

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNSAN VE HAYVAN KÖKENLİ
STAPHYLOCOCCUS AUREUS İZOLATLARININ FENOTİPİK VE
GENOTİPİK ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

Veteriner Hekim Nilgün ÜNAL

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(DOKTORA TEZİ)**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ersin İSTANBULLUOĞLU**

2007–KIRIKKALE

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNSAN VE HAYVAN KÖKENLİ
STAPHYLOCOCCUS AUREUS İZOLATLARININ FENOTİPİK VE
GENOTİPİK ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

Veteriner Hekim Nilgün ÜNAL

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(DOKTORA TEZİ)**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ersin İSTANBULLUOĞLU**

Bu tez, Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (No: K.Ü.BAP 2005/12) ve TÜBİTAK (No: TOVAG 105 O 100) tarafından desteklenmiştir.

2007–KIRIKKALE

Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veteriner Mikrobiyoloji Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 05/06/2007

İmza

Prof. Dr. Ersin İSTANBULLUOĞLU
Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Jüri Başkanı

İmza

Prof. Dr. Deniz GÜR
Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi

İmza

Prof. Dr. K. Serdar DİKER
Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi

İmza

Doç. Dr. Dilek KILIÇ
Kırıkkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi

İmza

Doç. Dr. Murat YILDIRIM
Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
İçindekiler	III
Önsöz	V
Kısaltmalar	VI
Şekiller	VIII
Tablolar	IX
Resimler	X
ÖZET	1
SUMMARY	2
1. GİRİŞ	3
1.1. Stafilocokların tarihçesi ve sınıflandırılması	5
1.2. Stafilocokların yapısal özellikleri	7
1.3. Stafilocokların virülans özellikleri	8
1.3.1. Mikrokapsül	8
1.3.2. Lökosidinler	9
1.3.3. Stafilocokların hemolizinerleri	9
1.3.4. Stafilocokların Süperantijenleri	10
1.3.5. Epidermolitik toksinler	12
1.3.6. Diğer ekstrasellüler proteinler	12
1.3.7. Stafilocokların enzimleri	12
1.4. Hayvanlarda stafilocok enfeksiyonları	13
1.5. İnsanlarda stafilocok enfeksiyonları	15
1.6. Stafilocoklarda antimikrobiyal direnç sorunu	16
1.7. <i>S. aureus</i> izolatlarının epidemiyolojisi	24
2. GEREÇ VE YÖNTEM	33
2.1. Örneklerin alınması	33
2.2. İzolasyon ve tanımlama çalışmaları	34
2.2.1. Besiyerleri	34
2.2.2. Stafilocokların izolasyon ve tanımlanması	35
2.2.2.1. Katalaz testi	35

2.2.2.2. Modifiye oksidaz testi	36
2.2.2.3. Tüp koagülaz testi	36
2.2.2.4. Voges-Proskauer deneyi	37
2.2.2.5. Mannitolün anaerobik kullanımı	37
2.3. Antibiyotik duyarlılık testleri	38
2.4. Plazmid profil analizi	39
2.4.1. Plazmid DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler	39
2.4.2. Plazmid DNA izolasyonu	40
2.5. Pulsed Field Gel Electrophores Analizi	41
2.5.1. PFGE’de kullanılan çözeltiler	41
2.5.2. Pulsed- Field Gel Elektroforez	43
3. BULGULAR	45
3.1. Alınan süt örneklerinin CMT sonuçları	45
3.2. İzolasyon ve tanımlama sonuçları	45
3.3. Antimikrobik ilaçlara duyarlılık sonuçları	49
3.4. Plazmid profil analiz sonuçları	54
3.5. PFGE sonuçları	59
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	69
KAYNAKLAR	85
ÖZGEÇMİŞ	92

ÖNSÖZ

Gerek Veteriner Hekimlikte gerekse Tıp alanında, stafilocok enfeksiyonları hala ciddi bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Stafilocok enfeksiyonlarının kontrol ve eradikasyonu için ülkemizde geniş kapsamlı epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda enfeksiyon etkenlerinin epidemiyolojilerinin belirlenmesinde fenotipik analizlerinin yanı sıra moleküler tiplendirme yöntemleri de uygulamaya girmiştir. Çalışmada sığır ve insan kökenli *S. aureus* izolatlarının çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları E-test ile belirlendi; genotipik özellikleri de plazmid ve PFGE tiplendirme yöntemleri ile irdelendi.

Doktora tez çalışmasının her aşamasında değerli yardım ve ilgilerini esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Ersin İSTANBULLUOĞLU'na; çalışmalarım sırasında sağladıkları değerli imkanlarla araştırmanın yapılmasına çok önemli katkıda bulunan Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğretim Üyeleri Sayın Prof. Dr. Deniz GÜR ve Sayın Prof. Dr. Serhat ÜNAL'a; Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Araştırma Laboratuvarı personelinden Sayın Dr. Belgin ALTUN ve Gülden KAYA'ya; Gülhane Askeri Tıp Akademisi'nden Sayın Dr. Kenan ŞENER'e; yardımlarını gördüğüm Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Dilek KILIÇ'a; hocam Sayın Doç. Dr. Murat YILDIRIM'a; Fakültemiz Dekanı Sayın Prof. Dr. Ertuğrul ELMA'ya; Anabilim Dalımız akademik personeline; ayrıca aileme ve eşime içtenlikle teşekkür ederim.

KISALTMALAR

A.B.D.	Amerika Birleşik Devletleri
AAC	Aminoglikozid asetiltransferaz
ANT	Aminoglikozid nükleotidiltransferaz
APH	Aminoglikozid fosfotransferaz
bp	base pairs (baz çifti)
CE	Sefalotin
CLSI	Clinical Laboratory Standart Institue
CMT	California Mastitis Test
EE	Eksudatif epidermitis
EF	Enrofloksasin
EM	Eritromisin
ETA	Eksfoliatif toksinA
ETB	Eksfoliatif toksinB
GM	Gentamisin
I	Intermediate (Orta Hassas)
KNS	Koagulaz Negatif Stafilokoklar
LZ	Linezolid
<i>mecA</i>	Methicillin-resistant gene <i>mecA</i>
MİK	Minimal İnhibitör Konsantrasyon
MRSA	Metisilin Resistance <i>Staphylococcus aureus</i>
NNIS	National Nosocomial Infection Surveilance
OX	Oksasilin
PBP_{2a}	Penisilin “Binding” Protein 2a
PCR	“Polimerase Chain Reaction” (Polimeraz Zincir Tepkimesi)
PFGE	Pulsed-Field Jel Elektroforez tekniği
PG	Penisilin
R	Resistanse (Dirençli)
RAPD-PCR	“Random Amplification of Polymorphic DNA-PCR”
RFLP-PCR	“Restriction Fragment Length Polymorphism- PCR“
RI	Rifampin
S	Sensitive(Duyarlı)

SE	Stafilokokal Enterotoksin
SSS	“Scalded Skin Syndrome”
TC	Tetrasiklin
Tra	Transfer
TS	Trimetoprim/Sulfametaksazol
TSS	Toksik Şok Sendromu
TSST	Toksik Şok Sendrom Toksin
VA	Vancomisin
VISA	Vankomisin Intermediate <i>Staphylococcus aureus</i>
VRE	Vankomisin Resistanse <i>Enterococcus</i>
WHO	World Health Organization

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> 'un virülens faktörleri	8
3.1. 96 <i>S. aureus</i> izolatına ait dendogram.	61
3.2. 96 <i>S. aureus</i> izolatının oluşturduğu gruplara ait dendogram.	62

TABLULAR

Tablo	Sayfa
1.1. Çeşitli hayvanlardan izole edilen stafilokok türleri	6
1.2. Stafilokokların plazmidleri	26
2.1. Stafilokok izolasyonu için kullanılan örneklerin kökenleri ve sayıları	34
3.1. CMT ile elde edilen bulgular	45
3.2. İnek ve bakıcılardan izole edilen stafilokok suşlarının kaynakları, biyotipleri ve izolasyon oranları	48
3.3. <i>S. aureus</i> izolatlarının kökenleri ve direnç oranları.	50
3.4. <i>S. aureus</i> (n:96) izolatlarına karşı antibiyotiklerin MİK ₅₀ ve MİK ₉₀ değerleri	52
3.5. Mastitisli inek sütlerinden izole edilen 46 <i>S. aureus</i> izolatına karşı antibiyotiklerin MİK ₅₀ ve MİK ₉₀ değerleri..	53
3.6. İneklerin meme başı derisi ve burunlarından izole edilen 38 <i>S. aureus</i> suşuna karşı antibiyotiklerin MİK ₅₀ ve MİK ₉₀ değerleri.	53
3.7. Bakıcı el ve burnundan izole edilen 12 <i>S. aureus</i> suşuna karşı antibiyotiklerin MİK ₅₀ ve MİK ₉₀ değerleri.	54
3.8. <i>S. aureus</i> (n:96) suşlarının orijinleri, taşıdıkları plazmid sayısı, plazmidlerinin moleküler ağırlığı ve antibiyotik direnç profilleri	55, 56, 57
3.9. 96 <i>S. aureus</i> izolatının, antibiyotik direnç özellikleri, plazmid profilleri ve pulsotipleri	66, 67, 68

RESİMLER

Resim	Sayfa
3.1. E-test resmi.	51
3.2. E-test resmi.	51
3.3. <i>S. aureus</i> suşlarının plazmid paternleri	58
3.4. <i>S. aureus</i> suşlarının plazmid paternleri.	58
3.5. <i>S.aureus</i> izolatlarının <i>SmaI</i> enzimi ile kesilmiş PFGE paternleri	63
3.6. <i>S.aureus</i> izolatlarının <i>SmaI</i> enzimi ile kesilmiş PFGE paternleri	63
3.7. <i>S.aureus</i> izolatlarının <i>SmaI</i> enzimi ile kesilmiş PFGE paternleri	64

ÖZET

İnsan ve Hayvan Kökenli *Staphylococcus aureus* İzolatlarının Fenotipik ve Genotipik Özellikleri Üzerine Çalışmalar

Bu çalışmanın amacı, Kırıkkale ili ve çevresindeki süt sığırcılığı işletmelerinden (46 mastitisli inek sütü, 35 inek meme başı derisi, 3 inek burun, 3 bakıcı el ve 9 bakıcı burun sürüntü örneğinden) izole edilen *S. aureus* izolatlarının E-test metoduyla çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılık profillerini, plazmid ve Pulsed Field Gel Elektroforez (PFGE) analizleri ile de genotipik özelliklerini belirlemektir.

E-test sonuçlarına göre, *S. aureus* izolatlarının penisilin G, tetrasiklin, eritromisin, oksasilin ve enrofloksasin dirençleri sırasıyla %85,4 (82), 39,6 (38), %5,2 (5), 3,1 (3) ve %1,0 (1) olarak belirlendi.

Plazmid analizleri ile 9 farklı tipte plazmid profili belirlendi. Analizleri yapılan izolatların 87 (% 90,6) tanesinde 1,8-19 kb arasında değişen büyüklükte on farklı plazmid belirlendi ve izolatlarının 9 tanesinde (%9,4) plazmid saptanamadı. Plazmid paternleri P1 (Patern 1), P2,..., P9 olarak ifade edildi.

PFGE tiplendirme verilerine göre *S. aureus* izolatları genetik yakınlık bakımından 42 farklı paterne ve 13 ana gruba (A, B, C, D, E, F,G, H, I, J, K,L, M) ayrıldı. İzolatların % 58,3'ü (56 adet) A, %16,7'si (16) B, %5,2'si (5) C, %5,2'si (5) G, % 3,1'i (3) D, % 2,1'i (2) E, 2,1'i (2) L, 2,1'i (2) M, % 1,0'ı (1) F, % 1,0'ı (1) H, % 1,0'ı (1) I, % 1,0'ı (1) J ve % 1,0'ı (1) K pulsotipinde gruplandırıldı.

Sonuç olarak plazmid analizleri ve PFGE verilerine göre, Kırıkkale ve çevresindeki süt sığırcılığı işletmelerinde sınırlı sayıda *S. aureus* klonunun varlığı saptandı.

Anahtar Sözcükler: Antibiyotik direnci, MİK, Plazmid analizi, PFGE, *S. aureus*

SUMMARY

Studies on Phenotypic and Genotypic Features of *Staphylococcus aureus* isolated from Human and Animals

The aim of this study is to determine susceptibility patterns of several antibiotics to *S. aureus* strains isolated (46 from bovine milk samples with mastitis, 35 from bovine teat skins, 3 from bovine noses, 3 from caretaker hands and 3 from caretaker noses) from dairy farms in Kırkkale province by E-tests and define genotypic characteristic of these isolates by plasmid and Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) analysis.

According to E-test results, the percentages of *S. aureus* isolates resistant to penicilin G, tetracycline, erythromycin, oxacilline, enrofloxacin were found to be 85,4 % (82), 39,6 % (38), 5,2 % (5), 3,1 % (3) and 1,0 % (1), respectively.

Nine different types of plasmid profiles were determined in the isolates by plasmid analysis. In 87 (90.6 %) of the isolates, 10 different types of plasmids having the size between 1,8 -19 kb were determined while no plasmid was detected from the 9 (9.4 %) of the isolates. Plasmid patterns were defined as P1,.....,P9.

Genetic relationships among *S. aureus* isolates were performed using PFGE method, 42 distinct PFGE patterns of *S. aureus* isolates were identified. Strains were assigned as 13 major lineage groups (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M) with respected to the genetic relationships. The percentage of PFGE pulsotypes of strains were clustered as 58,3 % (56 samples) A, 16,7 % (16) B, 5,2 % (5) C, 5,2 % (5) G, 3,1 % (3) D, 2,1 % (2) E, 2,1 % (2) L, 2,1 % (2) M, 1,0 % (1) F, 1,0 % (1) H, 1,0 % (1) I, 1,0 % (1) J and 1,0 % (1) K, respectively.

In conclusion; according to plasmid analysis and PFGE data, a limited number of *S. aureus* clones was detected in dairy farms in Kırkkale province.

Key Words: Antibiotic resistance, MIC, Plasmid analysis, PFGE, *S. aureus*

1. GİRİŞ

Stafilokoklar, 0.5- 1.5 µm çapında, yuvarlak, hareketsiz, sporsuz ve gram pozitif bakterilerdir. Memeli ve kanatlıların derileri ile mukoz membranlarında yaşamakta ve doğada yaygın olarak bulunmaktadır. Günümüzde 41 farklı stafilokok türü tanımlanmıştır. Stafilokoklar genellikle konakçıları ile simbiyotik bir ilişki içerisindeyler. Ancak konakçının yüzeysel doku bütünlüğünün bozulduğu veya konakçı özgül direncinin baskılandığı durumlarda hızla çoğalarak lokal veya sistemik enfeksiyonlara neden olurlar (Bannerman 2003).

Stafilokoklar, hayvanlarda mastitis, artritis, otitis, epidermitis ve üriner sistem enfeksiyonları gibi enfeksiyonlara neden olurken insanlarda hastane enfeksiyonları, gıda zehirlenmeleri, osteomyelitis, poliartritis, endokarditis, toksik şok sendromu, folikülit, impetigo, sellülit, konjunktivitis, idrar yolları enfeksiyonları, pnömoni, haşlanmış deri sendromu (scalded skin syndrome, SSS) gibi çok sayıda enfeksiyona neden olmaktadır (Lee 2003, Ugur ve Ceylan 2003, Sousa ve Lencastre 2004, Leonard ve Markey 2007).

Penisilin G'nin 1940 yılında klinik kullanıma girmesi ile birlikte stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde önemli başarılar sağlanmıştır. Ancak penisilin G'nin klinik kullanıma girmesini takip eden dört yıl içerisinde penisilin dirençli *S. aureus* suşlarının varlığı açıklanmıştır. Bu nedenle penisilinaz üreten *S. aureus* enfeksiyonlarının tedavisinde eritromisin, tetrasiklin ve gentamisin gibi yeni antibiyotikler kullanılmaya başlanmıştır; fakat 1951 yılında çoğul dirençli *S. aureus* suşlarının varlığı ortaya konmuştur. Yine penisilin dirençli *S. aureus*'ların sağaltımı için 1960 yılında penisilinaza dirençli metisilin geliştirilmiştir. Ancak bir yıl sonra Jevons (1961) tarafından metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) bildirilmiştir. MRSA'lar en sık görülen nozokomial patojenlerdendir. 1970'lerde metisiline dirençli *S. aureus* izolatlarının tüm dünyada yaygın hale geldiği çeşitli araştırmalarla ortaya konmuştur. Önceleri penisiline karşı oluşan direnç, çoğul direnç halinde gelişmiştir. Başlangıçta hastane enfeksiyonlarına özgü karakterde olan direnç sorunu toplum

kökenli enfeksiyonlarda da oluşmaya başlamış ve sorun küresel bir halk sağlığı problemi haline gelmiştir (Jevons 1961, Hausler 2006, Leonard ve Markey 2007).

Dünyada üretilen antibiyotiklerin %50'si insanlarda %50'si ise hayvancılıkta kullanılmaktadır. Hayvanlarda kullanılan antibiyotikler, bakterilerdeki antimikrobiyal direncin artmasında risk oluşturmaktadır. Sağlıklı hayvanların intestinal florasındaki bakteriler direnç genleri için taşıyıcı rol oynamakta, doğrudan temas ya da gıdalarla insan florasına kolonize olabilmektedirler. Hatta direnç horizontal olarak insan patojenlerine de geçebilmekte ve enfeksiyonların tedavileri başarısızlıkla sonuçlanabilmektedir (Catry ve ark. 2003). Bu nedenle ülkemizde tüm antibiyotiklerin yem katkı ve premikslerde kullanımı Tarım ve Köyişleri Bakanlığı tarafından çıkarılan “Yem katkıları ve Premikslerin Üretimi, İthalatı, İhracatı, Satışı ve Kullanımı Hakkında Tebliğde Değişiklik ile (Tebliğ No: 2006/1) yasaklanmıştır.

S. aureus, süt hayvancılığı yapılan tüm ülkelerde görülen ve önemli ekonomik kayıplara neden olan mastitis olgularından en çok izole edilen etkidir. Türkiye de çeşitli araştırmalarda mastitisli ineklerin sütlerinden %30-73 oranında *S.aureus* izole edilmiştir (Arda ve İstanbulluoğlu 1980, Aydın ve ark. 1995, Türütöğlu ve ark. 1995, Şahin ve ark. 1997, Kuyucuoğlu ve Uçar 2001, Rişvanlı ve Kalkan 2002, Beytut ve ark. 2002, Yavuz ve Esendal 2002, Kırkan ve ark. 2005).

Gerek Veteriner Hekimlikte gerekse Tıp alanlarında, enfeksiyon hastalıklarının kontrol ve eradikasyonu için etkili stratejiler geliştirebilmek için patojenlerin doğadaki kaynaklarının, yayılımlarının, epidemiyolojilerinin araştırılması gereklidir. Bu nedenle insan veya hayvanlarda önemli enfeksiyonlara neden olan *S. aureus* izolatlarını tiplendirmek ve klonal yakınlıklarını araştırmak gereklidir. Patojenlerin tiplendirilmesi için fenotipik ve genotipik pek çok metot kullanılmaktadır (Kapur ve ark.1995, Derbentli 2002, Arbeit 1999).

Genotipik yöntemler, fenotipik metotlara göre tiplendirilebilirlik, tekrarlanabilirlik ve ayırım gücü bakımından daha üstün metotlardır. Genotipik tiplendirme metotları, plazmid profil analizleri, kromozomal DNA'nın restriksiyon endonükleaz analizi ve Pulsed-Field Jel Elektroforez tekniği (PFGE) olarak

sıralanabilir. Plazmid analizi, hızlı, stabil, tekrarlanabilir özelliklere sahiptir. Ayrıca plazmid analizinde pek çok suş çalışılabilmektedir (Kozarsky ve ark. 1986).

PFGE, hem insan hem de hayvanlar için önemli bir patojen olan *S. aureus*'ların tiplendirilmesinde kullanılan genetik metotlardan biridir. PFGE, ayırım gücü yüksek, tekrarlanabilirliği olan, güvenilir bir metottur. Tekrarlanabilirlik özelliğinin yüksek olması nedeniyle bu yöntem moleküler yöntemler içerisinde "altın standart" olarak kabul edilmektedir (Lange ve ark. 1999, Zadoks ve ark. 2000).

1.1. Stafilocokların tarihçesi ve sınıflandırılması

Staphylococcus cinsi *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 'ye göre *Micrococaceae* ailesi içerisinde *Stomatococcus*, *Planococcus* ve *Micrococcus* cinsleri ile birlikte gruplandırılmaktadır. Bu cinste 41 farklı tür mikroorganizma bulunmaktadır (Bannerman 2003).

Stafilokok terimi ilk kez 1883 yılında Sir Alexander Ougston tarafından, insanlarda irinli apselere neden olan üzüm şeklinde kokların tanımlanmasında kullanılmıştır. Staphle (Bunch of grapes) Latince üzün salkımı anlamındadır. Rosenbach 1884 yılında beyaz renkli koloni oluşturan gram pozitif kokları *Staphylococcus pyogenes albus*, sarı renkli kolonileri *Staphylococcus pyogenes aureus* ve limon sarısı renginde kolonileri ise *Staphylococcus pyogenes citreus* olarak tanımlamıştır (Parisi 1985).

Stafilokoklar kan plazmasını pıhtılaştırma özelliğine sahip olup olmamalarına göre Koagulaz Pozitif Stafilocoklar (KPS) ve Koagulaz Negatif Stafilocoklar (KNS) olarak gruplandırılırlar. *Staphylococcus aureus spp. aureus*, stafilocoklar arasındaki en patojen türdür (Koneman ve ark. 1997).

KNS'lar 1975 yılına kadar *S. albus* veya *S. epidermidis* olarak gruplandırılmışlar ve apatojen olarak düşünülmüşlerdir. Ancak son yirmi yılda KNS'ların önemi fark edilmiştir. İngiltere'de Ulusal Nozokomiyal Enfeksiyon Sorveyans programının (National Nosocomial Infection Surveillance NNIS) 1990-1995 yılları arasındaki verilerine göre KNS'lar nazokomiyal enfeksiyonların %11'ni oluşturmaktadır (Huebner ve Goldman 1999).

İnsanlardan ve diğer primatlardan *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. caprea*, *S. saccharolyticus*, *S. warneri*, *S. pasteurii*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. auricularis*, *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. xylosum* ve *S. simulans* izole edilmiştir. Bu türlerin çoğunluğu insanların doğal florasında bulunan bakterilerdir. Hayvanlardan izole ve tanımlanmış stafilocok türleri Tablo 1.1 de gösterilmektedir (Quinn ve ark.2000, Rich 2005).

Tablo 1.1. Çeşitli hayvanlardan izole edilen stafilocok türleri (Rich 2005)

Türler	Konakçı
<i>Staphylococcus arlettae</i>	Keçi/Burun/Kanatlı/Deri
<i>Staphylococcus aureus</i>	Sığır/Koyun/Keçi/Domuz/At/Tavşan/Kanatlı/Kedi/Köpek
<i>Staphylococcus aureus subsp anaerobius</i>	Koyun
<i>Staphylococcus capitis</i>	İnek/Süt
<i>Staphylococcus caprae</i>	Keçi/Deri
<i>Staphylococcus caseolyticus</i>	İnek/Süt, Domuz, Kanatlı/Deri
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	İnek/Süt, Köpek, At/Yara enfeksiyonu
<i>Staphylococcus cohnii</i>	İnek/Süt
<i>Staphylococcus equorum</i>	At/Deri
<i>Staphylococcus felis</i>	Kedi/Otitis eksterna, Deri enfeksiyonları
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	Kanatlı/Deri enfeksiyonları
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	İnek/Süt
<i>Staphylococcus hominis</i>	İnek/Süt
<i>Staphylococcus hyicus</i>	Domuz/İnek
<i>Staphylococcus intermedius</i>	Kedi/Köpek/At/İnek
<i>Staphylococcus lentus</i>	Domuz, Koyun, Keçi/Deri enfeksiyonları
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	İnek/Deri
<i>Staphylococcus sciuri</i>	İnek, Diğer hayvanlar/Deri enfeksiyonları
<i>Staphylococcus simulans</i>	İnek/Süt,Köpek, Kedi, Domuz/Deri
<i>Staphylococcus vitulinus</i>	İnek, Koyun, Domuz/Deri
<i>Staphylococcus warneri</i>	İnek/Süt
<i>Staphylococcus xylosum</i>	İnek,Koyun/Süt,Kedi,Kanatlı,Domuz,At/Deri

1.2. Stafilokokların yapısal özellikleri

Stafilokoklar, 0.5- 1.5 µm çapında, yuvarlak, hareketsiz, sporsuz ve gram pozitif bakterilerdir. Stafilokoklar çeşitli yönlerde bölündüğü ve birbirlerinden ayrılmadıkları için 2'li, 4'lü ve üzüm benzeri düzensiz kümeler oluşturan bakterilerdir. Sıvı besi yerlerinde diplokoklar veya kısa zincirler halinde görülürler. Stafilokoklar, karbonhidratları oksidatif ve fermentatif olarak kullanırlar. Fakültatif anaerobiktirler. Ancak *Staphylococcus saccharolyticus* ve *S. aureus subsp. anaerobius* anaerop üremektedir. Stafilokoklar, oksidaz negatif, katalaz pozitif bakterilerdir. Stafilokoklarda %30- 39 oranında G+C bulunmaktadır (Bannerman 2003).

Stafilokokal genom, profajlar, plazmidler ve transpozonlar ile yaklaşık 2800 bp 'lik sirküler bir kromozomdan oluşmaktadır. Kromozom ve ekstrakromozomal elementler üzerinde, virülens ve antibiyotiklere karşı direnç özelliklerini taşıyan genler bulunmaktadır. Bu genler ekstrakromozomal elementler aracılığı ile stafilokok suşları ve diğer gram pozitif bakteriler arasında taşınmaktadır (Lowy 1998).

