. *Journal of Dairy Science*. 96. 234–246.
- Tremblay, Y. D. N., Caron, V., Blondeau, A., Messier, S. and Jacques, M. (2014). Biofilm formation by coagulase-negative staphylococci: Impact on the efficacy of antimicrobials and disinfectants commonly used on dairy farms. *Veterinary Microbiology*. 172. 511–518.
- Tsubakishita, S., Kuwahara-Arai, K., Sasaki, T. and Hiramatsu K. (2010). Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54. 4352– 4359.
- Türkyılmaz, S. ve Kaya, O. (2005). Determination of some virulence factors in *Staphylococcus Spp.* isolated from various clinical samples. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 30 (2006). 127-132.
- Vasudevan, P., Nair, M. K. M., Annamalai, T. and Venkitanarayanan, K. S. (2002). Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Veterinary Microbiology*. 92 (2003). 179–185.
- Villanueva-Lozano, H., Treviño-Rangel, R. J., González, G. M., Hernandez-Rodriguez, P. A., Camacho-Ortiz, A., Castillo-Reyna, L., Galindo-Alvarado, S. G. and Martinez-Resendez, M. F., (2017). Clinical evaluation of the antifungal effect of sertraline in the treatment of cryptococcal meningitis in HIV patients: a single Mexican center experience. *Infection*. 46(1). 25–30.

- Vural, R., Ergün, Y. ve Özenç, E. (2016). Büyük ruminantlarda mastitis In: evcil hayvanlarda meme hastalıkları, Ed: Kaymaz, M., Fındık, M., Rişvanlı, A., Köker, A., Medipres, Malatya, pp.149-259.
- World Health Organization. (2015). Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. Geneva: World Health Organization.
- Wu, S., de Lencastre, H. and Tomasz, A. (1998). Genetic organization of the *mecA* region in methicillin-susceptible and methicillin-resistant strains of *Staphylococcus sciuri*. *Journal of Bacteriology*. 180. 236 –242.
- Yazdani, R., Oshaghi, M., Havayi, A., Pishva, E., Salehi, R., Sadeghizadeh M. and Foroohesh, H. (2006). Detection of *icaAD* gene and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates from Wound infections. *Iranian Journal of Public Health*, 35 (2). 25-28.
- Yüksekdağ, Z. N. ve Baltacı, N. (2013). *Staphylococcus aureus* türlerinde biyofilm ve biyofilm oluşumundan sorumlu genler. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*. 43 (3). 77-83.

## ÖZ GEÇMİŞ

Gizem Pir, Çarşamba Ali Fuat Başgil Anadolu Lisesi'ni bitirdikten sonra Ondokuz Mayıs Üniversitesi Mühendislik Fakültesi'nden 2017 yılında mezun oldu. 2019 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yüksek Lisans programına girdi. Mezuniyetinden bu yana Gıda Mühendisi olarak görev yapmakta, orta derecede İngilizce bilmektedir.

### İletişim Bilgileri

Orcid No: 0000-0001-8694-9062

### Yayınlar:

1.**Pir G.**, Sezener M. G., Fındık A. Phenotypic and Genotypic Investigation of Biofilm Formation of Mastitis Originated Staphylococci. (Poster Presentation). 6th International Congress on Veterinary and Animal Science. 02-04 September 2021 (Online). Page: 206.