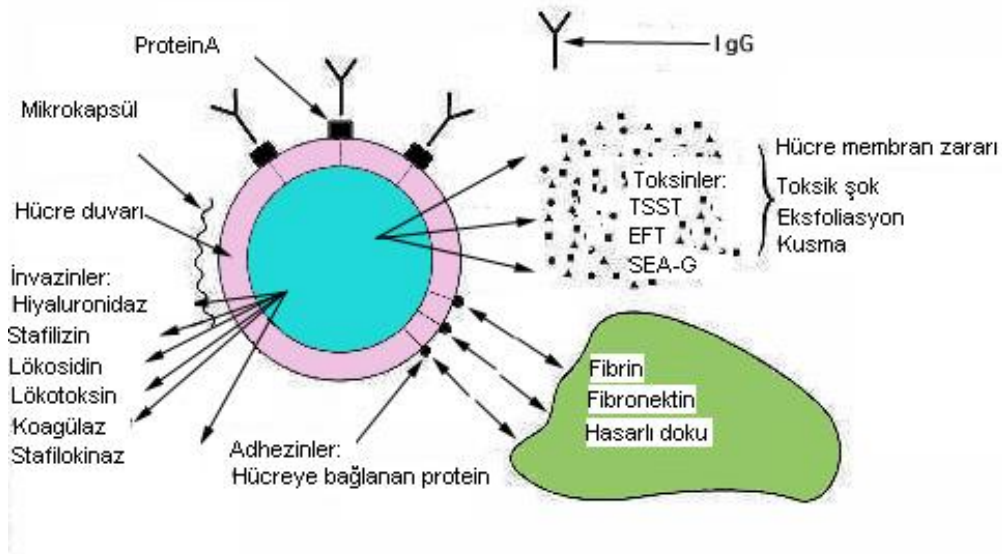
Stafilokokal hücre duvarının ağırlığının %50'sini peptidoglikan oluşturmaktadır. Peptidoglikan, art arda sıralanan ve 1,4-β glikozid bağlarıyla bağlanan *N*-asetilglukozamin ve *N*-asetilmuramik asit ünitelerinden oluşmaktadır (Lowy 1998).

Stafilokoklar çevre koşullarına dayanıklı olup pH 4.0 –9.0 arasında çoğalabilirler ve 60°C de 30 dakikada yıkımlanırlar. Ayrıca %7.5'luk tuz konsantrasyonlarında canlılıklarını sürdürebilir ve çoğalabilirler. Bu özelliklerinden dolayı stafilokokların izolasyonu amacıyla selektif ortam oluşturmada tuzlu besi yerleri kullanılmaktadır (Hirsh ve ark. 2004).

1.3. Stafilokokların virülens faktörleri

Stafilokoklar, protein A, mikrokapsül, bağlı koagülaz gibi yüzeylerine bağlı; toksinler, serbest koagülaz, lökositinler gibi hücre dışına salgılanan virülens faktörlerine sahiptirler. Stafilokokların neden olduğu hastalıkların çoğunun patogeneğinde birden fazla faktör rol oynamaktadır (Foster 2003).

Patojenik stafilokoklar yapılarında konakçı dokusuna kolonize olmalarını sağlayan yüzeyel proteinlere sahiptirler. Bu proteinler ekstrasellüler matriks proteinlerine bağlanırlar. Yüzeyel proteinlerin en önemlileri protein A, elastin, kollajen bağlayan protein, fibrinojen/fibrin bağlayan (clumping faktör) proteinlerdir. Osteomyelitis ve artritise neden olan suşların kollagene bağlanabilen reseptörleri vardır (Lowy 1998).



Şekil 1. *Staphylococcus aureus*'un virülens faktörleri (Todar 2006)

1.3.1. Mikrokapsül: Bazı bakterilerde hücre duvarının etrafında polisakkarit yapıda kapsül bulunmaktadır. Stafilokoklarda diğer bakterilerdekine benzer ışık mikroskopu ile görülebilen bir kapsül yoktur. Ancak antikorlarla işaretlendikten sonra elektron mikroskopu ile görülebilen mikrokapsül vardır. Mikrokapsülün fonksiyonu tam olarak belirlenememiştir. Hücre dışı ortamda ve komplementin yokluğunda

fagositozu engelleyebildiği gösterilmiştir (Foster 2003). *S. aureus*, serolojik olarak birbirinden farklı tipte 11 mikrokapsül oluşturabilmektedir. *S. aureus*'un klinik izolatlarının %75'inde serotip 5 ve 8 tespit edilmiştir. MRSA izolatlarının çoğunda tip 5 tespit edilmiştir (Lowy 1998).

Stafilokoklarda kapsül gibi hücreye sıkıca bağlanmayan ve hücre etrafında gevşek bir yapıda bulunan bir Slime Tabakası vardır. Slime Tabakası, monosakkarit ve küçük peptidlerden meydana gelmekte ve stafilokokların çoğunluğunda genetik ve çevre faktörlerine bağlı olarak oluşturulmaktadır. Özellikle koagülaz negatif stafilokoklarda, dokulara veya vücuda yabancı katater, graft, eklem protezleri ve kalp kapakçığı protezlerine bağlanmayı kolaylaştırmaktadır (Mutlu ve Ögünç 1999)

1.3.2. Lökosidinler: *S. aureus* tarafından oluşturulan bu toksin spesifik olarak polimorfonükleer hücreleri etkilemektedir. "Panton-Valentine" toksin olarak da bilinirler. Stafilokok enfeksiyonlarına karşı konakçı savunması için önemli bir mekanizma olan fagositoza engel olmaktadır (Hirsh ve ark. 2004).

1.3.3. Stafilokokların hemolizini

Stafilokoklar, çok farklı tipte protein yapıda toksinler üretirler. Bu toksinlerden bazıları in vitro koşullarda eritrosit membranlarına zarar vererek hemolize neden olurlar. Bunlar alfa, beta, gamma ve delta olarak isimlendirilirler (Foster 2003).

1.3.3.1. Alfa toksin (α -toksin): *S. aureus*'ların membrana zarar veren en etkili toksinidir. İlk kez 1900'de Kraus ve Clairmont tarafından tanımlanmıştır. Bu toksine özellikle trombosit ve monositler daha duyarlıdır. Purifiye toksinlerle hayvanlar ve organ kültürlerinde yapılan çalışmalarda önemli bir virülens faktörü olduğu görülmüştür. Alfa toksinler için duyarlı hücrelerin üzerinde reseptörler bulunmaktadır. Alfa toksinler, bu reseptörlere bağlanarak hücre membranı üzerinde porlar oluştururlar (Cengiz 1999, Foster 2003).

1.3.3.2. Beta Toksin (β -toksin): Glenny ve Stevens tarafından 1935’de tanımlanmıştır. Stafilocokal sphingomyelinase olarakta bilinir. En iyi koyun, daha az olarak da insan ve tavşan alyuvarlarını lize ederler. Sığır mastitislerinden izole edilen suşların çoğunda üretilmektedir ve mastitisin patogeneğinde önemlidirler. Mastitis fare modellerinde β -toksin mutantlarında virülensin azaldığı gösterilmiştir (Cengiz 1999, Foster 2003).

1.3.3.3. Delta Toksin (δ -Toksin): 1947 yılında Williams ve Harper tarafından tanımlanan çok küçük peptidlerdir. *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *S. lugdunensis* tarafından üretilirler. Bu toksinin enfeksiyonlardaki rolü tanımlanamamıştır (Foster 2003).

1.3.3.4. Gama Toksin (γ -Toksin): Smith ve Price tarafından 1938 yılında tanımlanmıştır. Möllby Wadström tarafından elde edilmiştir. İnsan, tavşan ve koyun alyuvarları duyarlı iken, at ve kanatlı alyuvarları dirençlidirler. γ -toksin ve lökositinler duyarlı hücrelerin membranlarına zarar veren iki tamamlayıcı proteindirler. Ancak birlikte membrana zarar verirler (Cengiz 1999, Foster 2003).

1.3.4. Stafilocokların Süperantijenleri: enterotoksinler ve toksik şok sendrom toksin

S. aureus’lar süper antijen olan iki farklı toksin üretirler. Bunlar A’dan-M’ye (F ve J hariç) kadar alfabetik olarak isimlendirilen 11 enterotoksin (SE, Stafilocokal enterotoksin), ve toksik şok sendrom (TSST-1) toksinidir. Bu toksinleri kodlayan genler, kromozomdaki patojenite adaları (Pathogenicity Islands) olarak adlandırılan bölgelerde (SEB, SEC, SEK-M, TSST-1), profajlar (SEA, SEE) veya plazmidler (SED) üzerinde lokalize olmaktadır. Bunlar ısıya ve parçalayıcı enzimlere dirençlidirler. Enterotoksinler barsak kanalında henüz tanımlanamamış bir reseptöre bağlanarak kusma refleksini uyarırlar. TSST ise direkt olarak sınıf II MHC moleküllerine bağlanabilmektedirler. Güçlü süperantijenik etkileri ile nonspesifik

T-hücre proliferasyonuna ve yangı öncesi stokinlerin kontrolsüz salgılanmasına neden olurlar (Vernozy-Rozand ve ark. 1996, Balaban ve Rasooly 2000).

İnsanlarda *S. aureus* suşlarının oluşturdukları toksinlerde önemli hastalıklara neden olmaktadır.

Toksik Şok Sendromu (TSS): ilk defa 1978'de Todd ve arkadaşların tanımladığı birden fazla sistemi etkileyen bir hastalıktır. *S. aureus*'un ürettiği toksik şok sendromu toksini-1 (TSST-1) neden olmaktadır. Ateş, kusma, hipotansiyon, ishal ve letal şoka yol açar (Schlievert ve ark. 2004).

Uygun olmayan koşullarda saklanmış kremalı tatlılar, dilimlenmiş et ve et ürünleri, dondurma, süzme peynir gibi yiyecekler besin zehirlenmesine yol açarlar (Anonim 2006a).

S. aureus'un ürettiği toksinlerin gıdalarla birlikte alınması sonucu oluşan hastalıklar gıda kaynaklı enfeksiyonların en sık görülenlerindedir. Stafilokokal enterotoksin taşıyan besinlerin yenilmesinden 2-6 saat sonra bulantı, kusma, abdominal ağrı ve ishal görülür. Kısa inkübasyon periyodu stafilokokal gıda zehirlenmeleri için karakteristiktir (Balaban ve Rasooly 2000).

Erol ve Usca (1998), donmuş tavuk karkaslarından izole ettikleri 33 koagülaz pozitif stafilokok izolatının 7'sinin enterotoksin oluşturduğunu; bunların da 3'ünün yalnızca A tipi ET, 2'sinin yalnızca D tipi ET, 1'inin A ve B tipi ET, 1'inin A, B ve C tipi ET'leri birlikte oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Bu nedenle donmuş tavuk etlerinin stafilokokal intoksikasyonları yönünden potansiyel sağlık riski taşıdıklarını bildirmişlerdir.

1.3.5. Epidermolitik toksinler (Eksfoliatif/ ET)

S. aureus'lar tarafından üretilen bu toksinler yeni doğanlarda ve gençlerde görülen, deride önce küçük bir bölgede başlayan sonra yayılan, dokunulduğunda kolayca soyulan şişliklerle karakterize haşlanmış deri sendromuna (Scalded Skin Syndrome/ SSS) neden olurlar ve proteolitik aktiviteye sahiptirler. Antijenik olarak ET-A ve ET-B olmak üzere iki çeşittirler. ET-A kromozom tarafından kodlanmakta ve sıcaklığa dayanıklıdır. ET-B ise sıcaklığa dayanıksız olup plazmid tarafından kodlanmaktadır (Koneman ve ark. 1997, Farrell,1999).

1.3.6. Diğer ekstrasellüler proteinler

1.3.6.1. Koagulaz: Stafilotrombin olarak bilinen koagulaz, konakçının protrombinine bağlanarak fibrinojenin fibrine dönüşmesini sağlayan hücre dışı bir proteindir. Koagulaz patojenik stafilokokların ayırımında kullanılmaktadır. Fakat virülens faktörü olduğuna dair bir kanıt yoktur. Konakçı savunmasına karşı bakteriyi korumaktadır. Literatürlerde koagulaz ve *S. aureus*'un yüzeyinde bulunan fibrinojen bağlayan bir determinant olan clumping faktör ile ilgili karışıklıklar vardır. Terminolojide clumping faktör bağlı koagulaz olarak geçmektedir. Ancak genetik çalışmalar bu iki faktörün farklı olduğunu göstermektedir (Foster 2003, Todar 2006).

1.3.6.2. Stafilokinazlar: Stafilokok türleri tarafından oluşturulan fibrinolizinler, fibrini parçalayarak enfeksiyonun dokulara yayılmasına neden olurlar (Foster 2003).

1.3.7. Stafilokokların enzimleri

Hyaluronidaz, hücreler arasındaki matriksi parçalayarak; lipazlar yağ hücrelerini parçalayarak stafilokokların deri ve derialtı dokularına yayılmasına yardımcı olan enzimlerdir ve kronik furunkulozise neden olan *S. aureus* suşları tarafından üretilirler. Yağ asiti modifiye eden enzimler ise apse oluşumunda önemlidir (Foster 2003).

1.4. Hayvanlarda stafilokok enfeksiyonları

Koagülaz pozitif stafilokoklar sıcakkanlı hayvanların tümünde, konakçı türlerine göre değişen klinik bulgulara neden olmaktadır. Stafilokoklar inek, koyun ve keçilerde mastitislere; kuzularda (2-5 haftalık) kene ateşine; koyunlarda peri orbital ekzemalara (dermatitis); kedi ve köpeklerde osteomyelitis (özellikle diskospondilit), artritis ve mastitis enfeksiyonlarına; kanatlılarda stafilokokkozis'e; domuz yavrularında eksudatif epidermitis (EE) gibi enfeksiyonlara neden olmaktadır (Akay ve ark.1987, Radostits ve ark. 1999, Quinn ve ark.2000, Kahn 2005, Rich 2005).

Çok sayıda mikroorganizma türü sığırlarda mastitise neden olmaktadır. Mastitisli inek sütlerinden, yaygınlığına göre sırasıyla stafilokoklar (*S. aureus*, *S. epidermidis*), streptokoklar (*S. agalactiae*, *S.dysgalactiae*, *S.uberis*, *S. bovis*), koliformlar (özellikle *E. coli* ve *K. pneumoniae*), *Pseudomonas aeruginosa* *Mycoplasma* spp. ve *Candida* spp. izole edilmektedir (Türütoğlu ve ark. 1995, Nascimento 2005).

Son yıllarda yapılan çalışmalarla KNS'ların sığırların meme bezinde oluşturdukları enfeksiyonların önemi vurgulanmaktadır (Anthonisen ve ark. 2002, Nascimento 2005, Kırcan 2005).

KNS'lar laktasyondaki ineklerden en çok izole edilen bakteriler arasındadır. En çok izole edilen KNS'lar, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Staphylococcus simulans* dır (Aarestrup ve ark. 1999).

Yapılan çalışmalarda mastitisli ineklerin sütlerinden, *S. xylosus*, *S. chromogenes*, *S. sciuri*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S simulans*, *S. saprophyticus*, *S. hyicus*, *S. epidermidis*, *S. felis* ve *S. lentus* gibi çok çeşitli stafilokok türleri izole edilmiştir (Devriese ve ark. 2002, Boerlin ve ark. 2003).

Kedi ve köpeklerden izole edilen stafilocok türleri üzerinde yapılan çalışmalarda, en yaygın bulunan stafilocok türünün *S. intermedius* olduğu belirlenmiştir. *S. intermedius* köpeklerde piyoderma, endometritis, sistitis ve dış kulak yangısı gibi enfeksiyonlara da neden olmaktadır (Biberstein ve ark. 1984, Lilenbaum ve ark. 1998, Rich 2005).

Kedilerin çeşitli klinik örneklerinden stafilocoklar tek başlarına ya da diğer bakterilerle birlikte izole edilebilmektedirler. Igimi ve ark.'nın (1994) Tokyo da yaptıkları çalışmada kedilerin çeşitli klinik örneklerinden izole edilen 93 stafilocok suşunun biyokimyasal analizini yapmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre sırasıyla %45 *S. felis*, %14 *S. simulans*, %13 *S. aureus*, %10 *S. intermedius*, %6 *S. sciuri*, %6 *S. epidermidis*, %2 *S. haemolyticus*, %2 *S. xylosus* %1 *S. capitis*, %1 *S. equorum*, %1 *S. gallinarum* ve *S. lentus* tanımlamışlardır.

Atlarda *S. aureus* ile ilişkili olarak; mastitis, pektoral apseler (daha çok *Corynebacterium pseudotuberculosis* tarafından meydana gelirler), piyoderma ve kastrasyon sonucu oluşan apseler meydana gelmektedir (Hirsh ve ark. 2004).

Stafilocoklar bütün kanatlı türlerinde artrit, tenosynovitis, taban yastığı nekrozu ve civcivlerde septisemik enfeksiyonlara neden olmaktadır. *S. hyicus* ise domuz yavrularında (7 haftalık), çok bulaşıcı bir enfeksiyon olan eksudatif epidermitis (EE)'e neden olmaktadır (Akay ve ark.1987, Wegener ve ark. 1994, Kahn 2005).

Domuz yavrularında (7 haftalık), *S. hyicus* tarafından eksudatif epidermitis (EE) oluşturulmaktadır. Genellikle akut generalize bir enfeksiyondur. Derinin dökülmesi ve vücut boşluklarında eksudat birikimi, hastalıkta görülen klinik bulgular arasındadır. Bulaşma domuz sürülerinde %90'a kadar çıkabilmektedir (Wegener ve ark. 1994). Ayrıca travma ile derinin bütünlüğünün bozulması sonucu *S. aureus*

tarafından, deride, özellikle yüz ve kulakların etrafında lezyonlar oluşturulmaktadır (Hirsh ve ark. 2004).

1.5. İnsanlarda stafilokok enfeksiyonları

Stafilokoklar, sahip oldukları virülens faktörleri nedeniyle insanların tüm vücut sistemlerinde enfeksiyon yapabilmektedirler. *S. aureus*, deri dokusunda akne, arpacık ve furunculosis, vücudun değişik yerlerinde apselere, osteomyelitis, endocarditis gibi enfeksiyonlara neden olurlar. Ayrıca *S. aureus* şirurjikal yara kaynaklı, *S. epidermidis* medikal aletlerle ilişkili olarak hastane enfeksiyonlarına (nozokomiyal) yol açabilmektedirler. *S. aureus*'un salgıladığı toksinlerin gıdalarla alınması sonucu zehirlenmeler ve yine süper antijenlerinin kana karışması ile toksik şok sendromu oluşabilmektedir. *S. saprophyticus* üriner sistem enfeksiyonlarına neden olur. *S. lugdunensis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. schleiferi*, ve *S. intermedius* daha az patojendirler (Huebner ve Goldman 1999, Dünder ve Dünder 2002, Uğur ve Ceylan 2003,).

S. aureus özellikle MRSA izolatları, hastane kaynaklı enfeksiyonların önemli bir etkenidir. Ayrıca son yıllarda nozokomiyal enfeksiyonların % 8'ini KNS'lar oluşturmaktadır. *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* ve *S. warneri* türleri yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda katater ilişkili enfeksiyonlara neden olmaktadır (Raimundo ve ark. 2002, Huebner ve Goldmann 1999).

İmmun sistemi baskılanmış hastalarda hastane kaynaklı veya influenza epidemileri sırasında *S. aureus*'a bağlı pneumonilere neden olmaktadır (Sanford ve ark.1986).

Doğal kalp kapağı endokarditlerinin nedenleri arasında *S. epidermidis* ve *S. lugdunensis* gibi KNS'ların etkileri nadirdir. Ancak kalp kapak operasyonlarından sonra görülen endokarditlerde %40-50 arasında etken olarak tespit edilmektedirler (Huebner ve Goldmann 1999).

Osteomyelit ve piyoartrit: Yeni doğanlarda göbek kordonu enfeksiyonları sonrasında ya da bir odaktan hematogen yayılım sonucu, *S. aureus* tarafından oluşturulur. Daha çok çocuklarda meydana gelir ve oluşan osteomyelit, uzun kemiklerin diyafizinde görülür (Dündar ve Dündar 2002).

1.6. Stafilokoklarda antimikrobiyal direnç sorunu

Antibiyotikler insanlarda ve hayvanlarda başlıca enfeksiyöz hastalıkların tedavisinde ve bu hastalıklardan korunmada kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra antibiyotikler, hayvanlarda büyümeyi geliştirmek amacıyla ve daha az miktarlarda da tarımda bitkileri korumak amacıyla kullanılmaktadır. Aşırı miktarda antibiyotik kullanımı sonucu, antibiyotiklerin zıt ve yan etki riskleri artmakta ve toplum kaynaklı patojen etkenlerde antibiyotik direnç sorunları ortaya çıkmaktadır. Ayrıca kullanılan antibiyotikler patojenlerin yanı sıra normal flora bakterilerine de etki etmektedirler. Sonuç olarak, herhangi bir antibiyotiğin lokal konsantrasyonu, duyarlı bakteri popülasyonu için minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) dozundan yüksekse ve dirençli klon için MİK dozunun altındaysa bu antibiyotik dirençli türleri seçmektedir (Cizman 2003).

Alexander Fleming, 1928 yılında penisilini keşfetmiştir. Ancak teknik zorluklar nedeniyle ilacın klinik kullanıma girmesi 1940'ları bulmuştur. İnsanlarda, hayvanlarda ve bitkilerde aşırı antibiyotik kullanımı, bütün dünyada mikroorganizmalar üzerinde büyük bir selektif baskı oluşturmakta ve mikroorganizmalar herhangi bir antibiyotikle karşılaştıkları zaman er ya da geç direnç kazanmaktadırlar. Antibiyotik çağı başladığından beri yeni bir antibiyotik klinik kullanıma girdiğinde bazı türler duyarlı bazıları doğal olarak dirençlidirler. Ancak zamanla duyarlı türlerde direnç gelişmekte ve bu direncin giderek yaygınlaştığı görülmektedir. Örneğin, penisilinin klinik uygulamaya girmesinden birkaç yıl sonra bazı yerlerde stafiloklarda penisilin direnci %15 iken on yıl sonra bu oran %70'lere çıkmış ve bugün ise %95'ler düzeyindedir. İngiltere'de yılda 1400 insan *S. aureus* enfeksiyonundan ölmektedir. A.B.D.'de 2001 yılında enfeksiyondan 90 000 insan ölmüştür. Bu sayı on yıl önce 15 000 civarındaydı. Dünya Sağlık Organizasyonu

(WHO) ilaçlarda direnç tehdidinin önüne geçilmesi gerektiği konusunda sürekli olarak uyarılar yapmaktadır. Hollanda Halk Sağlığı Enstitüsünün çalışma sonuçlarına göre bugün dünyada 52 milyon insan burun floralarında çoğul dirençli stafilokok suşlarını taşımaktadır. Tonsillitis veya kulak enfeksiyonları gibi zararsız hastalıklar bile neredeyse tekrar tedavi edilemez hale geleceklerdir (Ryan 2004, Campanaud 2006, Hausler 2006).

Antimikrobiyal direnç, mikroorganizmanın hayatta kalabilmesi için önemlidir. Bir mikroorganizma antibiyotiklere karşı ya doğal olarak (intrinsik direnç, kalıtsal direnç) dirençlidir ya da duyarlı iken sonradan mutasyonla veya yeni genlerin kazanımı ile dirençli hale gelmektedir. Gram negatif bakterilerin çoğunun vankomisine ve metisiline, enterokokların ise sefalosporinlere duvar yapıları nedeniyle dirençli olmaları, intrinsik dirence örnek verilebilir (Gür 2002, Ryan 2004).

Mutasyonlar genellikle kromozomal DNA da oluşmaktadır. Örneğin streptomisin, rifampin ve florokinolonlara karşı gelişen direnç bu yolla olmaktadır. Ancak mutasyonların plazmid veya transpozonlar üzerindeki genlerde de oluşabildiği artık bilinmektedir (Gür 2002).

Yeni bir direnç geni kazanılması ile oluşan direnç, konjugasyon, transformasyon ve transdüksiyon mekanizmaları ile verici bir bakteriden alıcı bir bakteriye direnç geninin horizontal olarak transferi ile oluşmaktadır. Dirençli gen kazanımı, konjugasyonda bir protein tünel aracılığıyla, transformasyonda çıplak DNA'nın alınmasıyla ve transdüksiyonda ise viral fajlar aracılığıyla meydana gelmektedir (Ito ve ark. 2003).

Konjugasyon en önemli gen transfer mekanizmasıdır. Stafilokoklarda (β -laktamlar), enterobakterilerde (ampisilin, sulfonamid/trimetoprim, gentamisin, kloramfenikol) ve enterokoklarda (vankomisin) direnç konjugasyonla oluşmakta ve tahminen %85 oranında tedavide başarısızlığa yol açmaktadır (Cattray ve ark. 2003).

Aktarılabılır direnç genleri, bakterinin kendi genlerinde oluşan mutasyondan veya doğal direnç sağlayan antibiyotik üreten bakterilerden (*Streptomyces spp.* gibi) köken almaktadır. Bu direnç determinantları evrimsel ve ekolojik olarak plazmid

veya transpozon aracılığıyla farklı cinsler ve farklı türler arasında aktarılabilmektedir. Örneğin *Enterococcus faecalis* 'den *S. aureus*'a aminoglikozid direnci plazmid aracılığı ile aktarılabilmektedir (Lyon ve Skurray 1987).

S. haemolyticus'un hayvan kökenli klinik izolatları arasında antibiyotik ilaçlara çoğul dirençli suşlar yaygın olarak izole edilmektedir. Potansiyel patojen olmaları yanı sıra çoğul dirençli *S. haemolyticus*' lar, *S. aureus* ve *S. intermedius* gibi daha patojen koagulaz pozitif stafilokok türlerine direnç genlerini verici olarak hizmet edebilmektedirler. Anthonisen ve ark. (2002) ları yaptıkları bir çalışmada florada bulunan bakterilerdeki antimikrobiyal direnç genleri ile klinik örneklerden elde edilen *S. aureus*'ların direnç genlerinin benzer olduğunu, *S. haemolyticus* suşu ile vankomisin dirençli bir MRSA suşunun DNA dizisindeki benzerliğe dayanarak ortaya koymuşlar ve florada bulunan stafilokokların direnç genleri için taşıyıcı olabileceklerini belirtmişlerdir.

Bakterilerdeki önemli direnç mekanizmaları: 1) Antimikrobiklerin, bakteri içerisine girişinin engellenmesi veya aktif dışarı pompalama sistemleri ile bakteri içerisinde birikimlerinin engellenmesi, 2) Antimikrobiklerin, bakterilerdeki hedef bölgelerinin değiştirilmesi ile bakterinin bu antimikrobiklere duyarsız hale getirilmesi. 3) Antimikrobiklerin bakterilerde üretilen enzimlerle inaktive edilmesi olarak sıralanabilir (Ryan 2004).

S. aureus' da β -laktam antibiyotiklere karşı direncin temelinde iki mekanizma vardır. Birinci mekanizma; beta laktamaz enziminin üretilmesiyle bu ilaçlar yıkılmaktadır. Penisilin direnci, β -laktamaz (penisilinaz) enziminin, penisilinin yapısındaki β -laktamaz halkasını parçalayarak penisilini inaktive etmesine bağlıdır. β -laktamaz enzimi sıklıkla başka antibiyotiklere direnç genlerini de taşıyan bir plazmid tarafından kodlanır ve hücre dışına salınır (Dündar ve Dündar 2002, Prescott 2004).

β -laktamaz üreten stafilokoklar penisilin, ampisilin ve amoksisiline dirençlidirler (Derbentli 1996).

Beta-laktamazlar, penisilin direncinin yayılmasına ve metisilin gibi beta-laktamaz dirençli antistafilokokal penisilinlerin geliştirilmesine neden olmuştur. Penisilin

dirençli *S. aureus* enfeksiyonlarının tedavisi için, β -laktamaz dirençli yarı sentetik penisilinler (metisilin, oksasilin, nafsilin) 1960'lı yıllarda kullanıma girmiştir. β -laktamaza dirençli penisilinlerin kullanıma girmesinden kısa bir süre sonra bu antibiyotiklere dirençli suşların geliştiği saptanmıştır. Bu antibiyotiklerin hiç kullanılmadığı ülkelerde bile dirençli suşların saptanması, bu direnç şeklinin stafilokoklarda daha önceden var olduğunu göstermiştir. Bu direnç şekline intrinsik direnç veya metisilin direnci adı verilmektedir. Bu direnci gösteren bakteriler sefalosporinler de dahil tüm β -laktam antibiyotiklere dirençlidirler ve bu suşlara metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) suşları denmektedir (Dündar ve Dündar 2002, Prescott 2004).

β -laktam antibiyotiklere karşı direncin temelindeki ikinci mekanizma; penisilin bağlayan proteinler (PBPs) olarak isimlendirilen bakterinin membranına bağlı proteinlerdeki değişimdir (Mulligan 1993).

MRSA suşlarının metisiline direncini sağlayan özellik, 2.1-kb'lık ekzojen DNA parçası olan ve horizontal olarak transfer edilebilen metisilin direnç geni *mecA* (Methicillin-resistant gene *mecA*)'yı kazanmaları ile oluşmaktadır. MRSA ilk olarak 1961 yılında İngiltere'de tanımlanmıştır. Daha sonra diğer ülkelerde de bildirilmiştir. 1960'lı yıllarda bazı Avrupa ülkelerinde, 1970'li yıllarda da Amerika da epidemik boyutları araştırılmaya başlanmıştır. *mecA* geni PBP'2a'yı kodlamaktadır. Bu PBP, normal stafilokok suşlarında bulunan PBP-1,2 ve 3'ten farklıdır β -laktam antibiyotiklere düşük affinite göstermektedir. Bu enzim sefalosporinler ve karbapenemler de dahil olmak üzere tüm β -laktam antibiyotiklere düşük affinitesi nedeniyle, bu antibiyotiklerin varlığında aktivitesini devam ettirmekte ve bakteri hücre duvarının peptidoglikan çapraz bağlarını bağlayarak bakterinin parçalanmasını engellemektedir. (Derbentli 1996, Dündar ve Dündar 2002, Sousa ve Lencastre 2004).

Stafilokok mastitislerinin tedavisinde penisilinler ve aminoglikozidler tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Şimdiye kadar *S. aureus*'lar arasındaki en sık direnç benzilpenisilinler ve bunu takiben dihidrostreptomisin veya streptomisin için bildirilmiştir. Farklı ülkelerdeki MİK değerlerinin karşılaştırılması ve izolatların

duyarlılıklarındaki değişimlerin araştırılması, gelecekteki ilaç kullanımları için değerli bilgiler verecektir (Yoshimura ve ark. 2002).

Stafilokoklarda aminoglikozid direnci çoğunlukla bu grup ilaçları modifiye eden enzimlerin kazanılmasıyla oluşur. Bu enzimler, aminoglikozid fosfotransferaz (APH), aminoglikozid nükleotidiltransferaz (ANT), aminoglikozid asetiltransferaz (AAC)'dır. Stafilokoklarda tetrasiklinlere karşı direnç, plazma membranında bulunan TET proteini ile antibiyotiğin bakteri hücrelerinden aktif olarak dışarı pompalanması aracılığıyla ya da antibiyotiğin ribozomal hedefinin modifikasyonu ile meydana gelmektedir. Makrolid, linkozamid, sinerjistin ve ketolidlere direnç, hedefin modifikasyonu (ribozomun 50s alt birimi), asetiltransferaz enzimi ile antibiyotiğin inaktivasyonu ve ilacın aktif olarak MsrA proteini aracılığı ile dışarı pompalanması mekanizmaları ile oluşmaktadır. Stafilokoklarda kinolonlara dirençte ise hedef DNA girazın modifikasyonu, geçirgenliğin azalması ve aktif pompalama mekanizmaları ile oluşmaktadır. *S.aureus* izolatlarında rifampisine direnç ise RNA polimerazı kodlayan gendeki mutasyon sonucu meydana gelmektedir (Jehl ve ark. 2004).

Glikopeptid antibiyotikler birbirine kimyasal yapı bakımından çok yakın iki antibiyotikten (vankomisin ve teikoplanin) oluşur. Vankomisin ve teikoplanin arasındaki fark vankomisinin glikopeptid, teikoplaninin lipoglikopeptid olmasıdır. Yüksek molekül ağırlıklı (1.5-2 kDa) her iki antibiyotik aynı şekilde etki eder. Glikopeptid antibiyotikler peptidoglikan sentezinin son aşamasını inhibe ederek hücre duvarı sentezini durdurur. Glikopeptid, yeni oluşan peptidoglikanla birleşmeye hazır pentapeptid-disakkarit ünitesinin D-Ala-D-Ala terminalinine bağlanarak etki eder. Kütleleri nedeniyle bağlı glikopeptidler glikoziltransferaz ve transpeptidaz aktivitelerini engeller ve böylece peptidoglikan uzaması durur (Chadwick ve Wooster 2000, Jehl ve ark. 2004).

Bazı *S.aureus* izolatları vankomisine orta duyarlıdır (VISA) ve teikoplanine çapraz direnç göstermektedirler. Uzun süre vankomisin tedavisi uygulanmış hastalardan izole edilmişlerdir. VISA suşlarında, *vanA*, *vanB* ve *vanC* genleri bulunmamaktadır ve direnç mekanizması henüz tanımlanmamıştır. Peptidoglikanın bağlanma yeri peptidoglikan öncülünün D-Ala-D-Ala terminalidir. Dirençli

enterokoklarda, bağlanma noktasında D-Ala-D-Ala yerine, vankomisine daha düşük affiniteli D-Ala-D-Ser dipeptidi yer alır. Ancak, 1996'da Japon bir hastadan ilk olarak vankomisin dirençli MRSA izole edilmiştir. Postoperatif yara enfeksiyonu olan hastaya uzun süre vankomisin tedavisi uygulamanın sonucu olarak ortaya çıkmıştır. Daha sonra vankomisin dirençli *S. aureus* izolasyonu ABD'de, Fransa'da, Kore'de, Güney Afrika'da ve Brezilya'da da rapor edilmiştir (Hiramatsu 2001, Jehl ve ark. 2004).

Enterokok ve stafilokoklarda linezolid direnci 23S'lik rRNA'nın kodlayan genlerdeki mutasyonlarla ilişkili olarak oluşmaktadır. Çok ender olarak oksazolidinonlara dirençli suşlar izole edilmiştir, ancak direnç mekanizması henüz bilinmemektedir (Jehl ve ark. 2004). Tisodras ve ark.'ları (2001) 85 yaşında bir hastadan linezolide dirençli bir MRSA suşu izole etmişlerdir.

Türkiye'de ve yurt dışında stafilokok suşlarının çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıklarını belirlemek için çok sayıda çalışma yapılmıştır.

Arda ve İstanbulluoğlu (1980) Karacabey Harası, Çifteler Harası ve Lalahan Zootečni Araştırma Enstitülerinde yetiştirilen 1277 sağmal ineği CMT ile muayene etmişler; mastitis olgularından %31.1 oranında *S. aureus* izole etmişler; izole ettikleri stafilokokların penisiline %75, eritromisine %50, tetrasikline %70, gentamisine %60 oranlarında dirençli olduklarını belirlemişlerdir.

Aydın ve ark.'nın (1995) Kars yöresinde yaptıkları bir çalışmada, bu hayvanlara ait mastitisli sütlerden %35.89 oranında *S. aureus* ve %19.23 oranında da *S. epidermidis* izole etmişlerdir. İzole edilen *S. aureus* suşlarının penisiline %82, tetrasikline %67, gentamisine %25 enrofloksasine %10 oranında dirençli oldukları; *S. epidermidis* suşlarının ise penisiline %26, tetrasikline %13, gentamisine %6, enrofloksasine %20 oranında dirençli olduklarını tespit etmişlerdir.

Şahin ve ark.'nın (1997) Kars'da yaptıkları bir çalışmada inek süt örneklerinden izole ettikleri *S. aureus* suşlarının penisilin direncini %88, eritromisin

direncini %17 bulurken enrofloksasine dirençli suş tespit etmemişlerdir. Yine aynı çalışmada izole edilen *S. epidermidis* suşlarında ise penisilin direncini %70, eritromisin direnci %10 oranında bulunurken enrofloksasine dirençli suş tespit etmemişlerdir.

Hadimli ve ark. (2001) Konya'da yaptıkları bir çalışmada mastitisli inek süt örneklerinden izole ettikleri 107 stafilokok suşunda, enrofloksasiline %98, oksasiline %86, gentamisine %76, trimetoprim+sulfametoksazol'e %71 oranında duyarlılık ve penisiline %61, eritromisine %46 oranında dirençlilik tespit etmişlerdir.

Kuyucuoğlu ve Uçar (2001) Afyon bölgesinde bulunan 272 sağmal ineğin CMT pozitif süt örneklerinden izole ve identifiye edilen mikroorganizmalardan 62 (%40) tanesi *S. aureus* ve 22 (%14) tanesini *S. epidermidis* olarak tespit etmişlerdir. İzole edilen *S. aureus* suşlarının duyarlılıkları penisiline %22, tetrasikline % 27, eritromisine %54 ve enrofloksasine %59; *S. epidermidis* suşlarının duyarlılıkları ise sırasıyla %31, %68, %27 ve %40 oranlarında tespit edilmiştir.

Uçan ve Aslan (2002) Konya bölgesindeki mastitisli inek sütlerinden izole ettikleri 81 koagülaz pozitif stafilokok suşunda, en yüksek oranda penisiline karşı direnç geliştiğini (%85,2) tespit etmişlerdir. Metisiline dirençli bir suş izole etmişlerdir.

Kireççi ve Çolak'ın (2002) yaptığı bir çalışmada mastitisli inek sütlerden izole ettikleri iki *S. aureus* suşunda ve bir KNS suşunda metisilin direnç tespit etmişlerdir.

Jones ve Bennett 1965 yılında mastitisli sütlerden ve çiftliklerde çalışan insanların burunlarından sürüntü örnekleri almışlar, izole ve identifiye ettikleri stafilokok suşlarının hepsinin polimiksin B'ye dirençli olduğunu ve penisiline %60, eritromisin ve terasikline %100 duyarlı olduklarını saptamışlardır.

Pereira ve Siqueira-Junior (1995) Brezilya'da yaptıkları bir çalışmada, sağlıklı ineklerin memebaşı derileri, burunları ve mastitli hayvanlardan alınan sütlerden izole

edilen 46 *S. aureus*'un penisilin direnci %80, tetrasiklin direnci %15 ve eritromisin direnci ise %2 bulunmuştur.

Lange ve ark. (1999) Brezilya'nın güneyinde subklinik mastititli ineklerin süt örneklerinden izole edilen 66 *S. aureus* izolatının gentamisin, penisilin G/ampisilin, sülfometoksazol/trimetoprim duyarlılığını incelemişler ve penisilin G/ampisiline direnci %43.9 olarak belirlemişlerdir.

Vintov ve ark. (2003) yaptıkları bir çalışmada ABD ve İngiltere, İrlanda, Danimarka, Norveç gibi 9 Avrupa ülkesinden klinik ve subklinik mastititli ineklerden izole edilen 815 *S. aureus* izolatının 20 farklı antibiyotiğe karşı direncini araştırmışlardır. İskandinav ülkelerinde penisilin direncini düşük tespit etmelerine rağmen (Danimarka %19, Norveç %2, İzlanda %35, İsveç %29, Finlandiya %29, Almanya %25 gibi), ABD (%50), İngiltere (%67) ve İrlanda (%71) gibi ülkelerde penisilin direncini çok yüksek saptamışlardır.

Sabour ve ark. (2004) Kanada da yaptıkları bir çalışmada klinik mastititli hayvanlardan kuru döneme çıkmadan önce süt örnekleri almışlar ve 179 hayvandan 288 *S. aureus* izole etmişlerdir. Antibiyo-mikrobiyal duyarlılık testi sonuçlarına göre %24,5 en az bir antibiyotiğe dirençli tespit edilmiştir. En fazla direnci %9,9 oranında penisiline karşı tespit etmişlerdir. Tilmikosin, eritromisin ve pirlimisin direncini yalnızca %0,9 (2 izolat) olarak bulmuşlardır.

Rajala-Schultz ve ark (2004) inek mastitis vakalarında izole ve identifiye ettikleri 139 stafilokok suşunun çeşitli antibiyotiklere karşı dirençlilik/duyarlılıklarını araştırmışlar %31,7 oranında penisiline, %11,5 oranında tetrasiline, %7,9 oranında da eritromisine direnç belirlemişlerdir.

Mork ve ark. (2005) Norveç'de 332 farklı sürüden 231'i sığır, 82'si koyun ve 60'ı keçiden izole ve identifiye edilen toplam 373 tane *S. aureus* izolatının 13 antibiyotiğe karşı direnç/duyarlılıkları araştırmışlar ve %2,9 oranında penisilin direnci tespit edilirken, sefalotin, enrofloksasin, eritromisin, gentamisin ve oksasiline direnç tespit edilememiştir.

1.7. *S. aureus* izolatlarının epidemiyolojisi

Gerek Veteriner Hekimlik gerekse Tıp alanlarında, epidemiyolojik araştırmaların temel amacı bir patojenin doğadaki yayılma yollarını ve kaynaklarını tam olarak belirleyerek etkili kontrol ve eradikasyon stratejileri geliştirmektir. Hem insan hem de hayvanlarda önemli enfeksiyonlara neden olan *S. aureus*'un çok sayıda susu vardır. Epidemiyolojik araştırmalarda etkenlerin alt tiplendirmelerinin (klonal yakınlıklarının) yapılması gerekmektedir. Klon, farklı coğrafik bölgelerdeki farklı kaynaklardan birbirinden bağımsız olarak ve olasılıkla farklı zamanlarda izole edilen, fakat birbirinin aynı bir çok fenotipik ve genetik özelliğe sahip olduğu için belirli bir orjinleri olduğunu düşündüren suşlar topluluğudur (Derbentli 2002).

Veteriner Hekimlikte sığır mastitislerinin en önemli etkenlerinden biri olan *S. aureus*'un bulaşıcı bir patojen olduğu yıllardır bilinmektedir. *S. aureus*'un ana rezervuarları arasında, infekte meme lobları, meme ve meme başı derileri, sağımda kullanılan her türlü araç gereçler sayılabilir. Ancak *S. aureus*'lar barınak malzemeleri, yemler, ahırda kullanılan araç gereçler, hava, ahırda bulunan diğer hayvan türleri ve bakıcılardan da izole edilebilmektedir (Larsen ve ark. 2000, Zadoks ve ark. 2002).

Tiplendirme metotları, mikroorganizmaların karakteristik özelliklerini tespit etmeye dayanan fenotipik metotlar ve mikroorganizmaların kromozomal ve ekstrakromozomal genetik elementlerin analizine dayanan genotipik metotlar olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır (Kapur ve ark.1995, Arbeit 1999).

Fenotipik metotlar: biyotiplendirme, antimikrobiyal duyarlılık/dirençlilik testleri, serotiplendirme, faj tipi ya da bakteriyosin tipi, elektroforetik protein tiplendirme olarak sıralanabilir (Derbentli 2002, Arbeit 1999).

Antibiyotik duyarlılık/dirençlilik profil analizi (antibiyogram), laboratuarlarda en çok kullanılan, ucuz, uygulanması kolay, hızlı ve ekonomik bir metottur. Fakat ayırım gücü yeterli değildir. *S. aureus*'ların tiplendirilmesi için kullanılan diğer bir

fenotipik metot ise faj tiplendirmesidir (Bannerman ve ark. 1995, Foster 2003). Stafilokok faj tiplendirmesi, Uluslararası Alt Komitenin (ICT)'nin bildirdiği şekilde pek çok laboratuvarında yıllardır uygulanmaktadır. Suşlar tiplendirilebildiğinde teknik hızlı, kolay ve ayırcılığı yüksektir. Ancak bu yöntemde tiplendirilemeyen pek çok suş söz konusu olmakta, özellikle MRSA'larda bu yöntemin kullanımı sınırlı olmaktadır (Bannerman ve ark. 1995, Gialluly ve ark. 2003).

Genotipik yöntemler, fenotipik metotlara göre tiplendirilebilirlik, tekrarlanabilirlik ve ayırım gücü bakımından daha üstün metotlardır. Genotipik tiplendirme metotları, plazmid profil analizleri, kromozomal DNA'nın restriksiyon endonükleaz analizi, Random Fragment Length Polymorphism- PCR (RFLP-PCR), Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD-PCR) ve Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) olarak sıralanabilir. Bu tekniklerin hepsinin ayırım gücü, tekrarlanabilirlik ve tiplendirilebilirliklerine göre avantajları ve dezavantajları vardır (Tenover ve ark. 1995, Weller 2000, Sancak ve Günalp 2001, Aslantaş ve ark.2006).

Plazmidler, antibiyotiklere karşı direnç genleri ve virülens faktörlerini taşıyan sirküler yapıda ekstrakromozomal genetik materyallerdir. Türler arasında plazmid değişiminin çok fazla olduğu, insan patojenlerinin genetik değişiminin anlaşılmasını sağlamada önemlidir. Stafilokoklarda bulunan bazı plazmidlerin, gram pozitif diğer bakteri cinslerinde de bulunduğu bildirilmektedir (Ito ve ark. 2003).

Stafilokok plazmidleri küçük, multiresistant ve konjugatif olmak üzere üç ana grup altında sınıflandırılmıştır (Tablo 1 2.). Sınıf I küçük stafilokok plazmidleri 1-10 kb büyüklüğünde, çift sarmallı DNA yapısındadır. Bu plazmidlerin 15-60 kopyası bulunur ve genellikle bilinmeyen fenotipik özellikleri veya yalnızca bir direnç geni taşırlar. Sınıf II multiresistance plasmidleri, 15-40 kb büyüklüğündedir ve yaklaşık 4-6 kopyası bulunmaktadır. Sınıf II plazmidler üzerinde β -laktamaz kodlayan gen (*blaZ*) ve çoğul dirençlilik genleri bulunmaktadır. Sınıf III plazmidler 30-60 kb

Tablo 1.2. Stafilokoların plazmidleri (Skurray and Firth 1997).

Tip/aile/plazmid	Determinant	Büyüklik (kb)
Küçük		
pT181	<i>tetA(K)</i>	4,4
pC221	<i>cat</i>	4,6
pS194	<i>str</i>	4,5
pC194	<i>cat</i>	2,9
pSK89	<i>smr</i>	2,4
pSK108	<i>smr</i>	2,4
pUB110	<i>aadD, ble</i>	4,5
pSN2	-	1,3
pSK3	-	1,3
pE194	<i>ermC</i>	3,7
pSK639	<i>dfrA</i>	8,0
pSK697	<i>dfrA, smr</i>	11,0
pSK818	<i>dfrA, tetA(K)</i>	13,0
Çoğuldirençli		
β-laktamaz ailesi		
pI524(α)	<i>arsBC, blaZ, cadA, merAB</i>	31,8
pII147(β)	<i>arsBC, blaZ, cadA, cadB, merAB</i>	32,6
pI258(γ)	<i>arsBC, blaZ, cadA, ermB, merAB</i>	28,2
pSK23(α/ β)	<i>aacA-aphD, cadA, merAB, qacB</i>	38,0
pSK(α/ γ)	<i>blaZ, cadA, merAB, qacA</i>	28,8
pSK1 ailesi		
pSK1	<i>aacA-aphD, drfA, qacA</i>	28,4
pSK4	<i>aacA-aphD, blaZ, drfA, qacA</i>	35,1
pSK18	<i>qacA</i>	18,9
Sınıflandırılmamış		
pIP630	<i>vat, vga, vgb</i>	22,7
pUL5050	<i>msrA, blaZ, tet</i>	31,5
Konjugatif		
pSK41 ailesi		
pCRG1600	<i>aacA-aphD, aadD, blaZ, smr</i>	52,9
pGO1	<i>aacA-aphD, aadD, drfA, smr</i>	52,0
pGO400	<i>mupA</i>	34,0
pJE1	<i>aacA-aphD, aadD, drfA, smr</i>	50,0
pSK41	<i>aacA-aphD, aadD, smr</i>	47,8
pUW3626	<i>aacA-aphD, aadD, blaZ, smr</i>	54,4
Sınıflandırılmamış		
pIP1156	<i>vatB, drfA, blaZ, linA</i>	60,0
pJ3358	<i>tetA(K), mupA</i>	34,2

tetA(K): tetrasiklin, *cat*: kloramfenikol, *str*: streptomisin, *smr*: organik katyonlar, *aadD*: neomisin-kanamisin, *ble*: bleomisin, *ermC*: makrolid-linkozamid-streptogramin, *dfrA*: trimetoprim, *arsBC*: arsenit/arsenat, *blaZ*: penisilin, *cadA*: kadmiyum/çinko, *merAB*: civa, *aacA-aphD*: gentamisin-tetrasiklin-kanamisin, *qacB*: organik katyonlar, *vat*: streptogramin *vga*: streptogramin, *vgb*: streptogramin, *msrA*: makrolid-streptogramin, *mupA*: mupirosin, *linA*: linkomisin.

büyükliğinde konjugatif plazmidlerdir. Bazı direnç genlerini ve konjugatif transfer (*tra*) determinantlarını taşırlar. Konjugatif plazmidler stafilokoklar arasında meydana gelen konjugasyonla sadece kendilerini aktarmazlar aynı zamanda küçük hareketli plazmidleri de aktarırlar. Selektif antibiyotik baskısı nedeniyle, direnç determinantları bir suşdan başka bir suşa geçebilmektedir, konjugasyon, faj aracılı transdüksiyon ve

henüz bilinmeyen mekanizmalarla tür bariyeri aşılabilmektedir ve bu durum stafilocoklar arasında antibiyotik direncinin yaygınlığıyla sonuçlanmaktadır. VanA gen kompleksini taşıyan bir transpozonun *S. aureus*'a son katkısı, antibiyotiklerin selektif baskısı sonucu vankomisin dirençli enterokoktan (VRE) *S. aureus*'a genetik transfer aracılığıyla oluşmuştur (Skurray and Firth 1997).

Plazmid profil analizi epidemiyolojik çalışmalarda DNA'ya dayalı yapılan ilk tiplendirme metodlarından biridir. Yine MRSA'ların epidemiyolojik araştırmaları için kullanılan ilk moleküler teknik plazmid analizidir. Bu alanda plazmid analizi yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. İncelenen bakterinin plazmid ekstraksiyonu yapıldıktan sonra agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutulur. İzolatların taşıdıkları plazmid sayısı ve büyüklükleri belirlenerek suşlar birbirinden ayrılabilir (Weller 2000, Arbeit 1999).

Plazmid analizi, suşların ayırımında ve salgınların tanımlanmasında fenotipik tiplendirme metodlarından daha iyi sonuçlar vermektedir. Plazmid analizi, hızlı ve tekrarlanabilirlik özelliklerine sahiptir. Ayrıca plazmid analizinde pek çok suş çalışılabilir (Kozarsky ve ark. 1986). Ancak plazmid analizinin bazı dezavantajları bulunmaktadır. Plazmidlerin bakteriler tarafından kolaylıkla kaybedilmesi veya kazanılması ve her izolatın plazmid taşıması gibi nedenlerle bazı izolatlar tiplendirilememektedir (Weller 2000, Foster 2003).

Stafilocokların çoğunda çok sayıda plazmid bulunmaktadır. Bunlardan bazıları farklı türler arasında konjugasyonla aktarılabilir. Konjugasyonla plazmid aktarımı, antibiyotik direnç determinantlarının aktarılmasında, özellikle de aminoglikozid ve beta-laktam direnci için oldukça önemlidir. Koagülaz negatif stafilocoklarda, plazmidten kromozoma veya transpozonlar ve plazmidler arasında direnç genleri aktarılabilir (Huebner ve Goldman 1999).

Baumgartner ve ark.'nın(1984) İsviçre'de *S. aureus* mastitislerinin epidemiyolojik analizi için *S. aureus* izolatlarının plazmid profillerini incelenmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre iki veya beş farklı tipte *S. aureus* izole etmişlerdir.

Albay ve ark. (1999) Gülhane Askeri Tıp Akademisinde yaptıkları bir çalışmada hastanede yatan hastalardan izole ve identifiye edilen 14 MRSA izolatının plazmid profillerini incelemişler ve elde ettikleri sonuçlara göre 14 suşun, 13 tanesinde 1,1-13 kb arasında değişen üç adet plazmid saptamışlardır.

Lange ve ark. (1999) Brezilya’ da mastitisli ineklerden izole edilen 66 *S. aureus* suşunun plazmid profil analizini yapmışlardır. Çalışmada 27 farklı plazmid profili tanımlanmıştır. Suşların 2-50 kb arasında değişen boyutlarda ve 1-5 arasında değişen sayıda plazmid taşıdığını ve 31 izolatın ise hiç plazmid taşımadığını tespit edilmiştir. Plazmid taşımayan suşların çoğunun incelenen bütün antibiyotiklere duyarlı olduğunu belirterek, direnç genlerinin plazmid ile taşındığını desteklemişlerdir.

Sancak ve Günalp (2001) Hacettepe Tıp Fakültesinde yaptıkları çalışmada hastanede yatan hastalardan izole ettikleri MRSA suşlarının, kantitatif antibiyogram testi ve plazmid profil analizi yöntemiyle epidemiyolojik olarak tiplendirmesini yapmışlardır. Plazmid analizi sonucunda 15 plazmid paterni elde edilmiş ve bunlar P1, P2;..., P15 olarak gruplandırılmıştır.

Piccinini ve Zecconi (2001) İtalya’da 21 süt sığırcılığı işletmesindeki mastitisli ineklerden izole ve identifiye ettikleri *S. aureus* izolatlarının plazmid varlığı ve dağılımını incelemişlerdir. Elde edilen verilere göre, izolatlarda büyüklükleri 23kb-872bp arasında değişen dokuz farklı plazmid belirlemişlerdir. İzolatların %96,4 (293)’ünde bir veya daha fazla plazmid tespit etmişler sadece 11 izolatta plazmid belirlemişlerdir.

İspanya’da Goni ve ark. (2004) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada koyun ve tavşan orjinli 50 *S. aureus* izolatının plazmid profil analizi yapılmış ve yalnızca iki koyun izolatında plazmid varlığı belirlenmiştir. Bu suşlardan birinde büyüklükleri 3-11 kb arasında değişen 6 plazmid belirlenmiştir. Tavşan orjinli 8

izolatta 11kb ve altında değişen büyüklükte iki ile beş arasında değişen sayıda plazmid belirlemişlerdir.

Aslantaş ve ark.'ı (2006) Hatay bölgesindeki subklinik inek mastitislerinden izole edilen 50 *S. aureus* izolatının plazmid profilini incelenmişler elde edilen verilere göre suşların % 94'ünde çeşitli sayıda ve büyüklükte plazmid tespit etmişlerdir. Çeşitli antibiyotiklere dirençli suşların çoğunda plazmid izole etmişlerdir.

Pulsed-Field Jel Elektroforez tekniği (PFGE) hem insan hem de hayvanlar için önemli bir patojen olan *S. aureus*'ların tiplendirilmesinde kullanılan genetik metotlardan biridir. Schwartz ve Cantor tarafından 1984'te geliştirilmiş olan PFGE yöntemi agaroz jel elektroforezinin bir varyasyonudur. PFGE, ayırım gücü yüksek, tekrarlanabilirliği olan, güvenilir bir metottur. Bu nedenle, *S. aureus* izolatlarının tiplendirilmesinde tercih edilen bir sistem haline gelmiştir ve günümüzde moleküler tiplendirme yöntemleri içinde "altın standart" olarak kabul edilmektedir (Lange ve ark. 1999, Zadoks ve ark. 2000).

Bu metotta diğerlerinden farklı olarak suşlar eritilmiş agaroz ile karıştırılır bir deterjan-enzim karışımı ile lizise uğratılır ve restriksiyon enzimleri ile kesilir. Daha sonra agaroz jelde pulsed-field elektroforez uygulanır. Aynı bakteri türünün farklı izolatlarında bulunan genetik farklılıklar nedeniyle restriksiyon enzimleri ile kesilen bölgelerde farklı olmaktadır. Bu teknik ile bakteri genomunun tümünün bir modeli çıkartılmaktadır. Bütün bakteri türleri PFGE ile tiplendirilebilmektedir. *S. aureus*, vankomisin dirençli enterokoklar, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp*, *Acinetobacter spp*, *P. aeruginosa* ve *Mycobacterium spp*'nin, çeşitli virusların ve protozoonların epidemiyolojisinin incelenmesinde bu yöntem başarı ile uygulanmaktadır (Tenover ve ark. 1995, Zadoks ve ark. 2002, Derbentli 2002).

PFGE metotunda daha az sayıda ve daha uzun fragmentler oluşturan restriksiyon enzimlerin kullanılması, daha uzun fragmentlerin oluşmasını sağlayan enzimler doğal olarak kromozom üzerinde daha az sıklıkta bulunan bölgeleri tanırlar

ve genomu bu bölgelerden keserler. Böylece 0,5- 50 kb arasında yüzlerce fragment oluşacağına 10- 800 kb uzunluğunda 5- 20 arasında değişen sayıda fragment oluşmaktadır. Elde edilen DNA fragmentleri, elektroforez işlemi sırasında, konvansiyonel tekniklerde kullanılan agaroz jelin eleme etkisi nedeniyle ekarte edilmektedir. Konvansiyonel metotlarda DNA fragmentleri düz bir doğrultuda katottan anota doğru hareket ederken, PFGE’de elektrik akımının yönü kısa zaman aralıklarla periyodik olarak (“pulsed”) sürekli değişmektedir (Weller 2000).

Bu metotta diğerlerinden farklı olarak suşlar eritilmiş agaroz ile karıştırılır bir deterjan-enzim karışımı ile lizise uğrattılır ve restriksiyon enzimleri ile kesilir. Daha sonra agaroz jelde pulsed-field elektroforez uygulanır. Aynı bakteri türünün farklı izolatlarında bulunan genetik farklılıklar nedeniyle restriksiyon enzimleri ile kesilen bölgelerde farklı olmaktadır. Bu teknik ile bakteri genomunun tümünün bir modeli çıkartılmaktadır. Bütün bakteri türleri PFGE ile tiplendirilebilmektedir. (Lange ve ark. 1999, Zadoks ve ark. 2000).

Elde edilen DNA bantlarındaki farklılıklara ya da benzerliklere göre izolatların epidemiyolojik ilişkileri yorumlanmaktadır. Önceleri iki izolat, arasında tek bir restriksiyon parçasının bile farklı olması durumunda ayrı genotipler olarak kabul edilmekteydi (Prevost ve ark. 1992). Ancak son yıllarda Tenover ve ark. (1995) önerdiği yorum kriterleri kullanılmaktadır. Bu kriterlere göre; aynı sayı ve büyüklükte bantlara sahip izolatlar “ayırtdilemez” olarak, üç banda kadar farklılık gösteren izolatlar “yakın ilişkili” olarak, dört-altı band arası fark gösteren izolatlar “muhtemelen ilişkili” olarak, yedi ve üzeri band arasında farklılık bulunan izolatlar “ilişkisiz” olarak kabul edilmektedirler.

Seguin ve ark. (1999) Amerika’da yaptıkları bir çalışmada 11 hasta attan nazokomiyal epidemiyeye neden olan MRSA suşları izole etmişler ve bu suşlar ile personelden izole ve identifiye edilen MRSA izolatlarının benzerliğini PFGE metodu ile araştırmışlardır.

Annemüeller ve ark. (1999) Almanya'da 6 farklı çiftlikte bulunana mastitisli ineklerden izole ve tanımladıkları 25 *S. aureus* izolatının genetik yakınlığını PFGE metodu ile belirlemişler ve 5 farklı restriksiyon paterni belirlemişlerdir.

Stephan ve ark. (2001) İsviçre'de 34 farklı çiftlikten mastitisli ineklerden izole ve tanımladıkları 34 *S. aureus* izolatının PFGE metodu ile genetik yakınlıklarını incelemişler ve elde edilen sonuçlara göre *S. aureus* izolatlarını 11 farklı patere ayırmışlardır.

Zadoks ve ark. (2002) Amerika'da 43 farklı sürüdeki inek meme başı derisi (n:70), sağım makinası (n:4), sığır sütleri (n:117) ve bakıcıların ellerinden (n:4) izole ve tanımladıkları toplam 225 *S. aureus* izolatını PFGE ile tiplendirmişler, izolatların *SmaI* restriksiyon enzimi ile kesilen genomik DNA'larındaki farklılıklara göre 24 ana ve 17 alttipe ayırmışlardır.

Vautor ve ark. (2003) Fransa'da 10 koyun çiftliğinden izole ve tanımladıkları 179 *S. aureus* izolatını PFGE ile tiplendirmişler ve 24 pulstip belirlemişlerdir.

Sabour ve ark. (2004) Kanada'da 58 süt sığırcılığı işletmesinden izole ettikleri 288 *S. aureus* izolatın *SmaI* enzimi ile makrorestriksiyon analizini yapmışlar ve izolatları 6 ana kümeye 29 pulstipe ayırmışlardır.

Goni ve ark. (2004) İspanya'da koyun ve tavşan çiftliklerindeki mastitisli tavşan ve koyunlardan izole ve tanımladıkları 50 *S. aureus* izolatının PFGE ile klonal yakınlıkları incelenmişler ve elde edilen sonuçlara göre 50 *S. aureus* izolatı %80 benzerlikle 18, %90 benzerlikle 33 ve %95 benzerlikle 37 tipe ayrılmıştır.

Haveri ve ark. (2005b) Finlandiya’da yaptıkları çalışmada 70 süt ineği işletmesinden topladıkları 217 *S. aureus* izolatının PFGE metodu ile tiplendirmişler ve 22 farklı pulstotip belirlemişlerdir.

Bu çalışmanın amacı, *S. aureus*’un ülkemizdeki epidemiyolojisine katkıda bulunmak için süt sığırcılığı işletmelerindeki mastitisli ineklerin sütlerinden, memebaşı derilerinden ve inek bakıcılarından izole ve identifiye edilen *S. aureus* suşlarının çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılık/dirençlilik profillerini (Minimum İnhibitör Konsantrasyonlarını MIK) belirlemek, plazmid profil ve Pulsed Field Gel Elektroferez (PFGE) tekniği ile klonal yakınlıklarını saptamaktır.

Türkiye’de Veteriner Hekimlik alanında PFGE yönteminden yararlanılarak mikroorganizmalarda klonal yakınlıkların incelenmesi konusunda bugüne kadar herhangi bir çalışma gerçekleştirilmemiştir. Kırıkkale ili ve çevresindeki süt sığırcılığı işletmelerindeki mastitisli ineklerin sütlerinden, meme başı derilerinden ve burun mukozalarından izole ve identifiye edilen *S. aureus* izolatları ile bu işletmelerdeki bakıcıların burun ve ellerinden izole ve identifiye edilen *S. aureus* izolatlarının PFGE yöntemiyle gerçekleştirilen moleküler tiplendirme çalışmaları ülkemizde bu alanda ilk çalışma niteliğindedir. Bu konudaki çalışmalar farklı bölgelerde de gerçekleştirilerek gerek insan gerek veteriner hekimlik alanında önemli hastalıklar ve ekonomik kayıplara neden olan *S. aureus*’un moleküler epidemiyolojisinin açıklanmasına ve söz konusu etkenin insan ve hayvanlarda neden olduğu hastalıkların tedavi ve kontrolüne önemli katkı sağlayacaktır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Kırıkkale ili ve çevresinde bulunan 14 adet küçük ölçekli (1- 9 baş sağmal inek) ve 6 adet orta ölçekli (10 ve 30 baş sağmal inek) süt sığırcılığı işletmesi Nisan 2005 - Ocak 2006 tarihleri arasında ziyaret edildi. Değişik ırk ve yaşlarda laktasyonun çeşitli dönemlerinde bulunan 109 sağmal ineğin burun mukozalarından, meme başı derilerinden ve bu işletmelerde bulunan 21 hayvan bakıcısının el ve burunlarından sürüntü örnekleri alındı. Ayrıca deri ve burun sürüntü örnekleri alınan ineklerden süt örnekleri de alındı.

Alınan 1167 örnekten stafilocok türlerinin izolasyonu ve identifikasyonu yapıldı. İzole ve identifiye edilen *S. aureus* izolatlarının çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıkları E-test metodu ile belirlendi.

Örneklerden izole ve identifiye edilen 96 adet *S. aureus* izolatının plazmid profil analizi ve Pulsed-Field Gel Electrophores (PFGE) metodu ile moleküler tiplendirilmeleri yapıldı.

2.1. Örneklerin alınması

Meme başı derisinden sürüntü örneği alınmasından önce usulüne uygun olarak ılık temiz su ile ineklerin meme başları iyice yıkandı ve kurulandı. Her ineğin dört meme başı derisinden ayrı ayrı Cary-Blair transport besiyeri içeren eküvyonlar ile sürüntü örnekleri alındı. Ayrıca bu ineklerin sağ ve sol burun mukozalarından da Cary-Blair transport besiyeri içeren eküvyonlar ile sürüntü örnekleri alındı. Daha sonra ineklerin meme başı derisi %70'lik alkol ve bez yardımıyla iyice silindikten sonra, her meme lobundan 2-3 defa dışarıya sağım yapıldı ve California Mastitis Test (CMT) uygulandı. Hem CMT pozitif hem de CMT negatif meme loblarından stafilocok izolasyonu için steril cam tüplere 10 ml süt örnekleri alındı. Örnekler soğuk şartlar altında en kısa sürede laboratuara getirildi.

İşletmelerde bulunan bakıcıların sağ ve sol burun mukozalarından Cary-Blair transport besiyeri içeren eküvyonlar ile burun mukozasından sürüntü örnekleri alındı. Yine aynı insanların sağ ve sol el derilerinden de eküvyonlarla sürüntü örnekleri alındı.

Stafilokok izolasyonu için kullanılan materyallerin kökeni ve sayıları Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2. 1. Stafilocok izolasyonu için kullanılan örneklerin kökenleri ve sayıları

Köken	Türü	Materyal sayısı
İnek	Meme başı deri sürüntüsü	436
	Burun sürüntüsü	218
	Süt	429*
Bakıcı	El sürüntüsü	42
	Burun sürüntüsü	42
Genel		1167

* : 6 baş ineğe ait 7 meme lobu kör olduğundan bu loblardan süt örneği alınmamıştır.

2.2. İzolasyon ve tanımlama çalışmaları

2.2.1. Besiyerleri

Stafilokok izolatlarının izolasyon ve tanımlama çalışmalarında, %5 koyun kanı ile zenginleştirilmiş Kanlı Agar (Oxoid-İngiltere), ‘‘Staphylococcus Medium 110 Agar’’ (Oxoid-İngiltere), ‘‘Tryptic Soy Agar’’ (Merc-Almanya), ‘‘Trypticase Soy Broth’’ (Merc-Almanya) besi yerleri kullanıldı. Besi yerleri üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlandı. Hazırlanan besi yerleri sterilite kontrolü için bir gece 37 °C de bekletildikten sonra kullanılmaya kadar + 4 °C de saklandı.

E-test yöntemi için üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlanan Mueller-Hinton Agar (Merc-Almanya) 15 cm çapındaki petrilere kalınlığı 4mm olacak şekilde döküldü. Hazırlanan besi yerleri sterilite kontrolü için bir gece 37 °C de bekletildikten sonra kullanılmaya kadar + 4 °C de saklandı.

2. 2. 2. Stafilocokların izolasyonu ve tanımlanması

Laboratuvara getirilen süt örnekleri vorteks ile karıştırıldıktan sonra %5 Koyun Kanlı agara 0.01µl miktarında ekimleri yapıldı ve 37 C° 24- 48 saat aerobik atmosferde inkübasyona bırakıldı. Üreyen koloniler morfolojileri ve hemoliz özelliklerine göre değerlendirildi. Yuvarlak, kenarlı ve üzeri düzgün 1-2 mm çapında beyaz, gri veya sarı renkli koloniler stafilocok şüpheli olarak değerlendirildi ve iğne uçlu ze ile % 5 koyun kanlı agara pasajlanarak saflaştırıldı.

İneklerin meme başı derisi ve burun mukozası ile bakıcıların el ve burun mukozası sürüntü örneklerinin stafilocokların izolasyonu için selektif bir agar olan ‘‘Staphylococcus Medium 110 agar’’a ekimleri yapıldı ve 35 °C de 18 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda yuvarlak, üzeri pürüzsüz, 1-2 mm çapında sarı, krem veya beyaz koloniler stafilocok olarak değerlendirildi. İğne uçlu ze ile % 5 koyun kanlı agara pasajlanarak saflaştırıldı.

Kanlı agarda üreyen kolonilerin morfolojileri, Gram boyanma özellikleri, koyun eritrositleri üzerinde hemoliz oluşturma özellikleri değerlendirildi. Stafilocokların, streptokoklardan ve mikrokoklardan ayrımı için katalaz ve modifiye oksidaz testi yapıldı (Faller ve Schleifer 1981, Baron ve ark. 1994, Quinn ve ark. 2000).

2. 2. 2. 1. Katalaz testi

Katalaz testi Baron ve ark. göre (1994) gerçekleştirildi. Saf olarak Tryptic Soy Agar da üretilmiş 24 saatlik kültürden temiz bir lam üzerine ze yardımıyla aktarıldı. Bir damla %3 ‘lk hidrojen peroksit lamın üzerine damlatıldı. Gaz ıkışı pozitif olarak değerlendirildi.

2. 2. 2. 2. Modifiye oksidaz testi

Bu test Faller ve Schleifer (1981)'e göre gerçekleştirildi. Bu test stafilocoklar ile mikrokokların ayırımı için yapıldı. Tryptic Soy Agar da üreyen 24 saatlik kolonilerden steril eküvyon yardımıyla alınıp temiz bir filtre kağıdı üzerine sürüldü. Daha sonra filtre kağıdı üzerindeki bakteriye bir damla modifiye oksidaz solüsyonu %6'lık tetrametilfenilendiamin damlatıldı. İki dakika içerisinde kolonilerin koyu mavi renge dönüşmesi pozitif olarak değerlendirildi. Mikrokoklarda renk değişimi oluşurken stafilocok suşlarında renk değişimi oluşmamaktadır. Modifiye oksidaz testinde pozitif kontrol olarak *Micrococcus luteus* ve negatif kontrol olarak da *S. aureus* ATCC 25923 suşu kullanıldı.

2. 2. 2. 3. Tüp koagülaz testi

Stafilocok olarak tanımlanan suşların koagülaz aktivitelerinin belirlenmesi için tüp koagülaz testi Baron ve ark. (1994)'na göre gerçekleştirildi. Tüp koagülaz testi için EDTA'lı tavşan plazması kullanıldı. Tavşan plazmaları taze olarak elde edildi ve 1/5 oranında sulandırıldı. Sulandırılma işleminden sonra 13x100 mm'lik cam tüplere 0.5 ml miktarında paylaştırıldı. Bakterilerin saf ve taze kültürlerinden öze yardımıyla alınan koloniler hafif eğik tutulmuş tüplerde, tüpün yan duvarında plazma ile homojenize edildi. Daha sonra tüpler dik bir şekilde 37°C de inkübe edildi ve 1., 2., 4. ve 24. saatlerde kontrol edildi. Tüpler hafif şekilde çalkalanınca bir jel oluşumu veya pıhtının dağılmaması test edilen bakterilerde koagülaz enziminin varlığını gösterdi ve pozitif olarak değerlendirildi. Tüp koagülaz testinde pozitif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 25923 ve negatif kontrol olarak da *Staphylococcus epidermidis* suşu kullanıldı.

S. aureus'un tüp koagülaz testi pozitif olan *S. intermedius* ve *S. hyicus* türlerinden ayırımı Roberson ve ark. (1992)'na göre aseton ve mannitolün anaerobik kullanımı testi yapılarak gerçekleştirildi. Tüp koagülaz ve aseton testi pozitif olan ve mannitol şekerini hem aerobik hem de anaerobik kullanan suşlar *S. aureus* olarak tanımlandı.

2. 2. 2. 4. Voges-Proskauer deneyi (Asetoin testi)

Voges Proskauer testi Ruoff ve Ferraro (1986)'e göre gerçekleştirildi. Küçük tüplere hazırlanan 1ml MR/VP besi yerine ekilen bakteriler 35 °C de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kültür süspansiyonun üzerine önce 0.6 ml alfa naftol ayırıcından ve hemen arkasından 0.2 ml % 40'lık KOH ayırıcından damlatıldı. Besi yerinin hava ile temas etmesi için çalkalandı ve dik olarak 10- 15 dakika bekletildi. Bu süre sonunda kırmızı rengin oluşması bakterilerin asetoin oluşturmuş oldukları şeklinde değerlendirildi. Voges Proskauer testinde pozitif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 25923 suşu kullanıldı.

2. 2. 2. 5. Mannitolün anaerobik kullanımı

Mannitolün anaerobik kullanımı testi, Facklam (1971)'a göre gerçekleştirildi. %1 Mannitol ve Brom Creosol Purple indikatörü içeren "Heart Infusion Broth" hazırlandı ve 5 ml olacak şekilde tüplere paylaştırıldı. Bu tüpler otoklav edilerek steril edildi ve kullanılabildi kadar buzdolabında saklandı. Koagülaz pozitif stafilocokların 24 saatlik taze kültürlerinden mannitol içeren besi yerlerinin iki tanesine ekim yapıldı. Tüplerden biri 2 cm kalınlığında steril sıvı parafinle kapatılarak 37 °C de 3-10 gün inkübe edildi. Besi yerinin mor renginin sarıya dönüşmesi pozitif olarak kabul edildi. Pozitif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 25923 suşu ve negatif kontrol olarak da *Staphylococcus epidermidis* suşu kullanıldı.

S. aureus olarak tanımlanan stafilocoklar dışındaki tüm stafilocok suşlarının identifikasyonu için BD BBL Crystal™ Identification Systems Gram-Positive ID Kit (Becton Dickinson- ABD) kullanıldı. Üretici firmanın bildirdiği şekilde saf olarak üremiş 24 saatlik bakteri kültüründen hazırlanan 0,5 Mac Farland bulanıklığındaki bakteri süspansiyonu kit paneline hava kabarcığı oluşturulmadan dökülüp, kapağı dikkatli bir şekilde kapatıldı. Panel 35-37 °C de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda panel BBL Crytal Panel Okuyucu (Becton Dickinson- ABD) da

değerlendirilip, sonuçlar BBL Crytal bilgisayar yazılımına (Becton Dickinson- ABD) girilerek bakteri tanımlanması yapıldı.

Tanımlanan stafilokok izolatları, diğer testler yapılana kadar stok besi yeri içerisinde (Trypticase Soy Broth + %20 Gliserol) -20 °C de saklandı.

2. 3. Antibiyotik duyarlılık testleri

İzole edilen *S. aureus* izolatlarının direnç profilleri E-test metodu ile belirlendi.

İzolatların metisiline direncini tespit etmek için E-test metodundan önce Disk Difüzyon yöntemi ve Oksasilin tarama plakları kullanıldı.

Disk difüzyon yönteminde metisilin disklerinin kullanılması hatalı duyarlı sonuçların alınmasına neden olabileceği için saklama sırasında daha dayanıklı ve daha güvenilir olan oksasilin ve sefoksitin disklerinin kullanılması tavsiye edilmektedir. Bu nedenle metisilin direncinin tespiti için 1µg'lık oksasilin ve 30µg'lık sefoksitin diskleri ile Kirby-Bauer metodu kullanıldı (CLSI, 2002).

Oksasilinli tarama plakları, metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA)'ların tespiti için kullanılan bir metottur. Stafilokoklar, NaCl (%4 w/v; 0,68 mol/L) ve 6 µg oksasilin/ml içeren Mueller-Hinton agara inokule edildi. Bakteri suşları Mc Farland 0,5'e göre sulandırıldıktan sonra agarın yüzeyine steril sıvap yardımıyla ekildi ve 37 °C de 24 saat inkübe edildi. Ekim alanında bir koloninin bile üremiş olması, test edilen bakteri suşunun oksasiline dirençli olduğunu göstermektedir (CLSI, 2002).

Stok besi yerinde -20 °C de saklanan bakteriler oda ısısında çözüldükten sonra bir öze dolusu alınarak %5 Koyun Kanlı agara ekildi ve 35 °C de 24 saat inkübe edildi. Saf olarak üreyen bakteri kolonilerinden bir iki koloni öze yardımıyla alınarak steril 2ml fizyolojik su içeren tüplerde 0,5 Mc Farland bulanıklığına ayarlandı. 0,5 Mc Farland bulanıklığındaki bakteri süspansiyonundan steril eküvyon yardımıyla, 15cm

çapında petrilere 4mm kalınlığında olacak şekilde hazırlanan Mueller Hinton Agar besi yerinin yüzeyine uygun şekilde yayıldı. Penisilin G, sefalotin, eritromisin, gentamisin, enrofloksasin, tetrasiklin, trimetoprim-sulfametoksazol, rifampin, oksasilin, vankomisin, linezolid antibiyotiklerinin E- test stripleri (AB-Biodisk- Sweden) agar yüzeyine uygun aralıklarla yerleştirildi ve petrilere 35°C de bir gece inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda bakteri üremesinin inhibe olduğu yerdeki MİK değerleri kayıt edildi ve sonuçlar Klinik Laboratuvar Standartlar Enstitüsü'nün (Clinical Laboratory Standart Institute (CLSI)) standart sınır değerleri dikkate alınarak yorumlandı. Test kontrolü olarak *S. aureus* ATCC 29213 suşu kullanıldı.

2. 4. Plazmid profil analizi

İzole edilen 96 adet *S. aureus* izolatının plazmid analizi yapıldı. Plazmid DNA izolasyonu Şener ve ark. (2004) göre yapıldı.

2. 4. 1. Plazmid DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler

Ethidiyum Bromid (Sigma-Almanya):	10 mg/ml (steril distile su içinde)
Lizostafin (Sigma-Almanya):	1 mg/ml (steril distile su içinde)
Lizozim (Sigma-Almanya):	100 mg/ml (steril distile su içinde)
Ribonükleaz A (Sigma-Almanya):	10 mg/ml (steril distile su içinde)
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (Sigma-Almanya):	%10 (Steril distile su içinde-w/v)
10X TBE:	
Tris (Sigma-Almanya)	108 g/lt
Borik asid (Sigma-Almanya)	55 g/lt
EDTA (Sigma-Almanya)	20 ml/lt [0,5 M (pH: 8,0)]
NaCl-EDTA: NaCl (Merk-ABD)	2,5 M
EDTA (Sigma-Almanya)	50 mM (pH:7,5)
Yükleme tamponu:	
Sukroz (Sigma-Almanya):	%40 (distile su içinde , w/v)
Orange-G (Sigma-Almanya):	% 0,25 (w/v)

2. 4. 2. Plazmid DNA izolasyonu

İzole edildikten sonra $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ de stok besi yerinde saklanan *S. aureus* suşları oda ısısında çözüldükten sonra bir öze yardımıyla Mueller Hinton Agara (MHA) ekildi ve $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 24 saat inkübe edildi. MHA'da saf olarak üreyen bakterilerden iğne uçlu öze yardımıyla bir-iki koloni alınarak 3 ml Tripticase Soy Broth (TSB) besiyeri içeren tüplere ekimleri yapıldı. Tüpler, bir gece yatay çalkalayıcıda 200 rpm hızda çalkalanarak 37°C 'de aerobik şartlarda inkübe edildi. Üreyen taze bakteri süspansiyonundan 1 ml alınarak, 1 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı ve 6000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj (Eppendorf Centrifuge 5417R- Almanya) edildi. Santrifüj işleminden sonra üst sıvı atıldı. Santrifüj tüpünün dibinde kalan pelet üzerine 50 µl lizostafin (Sigma-Almanya), 30 µl lizozim (Sigma-Almanya), 25 µl ribonükleazA (Sigma- Almanya) ve 295 µl NaCL-EDTA (NaCl Merk-ABD - EDTA Sigma-Almanya) çözeltisinden eklenerek karıştırıldı. Bakteri ve enzim karışımı $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra aynı tüpe 400 µl %10'luk Sodium Dodesil Sülfat (SDS) (Sigma-Almanya) ilave edilerek birkaç kez alt-üst edildi. Karıştırma işleminden sonra 14000 rpm 'de 10 dakika santrifüj edildi ve plazmid analizi için üst sıvıdan 300 µl alınarak yeni bir santrifüj tüpüne aktarıldı. Plazmid profil analizi için % 0,8'lik agaroz (Sigma-Almanya) içeren jel hazırlandı. Tartılan agaroz 0,5X TBE tamponuyla eritildikten sonra içerisine 0,5 µg/ml miktarında Ethidiyum Bromid (Sigma-Almanya) katılarak hazırlandı. Hazırlanan jelin orta kuyucuğuna 2067-16210 bp'lik marker (Sigma-Almanya) diğer kuyucuklara ise 20 µl plazmid DNA içeren çözelti eşit miktarda yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra yüklendi. Jel, elektroforez tankı ve güç kaynağı (Mini Sub Cell GT System/BioRad-ABD) kullanılarak 90 voltta 3 saat elektroforeze tabi tutuldu. Elektroforezden sonra plazmid bant görüntüleri, UV ışık altında GelDoc görüntüleme sistemi (GelDoc/BioRad-ABD) yardımıyla bilgisayar ortamına aktarılarak değerlendirildi.

2. 5. Pulsed- Field Gel Electrophores (PFGE) Analizi

S. aureus (96 adet) izolatlarının klonal yakınlıklarını belirlemek için Lencastre ve ark. (1994) göre PFGE ile analizleri gerçekleştirildi

2. 5. 1. PFGE'de kullanılan çözeltiler

1 M Tris pH 8

121,1 gr Trizma Base (Sigma-Almanya) tartıldı 1 litre distile suda iyice çözüldükten sonra otoklavlanarak steril edildi, kullanılıncaya kadar oda ısısında tutuldu.

0,5 M EDTA pH 8

186,1 gr EDTA (Sigma-Almanya) tartıldı. Önce 800 ml suda iyice çözüldükten sonra pH 8'e ayarlanıp 1000 ml'ye tamamlandı (pH 8 için yaklaşık 20 gr NaOH eklenir). Hazırlanan çözelti otoklavlanarak steril edildi ve kullanılıncaya kadar oda ısısında bekletildi.

PIV Çözeltisi (10mM TRIS pH 8,0, 1 M NaCl)

1M Tris pH 8'lik çözeltiden 5 ml alınıp 500ml'lik ısıya dayanıklı cam şişeye konuldu. Üzerine 29,2 gr Sodyum klorür eklendi ve distile su ile 500ml'ye tamamlandı. İyice çözüldükten sonra otoklavlanarak steril edildi ve kullanılıncaya kadar oda ısısında bekletildi.

EC Çözeltisi

1M Tris pH 8'lik çözeltiden 3 ml alınıp 500ml'lik ısıya dayanıklı cam şişeye konuldu. Üzerine 0,5 M EDTA pH 8 çözeltisinden 100 ml eklendi. 29,2 gr Sodyum klorür, 1 gr Sodium deoxycholate (Ambresco Inc.- ABD), 2,5 gr Sodyum laurylsarcosine (Sigma- Almanya) eklendi ve distile su ile 500 ml'ye tamamlandı. Otoklavda steril edildikten sonra kullanılıncaya kadar oda ısısında tutuldu.

Stafilokok için EC lizis çözeltisi

EC çözeltisinden 12,75 ml alınarak steril tek kullanımlık tüpe aktarıldı. Üzerine 10 mg/ml RNase A (Sigma-Almanya), 20 mg/ml Lysozyme (Sigma- Almanya), 1 mg/ml Lysostaphine (Sigma- Almanya) enzimlerinin her birinden 75 µl eklendi. Çözelti kullanmadan hemen önce hazırlandı.

ES Çözeltisi

0,5 M EDTA pH 9'luk çözeltiden 100 ml alındı ve cam şişelere konuldu. Üzerine 1 gr Sodyum laurylsarcosine (Sigma- Almanya) tartılıp eklendi. Otoklavda steril edildikten sonra kullanılıncaya kadar oda ısısında bekletildi.

ESP çözeltisi

50ml ES çözeltisi steril cam tüpe aktarıldı. Üzerine 50mg Proteinaz K (Sigma-Almanya) eklendi. karışım kullanmadan hemen önce hazırlandı.

1 X TE (Tris, EDTA) tamponu

(10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA pH 8)

1 M Tris pH 7,5'luk çözeltiden 10 ml alındı. 0,5 M EDTA pH 8 çözeltisinden 2 ml, 1 litrelik ısıya dayanıklı cam şişelere koyuldu ve üzeri 1000 ml'ye kadar steril distile su ile tamamlandı. Otoklavda steril edildikten sonra kullanılıncaya kadar oda ısısında tutuldu.

10 X TBE (Tris, Boric asit, EDTA) tamponu

108 gr Tris Base tartıldı ve 1 litrelik ısıya dayanıklı cam şişelere koyuldu üzerine 55 gr Borik asit ve 0,5 M EDTA pH 8'lik çözeltiden 40 ml eklendi. Distile su ile 1000 ml tamamlandı. Otoklavda steril edildikten sonra kullanılıncaya kadar oda ısısında bekletildi.

0,5 X TBE (Tris, Boric asit, EDTA) Yürütme Tamponu hazırlanması

10 X TBE çözeltisinden kullanmadan 110 ml alınarak steril cam mezüre konuldu. Üzerine 2090 ml steril distile su konuldu. Kullanmadan önce hazırlandı.

Yükleme çözeltisi

25 mg ‘‘Bromphenol Blue’’ steril 50ml’lik bir tüpe aktarıldı. 10 ml 1 X TE ve 10 ml Gliserol eklendi. 1N NaOH ‘ten birkaç damla damlatıldı (pH artışı için) Renk yeşilden maviye değişince yükleme çözeltisinin hazır olduğu belirlendi. Kullanılincaya kadar oda ısısında bırakıldı.

2. 5. 2. Pulsed- Field Gel Elektroforez

Bakterilerin çoğaltılması: Stok besi yerinde -20°C de saklanan *S. aureus* izolatları oda ısısında çözüldükten sonra bir öze yardımıyla %5 koyun kanlı agara ekildi ve 37°C de 24 saat inkübe edildi. Saf olarak üremiş tipik *S. aureus* kolonilerinden, bir koloni seçilerek iğne uçlu öze yardımıyla 5ml steril ‘‘Trypticase Soy Broth’’ (TSB) içeren tüpe ekildi. Bir gece 37°C ’de aerobik atmosferde inkübe edildi. Tüpler, inkübasyondan sonra 6000 rpm de 10 dakika santrifüj edilip üst sıvı atıldı. Tüpün dibinde kalan bakteri peleti üzerine 1 ml PIV çözeltisi eklendi. Karışım vorteks yardımıyla çalkalandıktan sonra otomatik pipet yardımıyla 1ml alınarak steril ependorf tüplere aktarıldı. Daha sonra 10.000 rpm de 10 dak santrifüj (Eppendorf Centrifuge 5417R) edildi ve üst sıvı atıldı.

DNA disklerinin hazırlanması: Peletin üzerine 200 μl PIV çözeltisi eklendi. Karışımdan 100 μl alınarak içerisinde %2’lik Ligth Melting Agaroz (100 μl) (Gibco BRL- İngiltere) bulunan steril bir ependorf tüpe aktarıldı. Üzeri düz, 20x20cm büyüklüğünde camlar alınıp yüzeyleri kağıt parafilm ile düzgün bir şekilde kaplandı. Daha sonra parafilm’in üzeri %70’lik alkol ve gazlı bez ile dikkatli bir şekilde silindi. Bakterili PIV çözeltisi ile Ligth Melting Agaroz karışımından 20 μl ’ ye ayarlanmış otomatik pipet yardımıyla parafin kaplı cam üzerine her örnek için 8-10 DNA diski hazırlandı. Diskler 10 dak. $+4^{\circ}\text{C}$ ’de bekletilerek katılaşması sağlandı. Soğuyup katılaştan diskler 1 ml EC lysis çözeltisi içeren tüplere steril tek kullanımlık öze yardımıyla aktarıldı. Diskler, 1 gece 37°C ’de EC lysis çözeltisi içerisinde bekletildi. Süre sonunda EC lysis çözeltisi döküldü ve 1 ml ESP çözeltisi eklendi. ESP çözeltisi konan tüpler 56°C ’de 1 gece bekletildi. Sonra 1X TE buffer ile DNA diskleri 5 kez

yıkandı. Yıkama işleminden sonra DNA disklerine 2 ml 1XTE buffer eklendi ve 4°C'de, kesim işlemine kadar bekletildi.

İmmobilize ortamda bulunan DNA örneklerinin kesim işlemi: *SmaI* enzimi (*Serratia marcescens* CCC-GGG bölgelerinden DNA'yı keser) yardımıyla gerçekleştirildi. Bu amaçla 1XTE buffer içerisinde 4°C'de bekletilen her izolattan bir disk öze yardımıyla steril bir ependorf tüpüne aktarıldı. Üzerine 70µl restriksiyon sıvısı konularak 1 saat oda ısısında bekletildi. Süre sonunda 100µl'lik mikropipet ile restriksiyon sıvısı uzaklaştırıldı. 15 U *SmaI* (Roche- Almanya) enzimi içeren 45 µl restriksiyon sıvısı, diskler üzerine konuldu ve 37°C'de 1 gece bekletildi. Süre sonunda restriksiyon işlemini durdurmak için her tüpe 5 µl yükleme çözeltisi eklendi.

Elektroforez işlemi: PFGE işleminde taşıyıcı ortam olarak kullanılan 0,5 X TBE çözeltisi içerisinde hazırlanan % 1,1 oranında High Melting Agaroz (Genaxis Spech Bach -Almanya) cihazının agaroz platformunda (Gene Navigator Pharmacia - İsveç) hazırlandı. Oluşan her kuyucuğa bir disk yerleştirildi. Ortadaki kuyucuğa da λ-ladder (Sigma-Almanya) yerleştirildikten sonra Gene Navigator Pharmacia (İsveç)'da DNA'lar 12 saat elektroforeze tabi tutuldu. Elektroforez işleminden sonra 1µg/ml etidiyum bromid içeren 300ml boya solüsyonu içerisinde oda ısısında 30 dakika bekletilerek jelin boyanması sağlandı. Boyama işleminden sonra jel, 300ml distile su içerisinde 30- 60 dk. fazla etidiyum bromidin uzaklaştırılması için bekletildi.

Görüntüleme işlemi: Oluşan bantlar, UV ışık altında GelDoc görüntüleme sistemi (GelDoc/BioRad/ABD) yardımıyla bilgisayar ortamına aktarıldı. Bantların aynılık oranları X-L-STAT (Soll ve ark. 2003, Anonim 2006b) programında Dice korelasyon katsayısı kullanılarak yapıldı..

3. BULGULAR

3.1. Alınan süt örneklerinin CMT sonuçları

Çalışmada Kırıkkale ve çevresindeki süt sığırcılığı işletmelerinde bulunan ineklerin sütleri CMT ile muayene edildi. CMT sonuçları Tablo 3.1' de verilmiştir. CMT ile muayene edilen 109 inekten 54 tanesinde subklinik mastitisin pozitif olduğu saptanmıştır. Alınan sonuçlara göre subklinik mastitis oranı % 49,5 olarak belirlenmiştir.

CMT ile 436 meme lobundan (109 inek) alınan süt örneği incelendi ve 121 tanesi +1, +2, +3 değerlerinde CMT pozitif bulundu. 308 meme lobundan alınan süt örneği ise CMT negatif olarak belirlendi. 7 meme lobu kör (6 hayvan) olduğu için test yapılamadı. CMT pozitif süt örneklerinin 72 (%59,5) sinde stafilokok üremesi oldu. CMT negatif olan süt örneklerinin ise 23 (%7,4) tanesinde stafilokok üredi.

Tablo 3.1. CMT ile elde edilen bulgular

İnek Sayısı	CMT Pozitif İnek Sayısı	CMT Pozitif Meme Lobu	CMT Test Skorları ve (Stafilokok Üremesi Olan Meme Lobu Sayısı)				
			+1 (s.ü.)*	+2 (s.ü.)	+3 (s.ü.)	Negatif (s.ü.)	Kör
109	54	121	27 (13)	55 (34)	39 (25)	308 (23)	7

s. ü. : Stafilokok Üremesi

3.2. İzolasyon ve tanımlama sonuçları

İneklerin sütlerinden %22.2 (95), derilerinden %51.1 (223) ve burunlarından % 45.0 (98); bakıcıların ise burunlarından %69.1 (29) ve ellerinden %85.8 (36) stafilokok izole edildi.

Süt sığırcılığı işletmelerinde mastitisli ineklerin sütlerinden izole edilen 95 adet stafilokok izolatının % 48,4'ü (46 adet) *S. aureus*, %15,7'si (15) *S. haemolyticus*, %8,4'ü (8) *S. epidermidis*, %6,3' ü (6) *S. lugdunensis*, %6,3' ü (6) *S. warneri*, %4,2'si

(4) *S. saprophyticus*, %4,2'si (4) *S. simulans*, %2,1'i (2) *S. cohnii spp.cohnii*, %1'i (1) *S. capitis*, %1'i (1) *S. hyicus*, %1'i (1) *S. intermedius*, %1'i (1) *S. lentus* olarak tanımlandı.

Bakteriyolojik yoklamalar sonucunda 121 mastitisli süt örneğinden % 59,5 (72) stafilocok suşu izole edildi. CMT negatif süt örneklerinden ise 23 (%7,4) stafilocok suşu izole edildi. İzole edilen toplam 95 stafilocok suşu oldu. Bu stafilocokların % 50,2 [48 (46 *S. aureus*, 1 *S. hyicus*, 1 *S. intermedius*)] koagülaz pozitif stafilocok; % 49,4 (47) ise koagülaz negatif stafilocok (KNS) olarak tanımlandı.

Süt sığırcılığı işletmelerdeki ineklerin meme başı derilerinden izole edilen 223 stafilocok izolatının %23,3'ü (52 adet) *S. haemolyticus*, %15,6'sı (35) *S. aureus*, %11,6'sı (26) *S. saprophyticus*, %10,3'ü (23) *S. warneri*, %7,6'sı (17) *S. capitis*, %6,7'si (15) *S. simulans*, %4,9'u (11) *S. lugdunensis*, %4,4'ü (10) *S. xylosus*, %3,5'i (8) *S. hominis*, %3,1'i (7) *S. hyicus*, %1,7'si (4) *S. schleiferi spp. schleiferi*, %1,3'ü (3) *S. auricularis*, %1,3'ü (3) *S. vitulinus*, %0,4 'ü (1) *S. cohnii spp.cohnii*, %0,4 'ü (1) *S. equorum*, %0,4 'ü (1) *S. intermedius*, %0,4 'ü (1) *S. kloosii* olarak belirlendi. Ancak %2,2 oranında stafilocok ise tanımlanamadı.

İneklerin burun sürüntü örneklerinden izole edilen 98 adet stafilocok izolatının %23,4'ü (23) *S. haemolyticus*, %15,3'ü (15) *S. xylosus*, %8,1'i (8) *S. equorum*, %8,1'i (8) *S. simulans*, %8,1'i (8) *S. warneri*, 5,1'i (5) *S. saprophyticus*, %4'ü (4) *S. capitis*, %3'ü (3) *S. aureus*, %3'ü (3) *S. epidermidis*, %3'ü (3) *S. hyicus*, %2'si (2) *S. kloosii* ve %2'si (2) *S. lugdunensis*, % 1'i (1) *S. cohnii spp.cohnii*, % 1'i (1) *S. felis*, % 1'i (1) *S. schleiferi spp. schleiferi* olarak tanımlandı. Suşların %11,2'si (11) identifiye edilemedi.

Bakıcıların burun sürüntü örneklerinden izole edilen 29 adet stafilocok suşunun %48,2'si (14) *S. epidermidis*, %31,0'i (9) *S. aureus*, %6,8'i (2) *S. saprophyticus*, %3,4'ü (1) *S. haemolyticus*, %3,4'ü (1) *S. schleiferi*, %3,4'ü (1) *S. xylosus* olarak tanımlandı. Bakıcı burun izolatlarının %3,4'ü (1) ise tanımlanamadı.

Bakıcıların el sürüntü örneklerinden izole edilen 36 adet stafilocok suşunun %22,2'si (8) *S. haemolyticus*, %16,6 (6) *S. saprophyticus*, %11,1 (4) *S. warneri*, %11,1 (4) *S. xylosus*, %8,3'ü (3) *S. aureus*, %5,5'i (2) *S. epidermidis*, %5,5'i (2) *S. equorum*, %5,5'i (2) *S. lugdunensis*, %2,7'si (1) *S. pasteurii*, %2,7'si (1) *S. sciuri*, %2,7'si (1) *S. schleiferi* spp. *schleiferi* ve %2,7'si (1) *S. vitulinus* olarak tanımlandı. Bakıcı el kökenli izolatların %2,7'si (1) ise tanımlanamadı.

İnek ve bakıcılarından izole edilen stafilocok türlerinin kaynakları, biyotipleri, sayıları ve dağılım oranları Tablo 3.2 'de verilmektedir.

Tablo 3.2. İnek ve bakıcılardan izole edilen stafilokok suşlarının kaynakları, biyotipleri ve izolasyon oranları

Mikroorganizma	İnek (n=109) (%)			Bakıcı (n=21) (%)	
	Süt (n=95) (%)	Meme başı derisi (n=223) (%)	Burun (n=98) (%)	Burun (n=29) (%)	El (n=36) (%)
<i>S. aureus</i>	46 (48,4)	35 (15,6)	3 (3)	9 (31)	3 (8,3)
<i>S. auricularis</i>	-	3 (1,3)	-	-	-
<i>S. capitis</i>	1 (1)	17 (7,6)	4 (4)	-	-
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	2 (2,1)	1 (0,4)	1 (1)	-	-
<i>S. epidermidis</i>	8 (8,4)	-	3 (3)	14 (48,2)	2 (5,5)
<i>S. equorum</i>	-	1 (0,4)	8 (8,1)	-	2 (5,5)
<i>S. felis</i>	-	-	1 (1)	-	-
<i>S. haemolyticus</i>	15 (15,7)	52 (23,3)	23 (23,4)	1 (3,4)	8 (22,2)
<i>S. hominis</i>	-	8 (3,5)	-	-	-
<i>S. hyicus</i>	1 (1)	7 (3,1)	3 (3)	-	-
<i>S. intermedius</i>	1 (1)	1 (0,4)	-	-	-
<i>S. kloosii</i>	-	1 (0,4)	2 (2)	-	-
<i>S. lentus</i>	1 (1)	-	-	-	-
<i>S. lugdunensis</i>	6 (6,3)	11 (4,9)	2 (2)	-	2 (5,5)
<i>S. pasteurii</i>	-	-	-	-	1 (2,7)
<i>S. saprophyticus</i>	4 (4,2)	26 (11,6)	5 (5,1)	2 (6,8)	6 (16,7)
<i>S. schleiferi</i>	-	-	-	1 (3,4)	-
<i>S. sciuri</i>	-	-	-	-	1 (2,7)
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	-	4 (1,7)	1 (1)	-	1 (2,7)
<i>S. simulans</i>	4 (4,2)	15 (6,7)	8 (8,1)	-	-
<i>S. vitulinus</i>	-	3 (1,3)	-	-	1 (2,7)
<i>S. warneri</i>	6 (6,3)	23 (10,3)	8 (8,1)	-	4 (11,1)
<i>S. xylosum</i>	-	10 (4,4)	15 (15,3)	1 (3,4)	4 (11,1)
Nonidentifiye	-	5 (2,2)	11 (11,2)	1 (3,4)	1 (2,7)
Stafilokok izole edilmeyen örnek	334 (77,8)	213 (48,9)	120 (55,0)	13 (30,9)	6 (14,2)
Stafilokok izole edilen toplam örnek	95 (22,2)	223 (51,1)	98 (45,0)	29 (69,1)	36 (85,8)
Toplam örnek sayısı	429 (100)	436 (100)	218 (100)	42 (100)	42 (100)

3.3. Antimikrobik ilaçlara duyarlılık sonuçları

Materyal bölümünde açıklanan örneklerden izole edilen 96 adet (46 süt örneği, 35 memebaşı derisi sürüntü örneği, 3 inek burun sürüntü örneği, 12 bakıcı el ve 12 bakıcı burun sürüntü örneği) *S. aureus* izolatının penisilin, sefalotin, eritromisin, tetrasiklin, oksasilin, enrofloksasin, gentamisin, vankomisin, trimetoprim-sulfametoksazol, linezolid ve rifampine karşı duyarlılıkları E-test (Resim 3. 1., Resim 3. 2.) yöntemi ile belirlendi.

Çalışmamızda incelenen toplam 96 adet *S. aureus* izolatının penisilin direnci %85,4 (82 adet) tetrasiklin direnci %39,6 (38), eritromisin direnci %5,2 (5), oksasilin direnci %3,1 (3), enrofloksasin direnci %1,0 (1) olarak belirlendi. Mastitisli inek sütlerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının penisilin direnci %80,4, tetrasiklin direnci %26,1, eritromisin direnci %4,3 olarak belirlenirken, gentamisin, enrofloksasin, rifampin, trimetoprim-sulfametoksazol, oksasilin, vankomisin, sefalotin ve linezolide tüm izolatlar duyarlı bulundu. Meme başı derisi ve burun sürüntü örneklerinden izole edilen 38 *S. aureus* izolatlarının penisilin direnci %86,8, tetrasiklin direnci %50,0, olarak belirlenirken incelenen diğer antibiyotiklere tüm izolatlar duyarlı olarak tespit edildi. Tablo 3. 3. de izolatların kökenlerine göre direnç oranları verilmektedir.

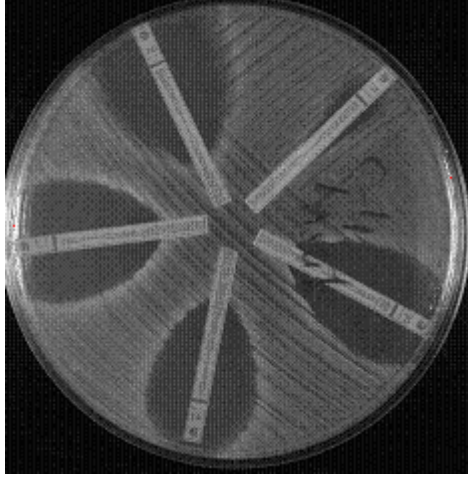
Ayrıca incelenen 96 izolatın %89,0 (85)'u en az bir antibiyotiğe dirençli olarak belirlenirken, suşların %45,8 (44)'inde çoğul dirençlilik (en az iki antibiyotiğe) belirlendi. İzolatlarda üç ilaca dirençlilik oranı ise % 7,3 (7) olarak belirlendi ve bu izolatlardan sadece bir tanesi süt kökenli iken diğerleri bakıcı kökenlidir. İzolatlarda dört ilaca dirençlilik oranı ise %2,0 (2) olarak belirlendi ve bu izolatlar bakıcılardan izole edilen izolatlardır.

Tablo 3.3 *S. aureus* izolatlarının kökenleri ve direnç oranları.

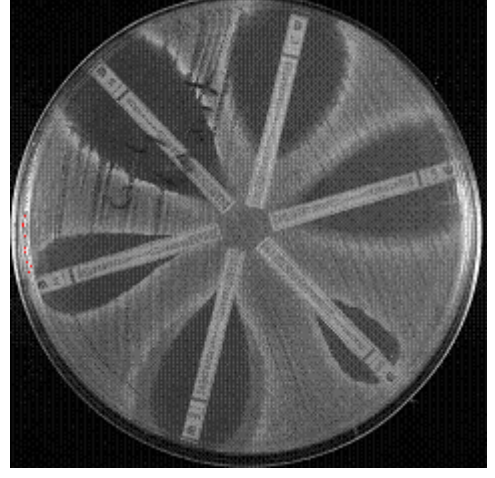
Antibiyotik	İnek									Bakıcı						Toplam İzolat sayısı (n=96)		
	Süt (n=46)			Meme başı derisi (n=35)			Burun (n=3)			El (n=3)			Burun (n=9)					
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Penisilin	9 (19,6)	-	37 (80,4)	4 (11,4)	-	31 (88,6)	1 (33,3)	-	2 (66,7)	0	-	3 (100)	0	-	9 (100)	14 (14,6)	-	82 (85,4)
Tetrasiklin	32 (69,6)	2 (4,3)	12 (26,1)	14 (40)	3 (8,6)	18 (51,4)	1 (33,3)	1 (33,3)	1 (33,3)	1 (33,3)	0	2 (66,7)	4 (44,4)	0	5 (55,6)	52 (54,2)	6 (6,2)	38 (39,6)
Eritromisin	43 (93,5)	1 (2,2)	2 (4,3)	35 (100)	0	0	3 (100)	0	0	1 (33,3)	1 (33,3)	1 (33,3)	5 (55,6)	2 (22,2)	2 (22,2)	87 (90,6)	4 (4,2)	5 (5,2)
Gentamisin	46 (100)	0	0	35 (100)	0	0	3 (100)	0	0	3 (100)	0	0	9 (100)	0	0	96 (100)	0	
Enrofloksasin	46 (100)	0	0	35 (100)	0	0	3 (100)	0	0	3 (100)	0	0	8 (88,9)	0	1 (11,1)	95 (99)	0	1 (1)
Rifampin	46 (100)	0	0	35 (100)	0	0	3 (100)	0	0	3 (100)	0	0	9 (100)	0	0	96 (100)	0	0
Trimetoprim- sulfametaksazol	46 (100)	0	0	35 (100)	0	0	3 (100)	0	0	3 (100)	0	0	9 (100)	0	0	96 (100)	0	0
Oksasilin	46 (100)	0	0	35 (100)	0	0	3 (100)	0	0	2 (66,7)	0	1 (33,3)	7 (77,8)	0	2 (22,2)	93 (96,9)	0	3 (3,1)
Vankomisin	46 (100)	0	0	35 (100)	0	0	3 (100)	0	0	3 (100)	0	0	9 (100)	0	0	96 (100)	0	0
Sefalotin	46 (100)	0	0	35 (100)	0	0	3 (100)	0	0	3 (100)	0	0	9 (100)	0	0	96 (100)	0	0
Linezolid	46 (100)	0	0	35 (100)	0	0	3 (100)	0	0	3 (100)	0	0	9 (100)	0	0	96 (100)	0	0

S: Duyarlı, I: Orta hassas, R: Dirençli

Resim 3.1 E-test resmi



Resim 3. 2 E-test resmi



Resim 3.1 ve Resim 3. 2 de subklinik mastitisli bir ineğin sütünden izole edilen *S. aureus* izolatının E-yöntemi ile incelenen 11 antibiyotiğe duyarlılık durumu ve MİK değerleri gösterilmektedir. İzolat penisilin ve tetrasikline dirençlidir. İzolatın penisilin, sefalotin, tetrasiklin, eritromisin, trimetoprim-sulfametoksazol, rifampin, enrofloksasin, oksasilin, vankomisin, gentamisin ve linezolid için MİK değerleri sırasıyla,0.75, 0.19, 6, 0.125, 0.032, 0006, 0.064, 0.38, 0.25, 0.25, 0.5 µg/ml olarak belirlendi.

İzolatlara karşı en az etkili antibiyotik penisilin (duyarlılık %14,6) olarak belirlenirken, trimetoprim-sulfametoksazol, rifampin, vankomisin, gentamisin ve linezolid tüm izolatlara karşı etkin (duyarlılık %100) bulundu. Tablo 3. 4.'de 96 *S. aureus* izolatı için antibiyotiklerin MİK₅₀, MİK₉₀ değerleri verilmektedir. İzolatlara karşı en az etkili antibiyotik penisilin olarak belirlendi çünkü hem MİK₅₀ hem de MİK₉₀ değerleri sınır değerinin üzerinde belirlendi.

Tablo 3.4. *S.aureus* (n:96) izolatlarına karşı antibiyotiklerin MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri.

	Sınır değerler µg/ml	MİK ₅₀ µg/ml	MİK ₉₀ µg/ml	Aralık µg/ml
PG	≥0,25	1	3	0,004- 6
CE	≥32	0,25	0,5	0,064- 4
TC	≥16	0,38	64	0,032- >256
EM	≥8	0,19	0,5	0,032- >256
TS	≥4/76	0,047	0,094	0,023- 0,47
RI	≥4	0,006	0,012	0,002- 0,094
EF	≥4	0,094	0,19	0,047- 32
OX	≥4	0,38	0,75	0,025- 4
VA	≥16	0,5	1,5	0,125- 4
GM	≥16	0,38	0,75	<0,016- 1,5
LZ	-	0,75	1,5	0,094- 2

PG: Penisilin, **TC:** Tetrasiklin, **TS:** Trim./Sul, **EF:** Enrofloksasin, **VA:** Vankomisin, **GM:** Gentamisin, **OX:** Oksasilin, **EM:** Eritromisin, **RI:** Rifampin, **CE:** Sefalotin, **LZ:** Linezolid. **S:** Sensitive, **I:** Intermediate, **R:** Resistance.

Sadece mastitisli inek sütlerinden izole edilen 46 *S. aureus* izolatu için antibiyotiklerin MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri belirlendi. Elde edilen verilere göre, test edilen antibiyotiklerden sefalotin, eritromisin, trimetoprim-sulfametoksazol, rifampin, enrofloksasin, oksasilin, vankomisin, gentamisin ve linezolid izolatlarla karşı yüksek oranlarda etkin bulundu.

Mastitisli inek sütlerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının penisilin duyarlılığı %19,6, tetrasiklin duyarlılığı %74, eritromisin duyarlılığı % 95,7 olarak belirlenirken diğer antibiyotiklere duyarlılıkları %100 olarak belirlendi. Tablo 3.5.'de mastitisli inek sütlerinden köken alan *S. aureus* izolatlarına karşı incelenen antimikrobik ilaçların MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri verilmiştir. İzolatlarla karşı, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sınır değerinin üzerinde olduğundan en az etkili antibiyotik penisilin olarak belirlendi.

Tablo 3.5. Mastitisli inek sütlerden izole edilen 46 *S.aureus* izolatına karşı antibiyotiklerin MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri.

	Sınır değerler µg/ml	MİK ₅₀ µg/ml	MİK ₉₀ µg/ml	Aralık µg/ml
PG	≥0,25	0,75	2	0,008- 6
CE	≥32	0,19	0,5	0,064- 4
TC	≥16	0,19	64	0,032- >256
EM	≥8	0,125	0,38	0,032- 26
TS	≥4/76	0,047	0,094	0,023- 0,23
RI	≥4	0,006	0,016	0,003- 0,094
EF	≥4	0,094	0,125	0,047- 0,27
OX	≥4	0,19	0,75	0,025- 2
VA	≥16	0,5	1,5	0,19- 1,5
GM	≥16	0,38	1	0,125- 1,5
LZ	-	0,5	1	0,19- 2

PG: Penisilin, **TC:** Tetrasiklin, **TS:** Trim./Sul, **EF:** Enrofloksasin, **VA:** Vankomisin, **GM:** Gentamisin, **OX:** Oksasilin, **EM:** Eritromisin, **RI:** Rifampin, **CE:** Sefalotin, **LZ:** Linezolid. **S:** Sensitive, **I:** Intermediate, **R:** Resistance.

İneklerin meme başı derisi ve burun sürüntü örneklerinden izole edilen 38 *S. aureus* izolatının penisilin duyarlılığı %13,2, tetrasiklin duyarlılığı %50,0 olarak belirlenirken diğer antibiyotiklere tüm izolatlar duyarlı olarak belirlendi. Bu nedenle, izolatlar karşı sefalotin, eritromisin, trimetoprim-sulfametoksazol, rifampin, enrofloksasin, oksasilin, vankomisin, gentamisin ve linezolid etkin bulundu. İnek meme başı derisi ve burun kökenli *S. aureus* izolatları için antibiyotiklerin MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri Tablo 3.6.da verilmiştir.

Tablo 3. 6. İneklerin meme başı derisi ve burunlarından izole edilen 38 *S.aureus* suşuna karşı antibiyotiklerin MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri

	Sınır değerler µg/ml	MİK ₅₀ µg/ml	MİK ₉₀ µg/ml	Aralık µg/ml
PG	≥0,25	1,5	3	0,004- 4
CE	≥32	0,38	0,5	0,064- 0,75
TC	≥16	12	48	0,047- 96
EM	≥8	0,19	0,25	0,032- 0,38
TS	≥4/76	0,064	0,094	0,032- 0,125
RI	≥4	0,008	0,012	0,002- 0,032
EF	≥4	0,094	0,19	0,047- 0,38
OX	≥4	0,38	0,75	0,064- 1
VA	≥16	0,75	1	0,125- 1,5
GM	≥16	0,38	0,5	<0,016- 1
LZ	-	0,75	1,5	0,25- 2

PG: Penisilin, **TC:** Tetrasiklin, **TS:** Trim./Sul, **EF:** Enrofloksasin, **VA:** Vankomisin, **GM:** Gentamisin, **OX:** Oksasilin, **EM:** Eritromisin, **RI:** Rifampin, **CE:** Sefalotin, **LZ:** Linezolid. **S:** Sensitive, **I:** Intermediate, **R:** Resistance.

İnek bakıcılarının el ve burun sürüntü örneklerinden izole edilen 12 adet *S.aureus* izolatına karşı en yüksek etkinliği sefalotin, trimetoprim-sulfametoksazol, rifampin, enrofloksasin, vankomisin, gentamisin ve linezolid göstermiştir. İncelenen suşlara karşı penisilinin etkisiz, tetrasiklin, oksasilin ve eritromisinin daha az etkili olduğu belirlendi. Bakıcı el ve burunlarından izole edilen izolatlara penisilin duyarlılığı %0, tetrasiklin duyarlılığı %41,7, eritromisin duyarlılığı %75,0, enrofloksasin duyarlılığı %91,7, oksasilin duyarlılığı %75,0 olarak belirlenirken diğer antibiyotiklere tüm izolatlar duyarlı bulundu. Bakıcı kökenli izolatlar için antibiyotiklerin MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri Tablo 3. 7.de verilmiştir.

Tablo 3. 7. Bakıcı el ve burnundan izole edilen 12 *S.aureus* suşuna karşı antibiyotiklerin MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri.

	Sınır değerler µg/ml	MİK ₅₀ µg/ml	MİK ₉₀ µg/ml	Aralık µg/ml
PG	≥0,25	3	6	0,25- 32
CE	≥32	0,25	1	0,19- 2
TC	≥16	12	256	0,047- >256
EM	≥8	0,5	8	0,064- 24
TS	≥4/76	0,047	0,23	0,023- 0,47
RI	≥4	0,006	0,008	0,004- 0,016
EF	≥4	0,125	0,38	0,094- 32
OX	≥4	0,5	4	0,25- 4
VA	≥16	1	2	0,38- 4
GM	≥16	0,25	0,38	0,064- 0,75
LZ	-	0,5	1,5	0,094- 2

PG: Penisilin, **TC:** Tetrasiklin, **TS:** Trim./Sul, **EF:** Enrofloksasin, **VA:** Vankomisin, **GM:** Gentamisin, **OX:** Oksasilin, **EM:** Eritromisin, **RI:** Rifampin, **CE:** Sefalotin, **LZ:** Linezolid. **S:** Sensitive, **I:** Intermediate, **R:** Resistance.

3.4. Plazmid profil analiz sonuçları

S. aureus izolatlarının (96) plazmid profil analizleri sonucunda 9 farklı tipte plazmid profili oluşturuldu. Analizleri yapılan izolatların 87 (%90,6) tanesinde 1,8 kb, 2 kb, 3kb, 5 kb, 7 kb, 8 kb, 10 kb, 12 kb, 16 kb ve 19 kb'lık on farklı büyüklükte plazmid belirlendi ve izolatlarının 9 tanesinde (%9,4) plazmid saptanamadı. Plazmid paternleri P1 (Patern 1), P2,..., P9 olarak ifade edildi. İzolatların plazmid paternleri ve taşıdıkları plazmid tipleri Tablo 3. 8'de, plazmid paternlerine ait jel görüntüsü ise Resim 3.3 ve 3.4'de verilmiştir.

İzolatlarda 1-4 arasında değişen sayıda plazmid varlığı belirlendi. *S.aureus* izolatlarının 48 (%50) tanesinde 12 kb'lık tek plazmid (Patern 1 (P1), 17 (%17,7) tanesinde 5 kb ve 10 kb olmak üzere 2 plazmid (P2), 9 (%9,4) tanesinde 5 kb, 12kb, 19 kb'lık üç plazmid (P3), 2 (%2) tanesinde 1.8 kb, 2 kb ve 10 kb olmak üzere üç plazmid (P4), 2 (%2) tanesinde 7 kb, 8 kb ve 12 kb'lık üç plazmid (P5), 2 (%2) tanesinde 3kb ve 10 kb 'lık iki plazmid (P6), 3 (%3,1) tanesinde ise 7kb, 8kb, 12kb ve 19kb'lık dört plazmid (P7), 4 (%4,1) tanesinde 3kb, 8kb, 12kb ve 16 kb'lık dört plazmid (P8) belirlendi. Plazmid analizi yapılan izolatların9 (%9,4) tanesinde ise plazmid belirlenemedi (P9).

Tablo 3. 8. *S. aureus* (n:96) suşlarının orijinleri, taşıdıkları plazmid sayısı, plazmidlerinin moleküler ağırlığı ve antibiyotik direnç profilleri

İzolat no	İzolatın izole edildiği yer	Patern	Plazmid sayısı	Büyüklik	Antibiyotik direnç özelliği
51	05ç-11 Ss	P9	-	-	P, T
13	05ç-20 Ss	P9	-	-	P
12	07ç-07 Ss	P9	-	-	P
61	10ç-Bb	P9	-	-	P,E;Enr, Ox
1	12ç-01 Sd	P9	-	-	-
14	20ç-06 Sd	P9	-	-	P
15	20ç-06 Ss	P9	-	-	P
16	20ç-06 Ss	P9	-	-	P
17	20ç-09 Sd	P9	-	-	P
82	02ç-17 Ss	P4	3	1,8 kb, 2 kb, 10 kb	P,T
96	02ç-17 Ss	P4	3	1,8 kb, 2 kb, 10 kb	T, E
18	01ç-02 Ss	P1	1	12 kb	P
19	01ç-02 Ss	P1	1	12 kb	P
23	01ç-07 Sd	P1	1	12 kb	P
20	01ç-07 Ss	P1	1	12 kb	P
21	01ç-07 Ss	P1	1	12 kb	P
22	01ç-07 Ss	P1	1	12 kb	P
24	01ç-07 Ss	P1	1	12 kb	P
25	01ç-10 Ss	P1	1	12 kb	P
26	01ç-10 Ss	P1	1	12 kb	P
95	02ç-01 Ss	P1	1	12 kb	T
27	02ç-12 Ss	P1	1	12 kb	P
94	02ç-14 Ss	P1	1	12 kb	T
34	04ç-01 Ss	P1	1	12 kb	P
4	04ç-06 Ss	P1	1	12 kb	-
5	04ç-07 Ss	P1	1	12 kb	-
60	05ç-17 Ss	P1	1	12 kb	P,E
66	06ç-08 Sd	P1	1	12 kb	P,T
67	06ç-08 Sd	P1	1	12 kb	P,T

Tablo 3. 8.Devamı

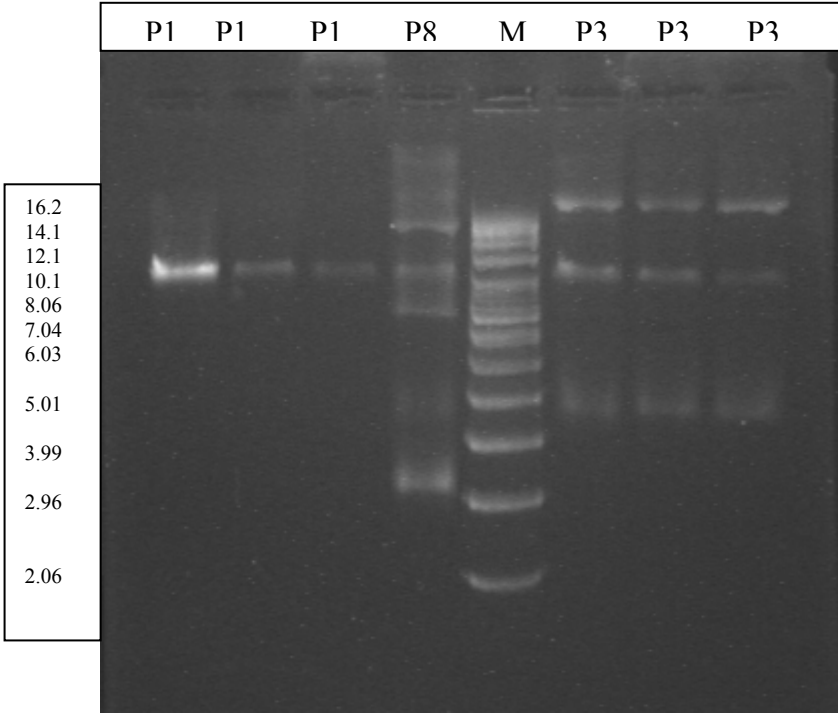
İzolasyon no	İzolasyonun izole edildiği yer	Patern	Plazmid sayısı	Büyüklik	Antibiyotik direnç özelliği
28	06ç-27 Ss	P1	1	12 kb	P
62	07-06 Ss	P1	1	12 kb	P,T
29	07ç-01 Sd	P1	1	12 kb	P
2	07ç-05 Sd	P1	1	12 kb	-
63	07ç-09 Sd	P1	1	12 kb	P,T
92	07ç-Bb	P1	1	12 kb	P,T, E
64	10ç-02 Sd	P1	1	12 kb	P,T
65	10ç-02 Sd	P1	1	12 kb	P,T
30	10ç-02 Ss	P1	1	12 kb	P
91	10ç-06 Ss	P1	1	12 kb	P,T, E
59	11ç- Bb	P1	1	12 kb	P, T,E, Ox
58	11ç- Be	P1	1	12 kb	P, T, Ox
68	11ç-02 Sd	P1	1	12 kb	P,T
3	12ç-01 Sd	P1	1	12 kb	-
53	12ç-Bb	P1	1	12 kb	P, T
33	13ç-01 Sd	P1	1	12 kb	P
57	15ç-Bb	P1	1	12 kb	P, T, E
52	16ç-01 Sd	P1	1	12 kb	P, T
35	16ç-01 Ss	P1	1	12 kb	P
36	16ç-02 Ss	P1	1	12 kb	P
37	16ç-03 Ss	P1	1	12 kb	P
6	17ç-01 Ss	P1	1	12 kb	-
38	17ç-01 Ss	P1	1	12 kb	P
31	17ç-Bb	P1	1	12 kb	P
32	17ç-Bb	P1	1	12 kb	P
39	20ç-06 Sd	P1	1	12 kb	P
41	20ç-06 Sd	P1	1	12 kb	P
40	20ç-06 Ss	P1	1	12 kb	P
54	20ç-07 Sd	P1	1	12 kb	P, T
7	20ç-09 Sd	P1	1	12 kb	-
80	15ç-01 Ss	P6	2	3 kb, 10 kb	P,T
81	15ç-01 Ss	P6	2	3 kb, 10 kb	P,T
89	03ç-01 Ss	P8	4	3 kb, 8 kb, 12 kb, 16 kb	P,T
47	04ç-01 Ss	P8	4	3 kb, 8 kb, 12 kb, 16 kb	P
90	10ç-02 Sd	P8	4	3 kb, 8 kb, 12 kb, 16 kb	P,T
10	12ç-02 Ss	P8	4	3 kb, 8 kb, 12 kb, 16 kb	-
93	10ç-01 Sd	P2	2	5 kb, 10 kb	P,T
71	10ç-Be	P2	2	5 kb, 10 kb	P,T
86	10ç-02 Sd	P3	3	5 kb, 12 kb, 19 kb	P,T
9	12ç-02 Ss	P3	3	5 kb, 12 kb, 19 kb	-
50	15ç-Be	P3	3	5 kb, 12 kb, 19 kb	P, E

Tablo 3. 8.Devamı

İzolasyon no	İzolasyonun izole edildiği yer	Patern	Plazmid sayısı	Büyüklik	Antibiyotik direnç özelliği
87	20ç-08 Ss	P3	3	5 kb, 12 kb, 19 kb	P,T
69	07ç-10 Sd	P2	2	5 kb,10 kb	P,T
70	07ç-10 Sd	P2	2	5 kb,10 kb	P,T
72	10ç-01 Sd	P2	2	5 kb,10 kb	P,T
73	10ç-03 Sd	P2	2	5 kb,10 kb	P,T
74	10ç-03 Ss	P2	2	5 kb,10 kb	P,T
75	10ç-04 Sd	P2	2	5 kb,10 kb	P,T
76	10ç-04 Ss	P2	2	5 kb,10 kb	P,T
77	10ç-05 Sb	P2	2	5 kb,10 kb	P,T
78	11ç-01 Sd	P2	2	5 kb,10 kb	P,T
79	11ç-04 Ss	P2	2	5 kb,10 kb	P,T
8	15ç-01 Sb	P2	2	5 kb,10 kb	-
55	16ç-01 Sd	P2	2	5 kb,10 kb	P, T
42	20ç-05 Sd	P2	2	5 kb,10 kb	P
43	20ç-05 Ss	P2	2	5 kb,10 kb	P
44	20ç-06 Ss	P2	2	5 kb,10 kb	P
88	07ç-Bb	P3	3	5 kb,12 kb ,19 kb	P,T
56	07ç-03 Sd	P3	3	5 kb,12 kb, 19 kb	P, T
84	07ç-10 Sb	P3	3	5 kb,12 kb, 19 kb	P,T
83	07ç-10 Sd	P3	3	5 kb,12 kb, 19 kb	P,T
85	10ç-01 Sd	P3	3	5 kb,12 kb, 19 kb	P,T
45	15ç-Bb	P5	3	7 kb, 8 kb, 12 kb	P
46	20ç-06 Sd	P5	3	7 kb, 8 kb, 12 kb	P
11	17ç-01 Ss	P7	4	7 kb, 8 kb, 12 kb, 19 kb	-
48	20ç-05 Sd	P7	4	7 kb, 8 kb, 12 kb, 19 kb	P
49	20ç-05 Ss	P7	4	7 kb, 8 kb, 12 kb, 19 kb	P

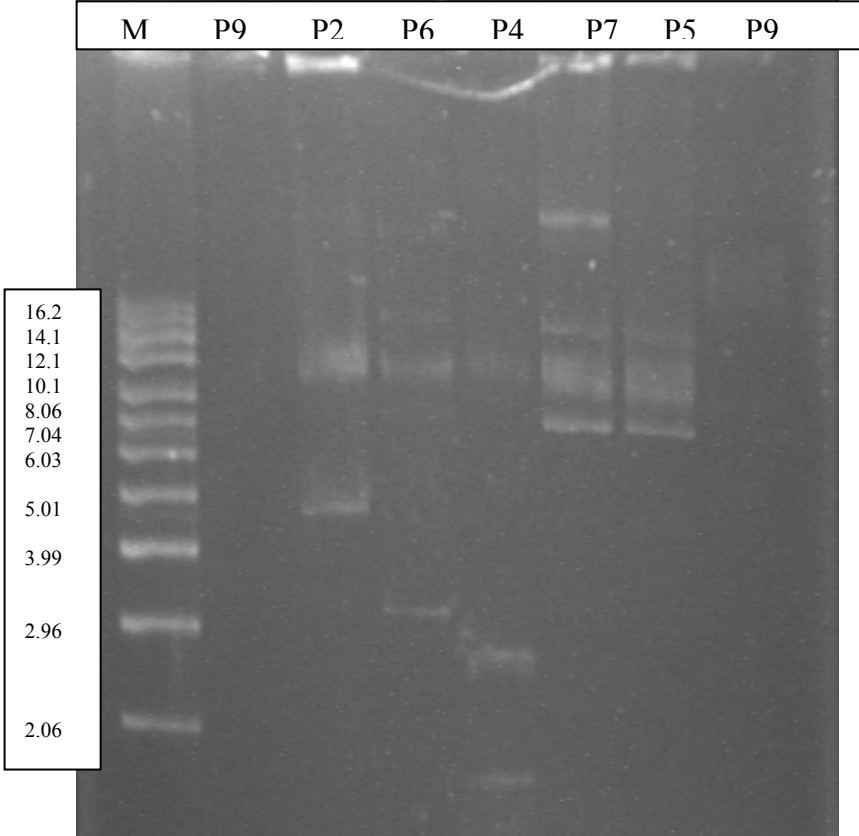
P: penisilin, T: tetrasiklin, E: eritromisin, Ox: oksasilin, Enr: enrofloksasilin **01ç-02 Ss:** Birinci çiftlik, ikinci sığır süt, **01ç-07 Sd:** Birinci çiftlik, yedinci sığır deri, **07ç-10 Sb:** Yedinci çiftlik, onuncu sığır burun, **10ç-Bb:** Onuncu çiftlik, bakıcı burun, **15ç-Bc:** Onbeşinci çiftlik, bakıcı el.

Resim 3. 3. *S. aureus* suşlarının plazmid paternleri



Şekil 3.3. de P1, P3 ve P8 tiplerinin jel görüntüleri görülmektedir. P1’de tek plazmid P3 de üç ve P8 de dört plazmid bulunmaktadır.

Resim 3. 4. *S. aureus* suşlarının plazmid paternleri.



Resim 3.4 de P2, P4, P5, P6, P7 ve P9 paternlerinin jel görüntüleri görülmektedir. P2, P4 ve P6 da 2, P5 de 3, P7 de dört plazmid bulunurken P9 da plazmid bulunmamaktadır.

3. 5. Stafilokokların Pulsed- Field Gel Electrophoresi (PFGE) Tiplendirme Sonuçları

Çalışmada çeşitli materyallerden izole ve identifiye edilen 96 *S. aureus* izolatının tümü PFGE metodu ile tiplendirildi. İzolatların kromozomal DNA'sı *SmaI* enzimi ile kesildiğinde 50-550kb arasında değişen moleküler ağırlıklarda 9-16 adet bant bulunan 42 farklı patern tanımlandı (Şekil 3.1).

Elde edilen PFGE sonuçlarına göre *S. aureus* izolatları 13 ana gruba (A, B, C, D, E, F,G, H, I, J, K,L, M) ve 33 alt gruba ayrıldı. İzolatlar genetik ilişkilerine göre %95, %90 ve % 80 oranlarında benzerlikle sırasıyla 36, 14, 12 pulsotipe ayrıldı. İzolatların % 58,3'ünün (56 adet) A, %16,7'nin (16) B, %5,2'nin (5) C, %5,2'nin G, % 3,1'nin (3) D, % 2,1'nin (2) E, 2,1'nin (2) L, 2,1'nin (2) M, % 1'nin (1) F, % 1'nn (1) H, % 1'nin (1) I, % 1'nin (1) J, % 1'nin (1) K grubunda yer aldığı saptandı.

A klonunda, izolatların 35 tanesi mastitisli inek sütü, 20 tanesi inek meme başı derisi ve 1 tanesi inek burun mukozası olmak üzere (56) izolatların %58,3'ü yer almaktadır. Bu izolatların tümü inek kökenli ve 12 farklı çiftlikten izole edilen izolatlardır.

B grubunda 6 sığır deri, 7 sığır süt, 1 sığır burun, 1 bakıcı el derisi, 1 bakıcı burun mukozası, olmak üzere (16) izolatların %16,7'si bulunmaktadır. Bu izolatlardan bakıcı el kökenli izolat ile aynı çiftlikte bulunan 3 inek meme başı deri izolatı (2 farklı inekten) yakın ilişkili bulundu. Yine B grubunda tiplendirilen bakıcı burun kökenli izolat ile aynı çiftlikteki 1 inek süt kökenli izolat yakın ilişkili bulundu.

C grubunda, 2 inek meme başı derisi, 2 bakıcı burun mukozası ve 1 inek burun mukozası olmak üzere (16) izolatların %5,2'si bulunmaktadır. Bu izolatların tümüde aynı çiftlikteki inek ve bakıcı kökenli izolatlardır.

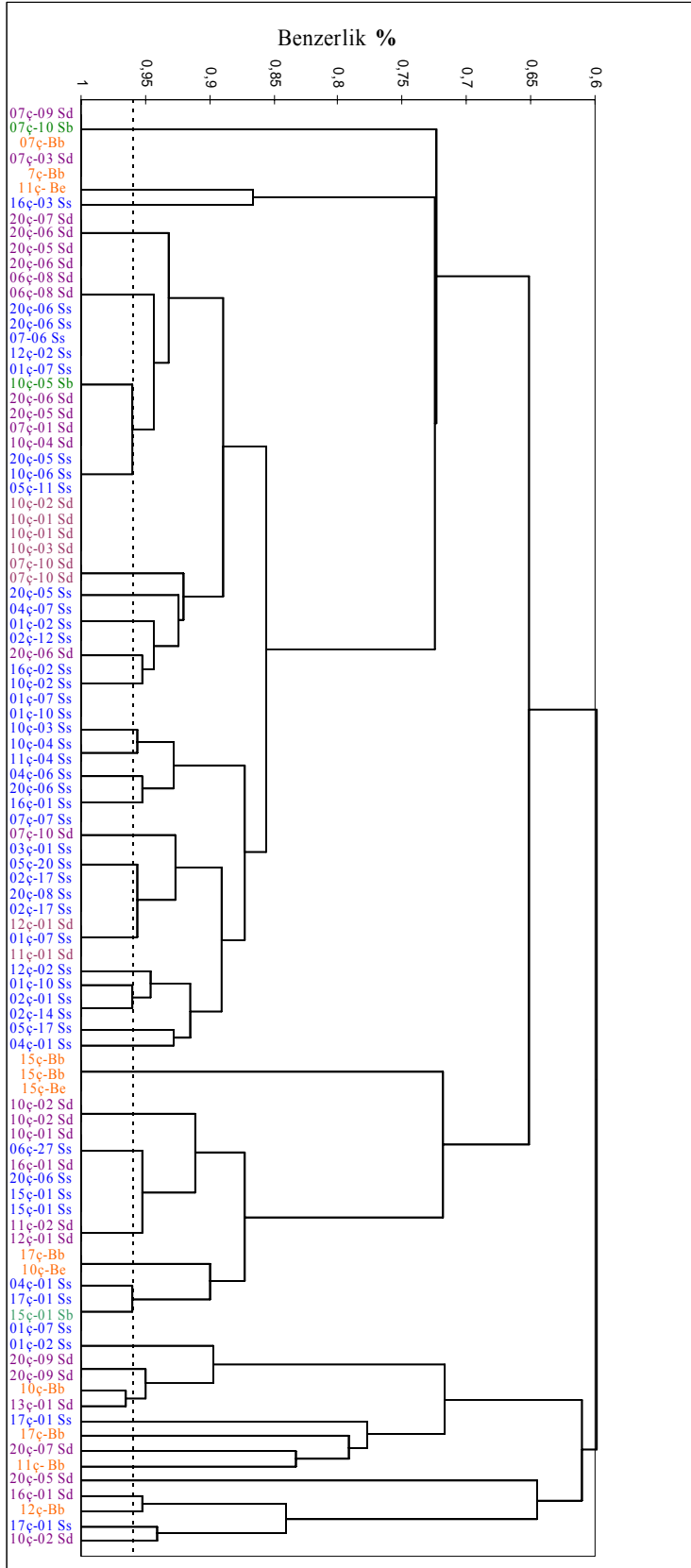
D grubunda, 2 bakıcı burun mukozası ve 1 bakıcı el derisi kökenli olmak üzere (3) izolatların % 3,1'i yer almaktadır. Aynı bakıcıdan köken almaktadır. E grubunda, 1 bakıcı el derisi ve 1 inek meme başı derisi kökenli (2) olmak üzere izolatların %2,1'i bulunmaktadır. Bu izolatlar iki farklı çiftlikteki bakıcılara aittir. G grubunda, 3 inek meme başı derisi, 1 inek sütü ve 1 bakıcı burun mukozası kökenli olmak üzere (5) izolatları %5,2'si bulunmaktadır. Bu izolatlar farklı çiftliklerden köken almaktadır. E, L ve M gruplarında iki izolat bulunmakta ve izolatlar farklı çiftliklerden izole edilen bakıcı ve inek kökenlidirler. F, H, I, J ve K gruplarında ise sadece 1 izolat yer almaktadır.

İnek kökenli izolatların çoğunluğunun %58,3'ünün (56 adet) A grubunda yer alması, 12 farklı çiftlikten izole edilmeleri ve bu grupta bakıcı kökenli hiçbir izolatın bulunmaması nedeniyle *S. aureus* izolatlarının bakıcı ve inekler arasında bulaşmadığı söylenebilir. Ancak ineklerde mastitislere neden olan *S. aureus* izolatlarının inek meme başı derisi ve meme dokusu içerisinde yerleştiği gösterilmiştir.

Mastitisli inek sütlerinden izole edilen *S. aureus* izolatları 6 ana gruba ve 24 farklı pulsotipe ayrıldı. A pulsotipi 10 işletmede de belirlenen yaygın bir *S. aureus* klonu olarak saptandı. İnek meme başı deri izolatları (35) 18 farklı pulsotipe, bakıcılardan elde edilen *S. aureus* izolatları ise (12) 8 farklı pulsotipe ayrıldı. B pulsotipi 4 işletmede belirlenirken, E, F, G ve M pulsotipleri yalnızca bir işletmede saptandı. Ayrıca bir işletmede en fazla dört farklı pulsotip belirlendi. Bir işletmede üç pulsotip, iki işletmede iki pulsotip ve yedi işletmede ise bir pulsotip belirlendi.

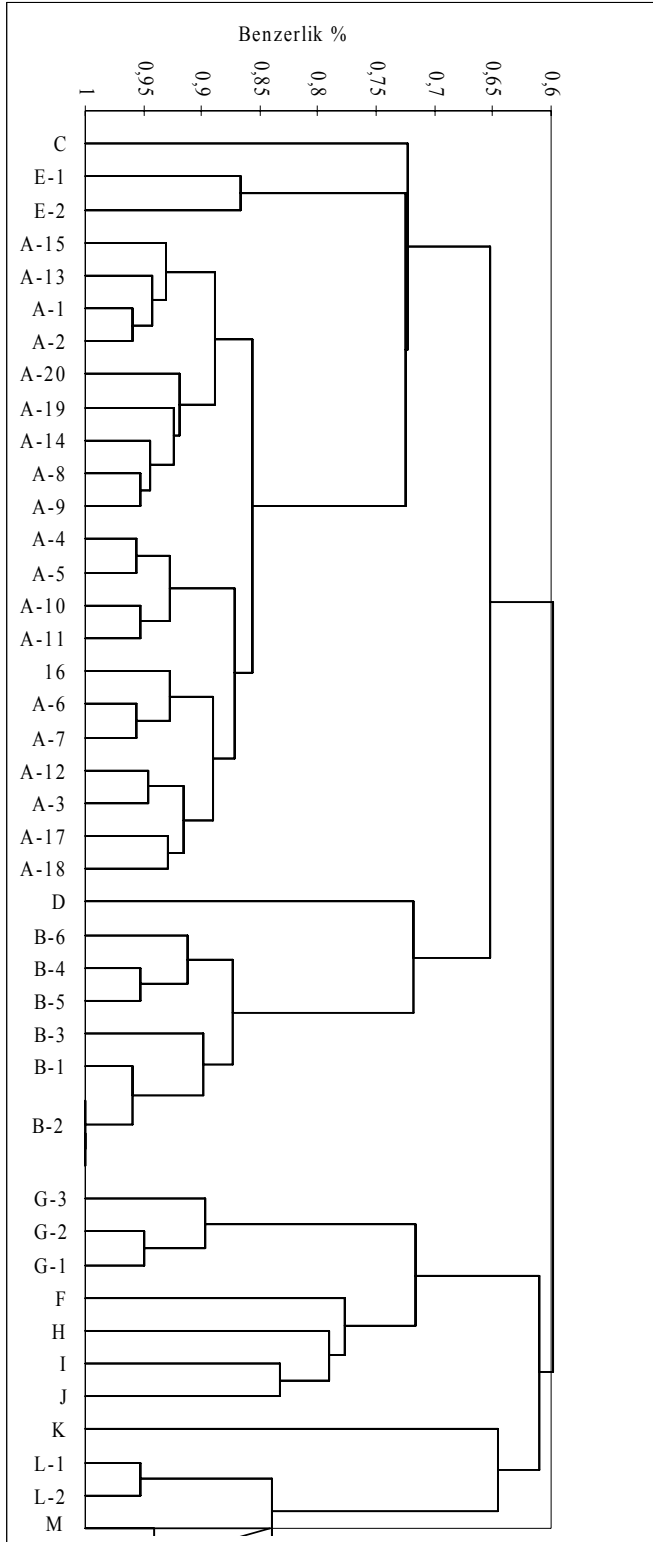
Araştırmanın sonucunda Kırıkkale ve çevresinde çeşitli süt sığırcılığı işletmelerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının çoğunluğunun (%58,3) A grubunda yer alması, A pulsotipinin 12 farklı işletmede belirlenmesinden dolayı, mastitislerden sorumlu *S. aureus* izolatlarının aynı veya yakın ilişkili klonlarının yaygın olduğunu göstermektedir.

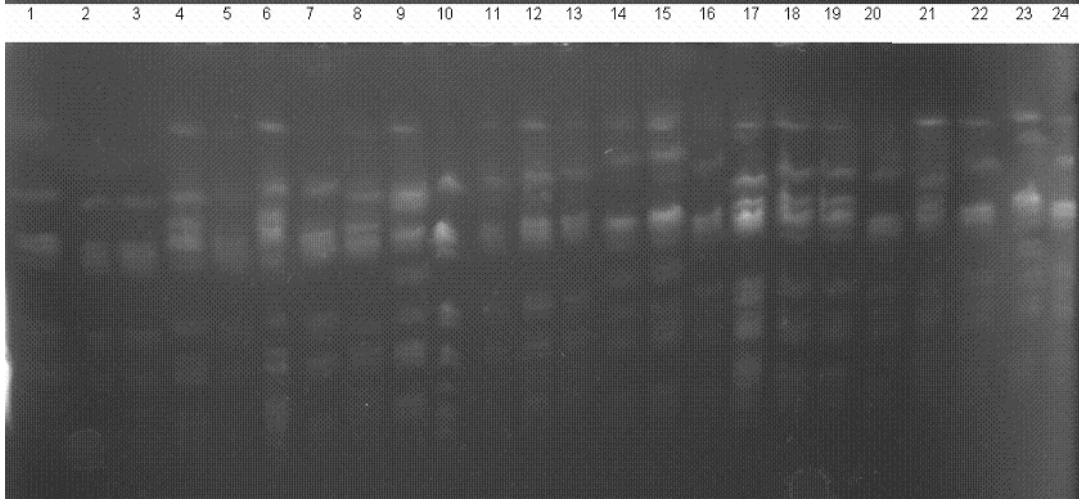
Şekil 3.1. 96 *S. aureus* izolatına ait dendogram



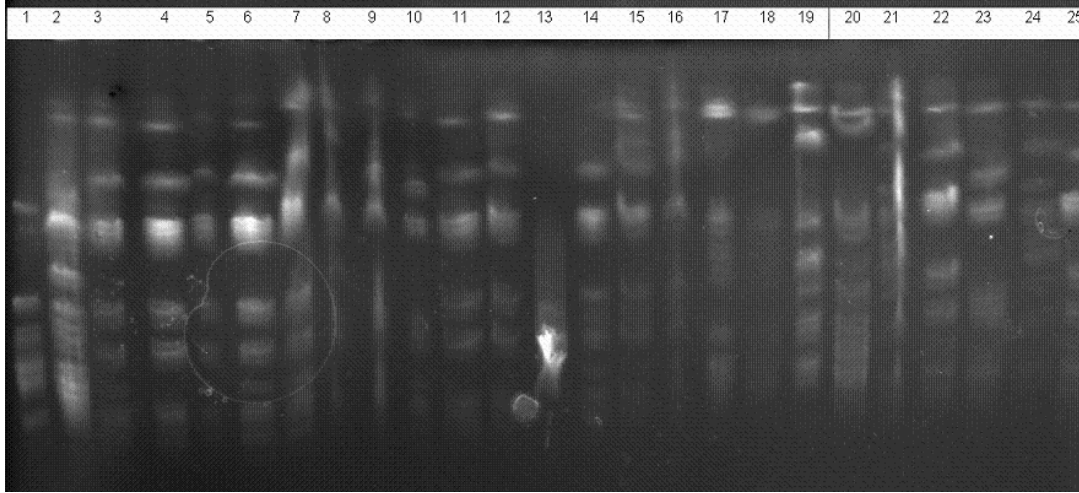
1ç: Birinci çiftlik, Sd: Sığır deri, Sb: Sığır burun, Ss: Sığır süt, Bb: Bakıcı burun, Be: Bakıcı el,

Şekil 3. 2. 96 *S. aureus* izolatlarının oluşturduğu gruplara ait dendrogram

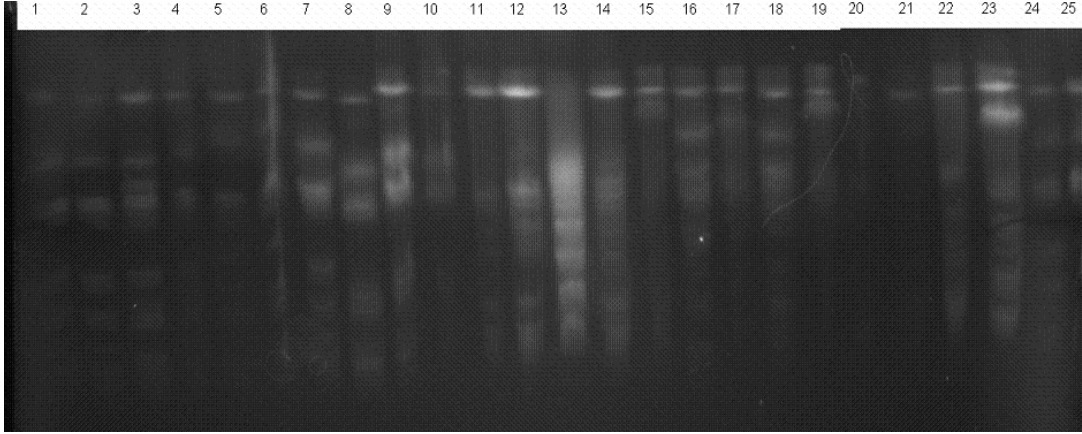




Resim 3.5’de *S.aureus* izolatlarının *SmaI* enzimi ile kesilmiş PFGE paternleri görülmektedir. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 21, 24 A klonundaki, 14, 15 ve 23’de ise B klonundaki süt kökenli izolatların makrorestriksiyon görüntüleri yer almaktadır.



Resim 3. 6’ da 2, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 14, 15, 16, 19, 22, 25. A, 17,18 D, 20 H, 23 C, 24’de B klonuna ait patern görüntüleri yer almaktadır. 7, 8, 9, 21 tekrar edildi. 13 Marker



Resim 3. 7’de 1, 2, 3, 4, 25: aynı pulsotip olup A klonu, 5, 6, 7: B klonu, 8, 9, 10: C klonu, 11, 12: D klonu, 13 Marker, 14 E klonu, 15, H klonu, 16, 17, 18 G klonu, 19 F klonu, 20, 24 M klonu, 21, K klonu, 22 I klonu, 23 J klonuna ait pulsotip görüntüleridir.

Çalışmada incelenen 96 *S. aureus* izolatının, antibiyotik direnç özellikleri, plazmid profilleri ve pulsotipleri Tablo 3. 9’da verilmektedir. A klonunda bulunan 56 izolatın %44,6’sının (25) tek plazmid taşıdığı ve bunların 15 tanesinin penisiline, 2 tanesinin tetrasikline, 4 tanesinin penisilin ve tetrasikline, 1 tanesinin penisilin ve eritromisine, 1 tanesinin penisilin, tetrasiklin ve eritromisine dirençli olduğu ve iki tanesinin de incelenen tüm antibiyotiklere duyarlı olduğu belirlendi. A klonunda bulunan izolatların % 23,2’sinin (13 tane) iki plazmid taşıdığı ve bunların 3 tanesinin penisilin ve 10 tanesinin penisilin ve tetrasikline dirençli olduğu belirlendi. A klonunda bulunan izolatların % 14,3’ünün (8 tane) 3 plazmid taşıdığı ve 1 tanesinin penisilin dirençli, 5 tanesinin penisilin ve tetrasiklin, 1 tanesinin tetrasiklin ve eritromisine dirençli olduğu ve 1 tanesinin de incelenen tüm antibiyotiklere duyarlı olduğu belirlendi. A klonunda bulunan izolatların %7,1’inin (4 tane) 4 plazmid taşıdığı ve bunların 2 tanesinin penisiline ve 2 tanesinin penisilin ve tetrasikline dirençli olduğu belirlendi. B klonunda bulunan 16 izolatın %37,5 ‘inin (6 tane) tek plazmid taşıdığı ve 3 tanesinin penisiline, 2 tanesinin penisilin ve tetrasikline dirençli olduğu ve 1 tanesinin de test edilen tüm antibiyotiklere duyarlı olduğu belirlendi. B klonunda bulunan izolatların %37,5’inin (6 tane) 2 plazmid taşıdığı ve bunların 5 tanesinin penisilin ve tetrasikline dirençli, 2 tanesinin tüm antibiyotiklere duyarlı olduğu belirlendi.

B klonunda bulunan izolatların %18,8 'inin (3 tane) dört plazmid taşıdığı ve bunlarında 1'inin penisiline, 1'inin penisilin ve terasikline dirençli ve 1 tanesinde incelenen antibiyotiklerin tümüne duyarlı olduğu belirlendi.

C klonunda bulunan 5 izolatın %40'ının (2 tane) tek plazmid taşıdığı ve bunların 1 tanesinin penisilin ve tetrasiklin, 1 tanesinde penisilin, tetrasiklin ve eritromisine dirençli olduğu belirlendi. C klonunda bulunan 5 izolatın %60'ının (3 tane) 3 plazmid taşıdığı ve 3 tanesinin penisilin ve tetrasikline dirençli olduğu belirlendi.

D klonunda bulunan 3 izolatın %66,7'sinin (2 tane) 3 plazmid taşıdığı ve bu izolatların 1'inin penisilin ve tetrasikline 1'inde penisilin, tetrasiklin ve eritromisine dirençli olduğu belirlendi. D klonunda bulunan 3 izolatın %33,3'ünün (1 tane) 1 plazmid taşıdığı ve izolatın penisilin, tetrasiklin ve eritromisine dirençli olduğu belirlendi.

E, L ve M pulsotiplerinde, 12kb'lık tek plazmid taşıyan ikişer izolat bulunmaktadır.

F, H, I, J ve K pulsotiplerinde inek süt kökenli, 12 kb'lık tek plazmid taşıyan birer izolat bulunmaktadır.

G pulsotipinde, 3 tane inek meme başı derisinden izole edilen, 1 bakıcı burun kökenli ve 1 inek süt kökenli 5 izolat bulunmaktadır. Bunlardan 3 tanesi 12 kb'lık tek plazmid taşımaktadır ve penisilin dirençlidir. 2 tanesinde plazmid bulunmamaktadır. Ancak bakıcı burun kökenli, plazmid taşımayan izolat penisilin, eritromisin enrofloksasin ve oksasiline dirençlidir.

Tablo 3.9. 96 *S. aureus* izolatının, antibiyotik direnç özellikleri, plazmid profilleri ve pulsotipleri

İzolat no	İzolat	Plazmid grubu	Pulsotip	Plazmid sayısı	Büyüklik	Antibiyotik direnç özelliği
14	20Ç-06 Sd	P9	A-01	-	-	P
51	05Ç-11 Ss	P9	A-02	-	-	P, T
13	05Ç-20 Ss	P9	A-06	-	-	P
01	12Ç-01 Sd	P9	A-07	-	-	-
12	07Ç-07 Ss	P9	A-11	-	-	P
15	20Ç-06 Ss	P9	A-11	-	-	P
16	20Ç-06 Ss	P9	B-04	-	-	P
61	10Ç-Bb	P9	G-01	-	-	P,E;Enr, Ox
07	20Ç-09 Sd	P9	G-03	-	-	P
75	10Ç-04 Sd	P2	A-01	2	5 kb,10 kb	P,T
77	10Ç-05 Sb	P2	A-01	2	5 kb,10 kb	P,T
43	20Ç-05 Ss	P2	A-02	2	5 kb,10 kb	P
73	10Ç-03 Sd	P2	A-02	2	5 kb,10 kb	P,T
74	10Ç-03 Ss	P2	A-04	2	5 kb,10 kb	P,T
76	10Ç-04 Ss	P2	A-05	2	5 kb,10 kb	P,T
79	11Ç-04 Ss	P2	A-05	2	5 kb,10 kb	P,T
78	11Ç-01 Sd	P2	A-07	2	5 kb,10 kb	P,T
44	20Ç-06 Ss	P2	A-13	2	5 kb,10 kb	P
42	20Ç-05 Sd	P2	A-15	2	5 kb,10 kb	P
69	07Ç-10 Sd	P2	A-20	2	5 kb,10 kb	P,T
70	07Ç-10 Sd	P2	A-20	2	5 kb,10 kb	P,T
08	15Ç-01 Sb	P2	B-02	2	5 kb,10 kb	-
55	16Ç-01 Sd	P2	B-04	2	5 kb,10 kb	P, T
93	10Ç-01 Sd	P2	B-04	2	5 kb,10 kb	P,T
88	07Ç-Bb	P3	C	3	5 kb,12 kb ,19 kb	P,T
20	01Ç-07 Ss	P1	A-01	1	12 kb	P
29	07Ç-01 Sd	P1	A-01	1	12 kb	P
91	10Ç-06 Ss	P1	A-02	1	12 kb	P,T, E
25	01Ç-10 Ss	P1	A-03	1	12 kb	P
94	02Ç-14 Ss	P1	A-03	1	12 kb	T
95	02Ç-01 Ss	P1	A-03	1	12 kb	T
21	01Ç-07 Ss	P1	A-07	1	12 kb	P
22	01Ç-07 Ss	P1	A-09	1	12 kb	P
26	01Ç-10 Ss	P1	A-09	1	12 kb	P
30	10Ç-02 Ss	P1	A-09	1	12 kb	P
36	16Ç-02 Ss	P1	A-09	1	12 kb	P
04	04Ç-06 Ss	P1	A-10	1	12 kb	-
35	16Ç-01 Ss	P1	A-11	1	12 kb	P
40	20Ç-06 Ss	P1	A-13	1	12 kb	P

Tablo 3.9.Devamı

İzolasyon no	İzolasyon	Plazmid grubu	Pulsotip	Plazmid sayısı	Büyüklik	Antibiyotik direnç özelliği
62	07Ç-06 Ss	P1	A-13	1	12 kb	P,T
66	06Ç-08 Sd	P1	A-13	1	12 kb	P,T
67	06Ç-08 Sd	P1	A-13	1	12 kb	P,T
05	04Ç-07 Ss	P1	A-14	1	12 kb	-
18	01Ç-02 Ss	P1	A-14	1	12 kb	P
27	02Ç-12 Ss	P1	A-14	1	12 kb	P
39	20Ç-06 Sd	P1	A-15	1	12 kb	P
41	20Ç-06 Sd	P1	A-15	1	12 kb	P
54	20Ç-07 Sd	P1	A-15	1	12 kb	P, T
60	05Ç-17 Ss	P1	A-17	1	12 kb	P,E
34	04Ç-01 Ss	P1	A-18	1	12 kb	P
24	01Ç-07 Ss	P1	B-02	1	12 kb	P
31	17Ç-Bb	P1	B-03	1	12 kb	P
28	06Ç-27 Ss	P1	B-04	1	12 kb	P
03	12Ç-01 Sd	P1	B-05	1	12 kb	-
68	11Ç-02 Sd	P1	B-05	1	12 kb	P,T
64	10Ç-02 Sd	P1	B-06	1	12 kb	P,T
63	07Ç-09 Sd	P1	C	1	12 kb	P,T
92	07Ç-Bb	P1	C	1	12 kb	P,T, E
57	15Ç-Bb	P1	D	1	12 kb	P, T, E
58	11Ç- Be	P1	E-01	1	12 kb	P, T, Ox
37	16Ç-03 Ss	P1	E-02	1	12 kb	P
11	17Ç-01 Ss	P1	F	1	12 kb	P
33	13Ç-01 Sd	P1	G-02	1	12 kb	P
17	20Ç-09 Sd	P1	G-03	1	12 kb	-
19	01Ç-02 Ss	P1	G-04	1	12 kb	P
32	17Ç-Bb	P1	H	1	12 kb	P
23	01Ç-07 Sd	P1	I	1	12 kb	P
59	11Ç- Bb	P1	J	1	12 kb	P, T,E, Ox
02	07Ç-05 Sd	P1	K	1	12 kb	-
52	16Ç-01 Sd	P1	L-01	1	12 kb	P, T
53	12Ç-Bb	P1	L-02	1	12 kb	P, T
06	17Ç-01 Ss	P1	M	1	12 kb	-
65	10Ç-02 Sd	P1	M	1	12 kb	P,T
80	15Ç-01 Ss	P6	B-04	2	3 kb, 10 kb	P,T
81	15Ç-01 Ss	P6	B-04	2	3 kb, 10 kb	P,T
82	02Ç-17 Ss	P4	A-06	3	1,8 kb, 2 kb, 10 kb	P,T
96	02Ç-17 Ss	P4	A-06	3	1,8 kb, 2 kb, 10 kb	T, E
72	10Ç-01 Sd	P2	A-02	2	5 kb, 10 kb	P,T

Tablo 3.9.Devamı

İzolat no	İzolat	Plazmid grubu	Pulsotip	Plazmid sayısı	Büyükük	Antibiyotik direnç özelliği
71	10Ç-Be	P2	B-03	2	5 kb, 10 kb	P,T
85	10Ç-01 Sd	P3	A-02	3	5 kb,12 kb, 19 kb	P,T
83	07Ç-10 Sd	P3	A-16	3	5 kb,12 kb, 19 kb	P,T
56	07Ç-03 Sd	P3	C	3	5 kb,12 kb, 19 kb	P, T
84	07Ç-10 Sb	P3	C	3	5 kb,12 kb, 19 kb	P,T
46	20Ç-06 Sd	P5	A-08	3	7 kb, 8 kb, 12 kb	P
45	15Ç-Bb	P5	D	3	7 kb, 8 kb, 12 kb	P
86	10Ç-02 Sd	P3	A-02	3	5 kb, 12 kb, 19 kb	P,T
87	20Ç-08 Ss	P3	A-06	3	5 kb, 12 kb, 19 kb	P,T
09	12Ç-02 Ss	P3	A-13	3	5 kb, 12 kb, 19 kb	-
50	15Ç-Be	P3	D	3	5 kb, 12 kb, 19 kb	P, E
89	03Ç-01 Ss	P8	A-06	4	3 kb, 8 kb, 12 kb, 16 kb	P,T
10	12Ç-02 Ss	P8	A-12	4	3 kb, 8 kb, 12 kb, 16 kb	-
47	04Ç-01 Ss	P8	B-01	4	3 kb, 8 kb, 12 kb, 16 kb	P
90	10Ç-02 Sd	P8	B-06	4	3 kb, 8 kb, 12 kb, 16 kb	P,T
48	20Ç-05 Sd	P7	A-01	4	7 kb, 8 kb, 12 kb, 19 kb	P
49	20Ç-05 Ss	P7	A-19	4	7 kb, 8 kb, 12 kb, 19 kb	P
38	17Ç-01 Ss	P7	B-02	4	7 kb, 8 kb, 12 kb, 19 kb	-

P: penisilin, T: tetrasiklin, E: eritromisin, Ox: oksasilin, Enr: enrofloksasilin **01Ç-02 Ss:** Birinci çiftlik, ikinci sığır süt, **01Ç-07 Sd:** Birinci çiftlik, yedinci sığır deri, **07Ç-10 Sb:** Yedinci çiftlik, onuncu sığır burun, **10Ç-Bb:** Onuncu çiftlik, bakıcı burun, **15Ç-Be:** Onbeşinci çiftlik, bakıcı el.

4.TARTIŞMA VE SONUÇ

Stafilokoklar, hayvanlarda ve insanlarda önemli enfeksiyonlara neden olmaktadır. *S. aureus*, bütün dünyada süt ineklerinde görülen mastitisin en önemli nedenidir. İnsanlarda ise nozokomiyal ve toplum kaynaklı enfeksiyonlara neden olurlar. Ayrıca, son yıllarda MRSA izolatlarının sıklığında meydana gelen artışlar, stafilokok enfeksiyonlarının ve antibiyotiklere karşı mikroorganizmalardaki direnç gelişiminin kontrolü için etkili stratejiler geliştirmek gereğini ortaya çıkarmıştır. Bu nedenle, *S. aureus* epidemiyolojisinin, patogenezinin ve popülasyon genetiğinin iyi bilinmesi gerekmektedir.

Bu çalışmanın amacı Kırıkkale ve çevresinde bulunan süt sığırcılığı işletmelerindeki ineklerin meme başı derileri, burunları, sütleri ile bakıcılarının deri ve burunlarından izole edilen *S. aureus* izolatlarının fenotipik ve genotipik özelliklerini araştırmaktır. Bu amaçla izole edilen 96 *S. aureus* izolatının çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıkları, plazmid profil analizleri ve makrorestriksiyon analizleri yapıldı.

Türkiye’de değişik bölgelerde yapılan çalışmalarda mastitisli inek sütlerinden %28-73 arasında değişen oranlarda *S. aureus* izole edilmiştir (Arda ve İstanbulluoğlu 1980, Aydın ve ark. 1995, Türütoğlu ve ark. 1995, Şahin ve ark. 1997, Kuyucuoğlu ve Uçar 2001, Rişvanlı ve Kalkan 2002, Beytut ve ark. 2002, Yavuz ve Esenal 2002, Kırkan ve ark. 2005). Bu çalışmada ise mastitisli inek sütlerinden %61 (74 adet) ve CMT negatif süt örneklerinden %6,8 (21) oranında stafilokok izole edildi. İzole edilen stafilokokların ise % 48,4’ü (46) *S. aureus* olarak tanımlandı.

Bu çalışmada elde edilen verilere göre sütlerden izole edilen stafilokokların %51,2’sini (46 adet) KNS’lar oluşturmaktadır. Bu stafilokoklarında %15,7’si (15) *S. haemolyticus*, %8,4’ü (8) *S. epidermidis*, %6,3 ‘ü (6) *S. lugdunensis*, %6,3’ü (6) *S. warneri*, %4,2’si (4) *S. saprophyticus*, %4,2’si (4) *S. simulans*, %2,1’i (2) *S. cohnii spp.cohnii*, %1’i (1) *S. capitis*, %1’i (1) *S. hyicus*, %1’i (1) *S. intermedius*, %1’i (1) *S. lentus* olarak belirlendi. Sütlerden 11 farklı stafilokok türü tanımlandı. Hadimli ve ark. (2001) mastitisli inek sütlerinden *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. chromogenes*,

S.saprophyticus, *S. caprea* olmak üzere beş farklı tür KNS tanımlamışlardır. Kırkan ve arkadaşlarının (2005) Aydın bölgesinde yaptıkları çalışmada ise mastitisli inek sütlerinden %20 oranında KNS izole etmişler ve izole ettikleri KNS'lar arasında *S. hyicus*, *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. sciuri*, *S. lentus*, *S. cohnii* *spp.cohnii* olmak üzere yedi farklı tür belirlemişlerdir. Son yıllarda KNS'ların oluşturduğu enfeksiyonların sıklığı hem insan hekimliğinde hem de veteriner hekimlikte artmaktadır.

Stafilokokların tanımlanmasında çok sayıda biyokimyasal testin yapılma gerekliliği, zaman alması ve daha az patojen olarak düşünölmeleri nedeniyle son yıllara kadar yapılan çalışmalarda koagölaz pozitif stafilokoklar *S. aureus* olarak diğer stafilokoklar da *S. epidermidis* veya KNS olarak tanımlanmaktaydı. Ancak günümüzde geliştirilmiş olan hızlı ve pratik tanı kitleri kullanılarak stafilokok türlerinin tanımlanması kısa sürede, pratik bir şekilde yapılabilmektedir. Bu çalışmada da çok sayıda farklı KNS türünün tanımlanmış olması stafilokok türlerinin tanımlanmasında "BD BBL Crystal™ Identification Systems Gram-Positive ID Kit" (Becton Dickinson-ABD) kullanılmasından kaynaklanmaktadır. Geleneksel biyokimyasal testlerle saf olarak izole edilmiş stafilokokların tür düzeyinde tanımlanması bir haftadan daha uzun sürebilen, zahmetli ve çok sayıda test gerektirirken hazır kitlerle bu süre 24 saate kadar inebilmektedir. Yurt dışında bu kitler hem Veteriner Hekimlikte hem de Tıp alanında yaygın olarak kullanılmakta ancak ölkemizde Tıp alanında yaygın olarak kullanılmasına karşın Veteriner Hekimlik alanında pahalı olmalarından ve belirli bir raf ömürlerinin olmalarından dolayı sınırlı kullanılmaktadır.

Çalışmada süt sığırıcılığı işletmelerindeki ineklerin meme başı derilerinden %51.1 oranında (223 adet) stafilokok izole edildi. Bu stafilokokların %23,3'ü (52 adet) *S. haemolyticus*, %15,6'sı (35) *S. aureus* olarak tanımlandı. İneklerin meme başı derilerinde en yüksek oranda %23,3 (52 adet) oranında *S. haemolyticus* izole edilirken ikinci sırada %15,6 (35 adet) oranında *S. aureus* izole edildi. Daha önceki çalışmalarda inek derisinden (Nagase ve ark. 2002) ve ineklerin meme başı derilerinden (Zadoks ve ark. 2002) *S. aureus* izole edilmiştir. Ancak ineklerin meme başı derilerinde diğer stafilokok türlerinin izolasyon oranları ile ilgili bir çalışmaya yaptığımız literatür

taramasında rastlanmadı. Yine çalışmada ticari hazır tanı kiti kullanılarak ineklerin meme başı derilerinden 17 farklı stafilokok türü tanımlandı.

İneklerin burun sürüntü örneklerinden %45 (98 adet) oranında stafilokok izole edildi. İneklerin burunlarından en çok %23,4 (23) oranında *S. haemolyticus* izole edilirken %15,3 (15) oranında *S. xylosum* ikinci sırada en çok izole edilen stafilokok türü oldu. Sonra sırasıyla, %8,1 (8) oranında *S. equorum*, %8,1 (8) oranında *S. simulans*, %8,1 (8) oranında *S. warneri* izole edildi. Sonuç olarak ineklerin burunlarından 15 farklı stafilokok türü izole edildi. İnek burnunda *S. aureus* taşıyıcılığı %3 (3) olarak belirlendi. Yine yaptığımız literatür taramasında inek burunlarında *S. aureus* taşıyıcılığı ile ilgili bir çalışmaya rastlanmadı.

Sağlıklı bireylerin burun florasında %20-55 oranında *S. aureus* taşınmaktadır (Nouwen ve ark. 2001). Ancak yapılan bu çalışmada az sayıda örnek incelendiği için (12 bakıcı) bu konuyu doğrulayıcı bir yüzde verilemedi. Tıp alanında, özellikle hastane enfeksiyonlarının bulaşmasında insan burnunda *S. aureus* taşıyıcılığı oldukça önemlidir. Ancak, yaptığımız literatür taramasında ineklerin burunlarında *S. aureus* taşıyıcılığı ile ilgili bir çalışmaya rastlanmadı. Veteriner Hekimlikte mastitislere neden olan *S. aureus* izolatları ile ilgili çalışmalar sadece mastitisli hayvanların sütleriyle sınırlı kalmıştır. *S. aureus* enfeksiyonlarından korunmak için bakıcıların ve ineklerin kendi floralarındaki portörlük rolünün de araştırılması gerekmektedir. Çalışmamızın gerçek hedefi bu olmadığından sınırlı sayıda inek burun taraması yapılmıştır. Ancak elde edilen sonuçlar mastitis epidemiyolojisinde ineklerin burun florası ve meme başı derisindeki stafilokokların rolünün daha detaylı incelenmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır.

İneklerin sütlerinden en yüksek oranda *S. aureus* izole edilirken ikinci sırada *S. haemolyticus* tanımlanmıştır. İneklerin meme başı derilerinden ise ilk sırada *S. haemolyticus*, ikinci sırada *S. aureus* izole edilmiştir. İneklerin burunlarından ilk sırada *S. haemolyticus*, ikinci sırada *S. xylosum* tanımlanmıştır. İneklerin burunlarında *S. aureus* taşıyıcılığı %1,4 (3) olarak belirlenmiştir. İnek meme başı derisi ve sütlerinden izole edilen stafilokok oranları birbirine yakın bulunmuştur.

Antimikrobiyal direnç, son yıllarda Veteriner Hekimlik ve Tıp alanında ülkemizde ve dünyada önemli bir sorun haline gelmiştir. İlk antibiyotiğin kullanıma girmesinden bu yana 60 yıllık bir süre geçmiş olup gerek insan ve gerek Veteriner Hekimlik alanında pek çok bakteriyel enfeksiyonun tedavisinde ümit edilmeyen oranda başarılar elde edildi. Ancak, bakterilerde penisiline karşı başlayan direnç problemi zamanla kullanıma giren streptomisin (1947), tetrasiklin (1952), eritromisin (1955), vankomisin (1967) ve gentamisin (1972) gibi yeni antibiyotiklerde de görülmeye başlamış ve büyük ekonomik kayıplara neden olan endişe verici boyutlara ulaşmıştır. Bu gelişmelerin sonucu olarak günümüzde, antibiyotik dirençliliğinin kontrol altına alınması için başta WHO ve FAO olmak üzere ulusal ve uluslar arası sağ duyulu organizasyonlar bir çok global strateji çalışması ve sörveyans programını uygulamaya koymuştur (Avorn ve ark.2001).

Antibiyotiklerin hayvancılıkta kullanımlarının artmasıyla insan ve hayvanlarda ampisilin, streptomisin, kloramfenikol, sulfonamid, tetrasiklin antibiyotiklerine çoğul dirençli *Salmonella Thiphymurium DT104* suşunun oluşturduğu enfeksiyonların sıklığı, florokinolon dirençli *Campylobacter jejuni* suşlarının insanlarda ve kanatlılarda oluşturduğu enfeksiyonların sıklığı ve vankomisine dirençli enterokokların domuz ve kanatlılardan izolasyon oranları artmıştır. Bilindiği üzere hayvanların doğal florasında bulunan bakterilerden insan patojenlerine, gen aktarımı yoluyla direnç özellikleri geçebilmektedir. Gen aktarımı (gen flow) diye tanımlanan bu olgu vasıtasıyla insanlar için patojen özelliğe sahip pek çok bakteri, gerek tür içi gerekse türler arası gen aktarımları ile hayvan orjinli bakterilerden çeşitli antibiyotiklere karşı direnç özelliği kazanmaktadırlar. Örneğin hayvanlarda yemden yararlanmayı artırmak için nalidiksik asit, norsetrisin, avoparsin, virjinamisinin sürekli kullanımı, insanlarda tedavi amaçlı kullanılan eritromisin, oksitetrasiklin, vankomisin, kuinopristin/dalfopristine karşı direncin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Yine yem katkı maddesi olarak kullanılan avoparsin, vankomisin ile aynı grupta bulunan bir glikopeptid antibiyotiktir. Vankomisin ise beşeri hekimlikte MRSA'ların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Özellikle enterokoklar arasında vankomisin (VRE) direnci pek çok ülkede önemli bir halk sağlığı sorunudur. Avoporsin ile karşılaşmış hayvanlardan elde edilen gıdalarda VRE izole edilmektedir. Gelişmeyi arttırıcı olarak

hayvanlarda avoparsin kullanılan ülkelerde hayvansal gıdalardan ve hastanede yatmamış insanlardan VRE izole edilebilmektedir (Avorn ve ark.2001).

Yukarıda açıklanan nedenlerden dolayı son yıllarda ciddi boyutlara ulaşan antimikrobiyal dirençlilik sorunu gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde nozokomiyal ve toplum kökenli bakteriyel enfeksiyonların sonucu ölüm oranlarının artışlarına, tedavi sürelerinin uzamasına, hastanede kalış süresinin uzaması sonucu iş gücü kaybına, yeni geliştirilmiş pahalı antibiyotiklerin kullanılma zorunluluğu gibi olumsuz etkilere yol açmaktadır. Veteriner Hekimlik alanında ise çoğul dirençli patojen bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonlar, gerek süt ve besi sığırcılığı ve gerekse tavukçulukta önemli ekonomik kayıplara sebep olmakta, profilaktik ve yemden yararlanmayı artırmak amacıyla kullanılan çeşitli antibiyotiklerin oluşturdukları seleksiyon baskısıyla insan ve hayvan popülasyonları için büyük risk olan bir çok zoonotik ve komensal dirençli bakteri klonlarının gelişmesine neden olarak gelecekte insan ve hayvan popülasyonları için antibiyotik öncesi döneme dönüş riskini oluşturmaktadır. Ayrıca bakterilerde gelişen antibiyotik direnci, daha toksik, daha geniş spektrumlu ya da daha pahalı olan antibiyotiklerin kullanımına yol açmaktadır (Gür 2002).

Bu gelişmelerin sonucu, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı tarafından “Yem katkıları ve Premikslerin Üretimi, İthalatı, İhracatı, Satışı ve Kullanımı Hakkında Tebliğde Değişiklik Yapılmasına Dair Tebliğ (Tebliğ No: 2006/1) ile tüm antibiyotiklerin yem katkı ve premikslerde kullanımı yasaklanmıştır.

Arda ve İstanbulluoğlu (1980) Karacabey Harası, Çifteler Harası ve Lalahan Zootečni Araştırma Enstitülerinde yetiştirilen ineklerin sütlerinden *S. aureus* izole etmişler ve izole ettikleri stafilocokların penisiline %75, eritromisine %50, tetrasikline %70, gentamisine %60 oranlarında dirençli olduklarını tespit etmişlerdir. Aydın ve ark. (1995) Kars ilinde yaptıkları çalışmada *S. aureus* izolatlarında penisilin direnci %82, tetrasiklin direnci %67, enrofloksasin direnci %10 olarak belirlemişlerdir. Hadimli ve ark. (2001) Konya’da yaptıkları çalışmada penisilin direncini % 61,7 olarak belirlemişlerdir. Kırkan ve ark. (2005) stafilocoklarda penisilin direncini %95 bulmuşlar, kanamisine %15 direnç ve siprofloksasine %0 direnç belirlemişlerdir. Bu

çalışmada elde edilen sonuçlara göre Kırıkkale ve çevresinde çeşitli kaynaklardan izole edilen *S. aureus* izolatlarında penisilin direnci %85,4, tetrasiklin direnci %45,8, eritromisin direnci %8,3 olarak belirlenmiştir. Penisilin direncinin yüksekliği penisilin preparatlarının sığırlarda mastitis ve diğer enfeksiyonların tedavisinde 1960 yılından beri kullanılmasının bir sonucu olarak β -laktamaz enzimlerinin yayılımı ile ilişkili olabilir. Antibiyotik kullanımındaki artışı takiben direnç gelişiminde de bir artış gözlemlenmiştir. En fazla direnç penisilin, tetrasiklin ve eritromisin gibi antibiyotiklere karşı gelişmiştir (Rich, 2005).

Türkiye’de hayvanlarda tedavi amaçlı kullanılmak üzere penisilin G ve tetrasiklin preparatlarının 1960 yılında, makrolid grubu ise 1970 yıllarında ruhsatlandırılmıştır. Kinolon grubu antibiyotikler ise hayvanlarda kullanılmak üzere 1989 yılında ruhsatlanmıştır. β -laktamaza dirençli ilk ilaç kloksasin preparatı ise (meme içi preparat) 1993 yılında ruhsatlandırılmıştır. Dolayısıyla antimikrobiyal ilaçların kullanımı ile direnç gelişimi arasında bir paralellik olduğu düşünülebilir.

Antibiyotik kullanımı ve direnç arasındaki ilişki bir kaç çalışmadan elde edilen verilerle desteklenmektedir. Antibiyotik tüketim oranı yüksek olan ülkelerde dirençte yüksektir. Vintov ve ark. (2003) dokuz Avrupa ülkesi ve ABD’de mastitisli inek sütlerinden izole ve identifiye edilen 815 *S. aureus* izolatının çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıklarını incelemişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre, İskandinav ülkelerinde (Danimarka, Norveç, İsveç) penisilin direnci düşük, Amerika, İngiltere ve İrlanda gibi ülkelerde çok yüksek tespit edilmiştir. Bu farklılık, bu ülkelerde uygulanan antimikrobiyal politika farklılıklarından kaynaklanabilmektedir. İskandinav ülkelerinde diğer ülkelere nazaran daha sıkı antimikrobiyal politikalar vardır. Diğer Avrupa ülkelerinde ise penisilin direncinin orta seviyede olduğu vurgulanmıştır. Sabour ve ark. (2004) Kanada’da yaptıkları çalışmada penisilin direncini %9,9 olarak belirlemişlerdir. Antibiyotik direnç dağılımının lokal farklılık göstermesi, direnç gelişiminde etkili rol oynayan spesifik antibiyotiklerin kullanımının yansması olabileceğine değinmişlerdir. Direnç gelişimindeki ana faktörün antibiyotik kullanım sıklığı olduğunu belirtmişlerdir.

S. aureus tarafından oluşturulan sığır mastitislerinin tedavisinde, benzil penisilin (penisilin G) yaygın olarak kullanılan bir antibiyotiktir. Ancak bazı ülkelerde

mastitislere neden olan stafilokoklar arasında penisilin G direnci yaygın olup yaklaşık olarak izolatların yarısı dirençlidir. Yine antibiyotik uygulamalarına politik kısıtlamaların getirildiği bazı ülkelerde de penisilin G'ye direnç dikkati çekecek şekilde daha düşüktür. *S. aureus*'ların neden olduğu meme içi enfeksiyonların, özellikle de β -laktamaz üreten suşların oluşturdukları enfeksiyonlarda tedavi çoğunlukla başarısız olmaktadır. Bu nedenle, direnç tespiti hem antimikrobiyal ilaç seçimi için hem de prognozun değerlendirilmesi için gereklidir (Haveri ve ark. 2005a). Ülkemizde stafilokoklarda penisilin direnci yüksek olduğu için mastitislerin tedavisinde penisilin yerine Amoksisilin/klavulonik asit ve basitrasin/ tetrasiklin kombinasyonu preparatlar tercih edilmektedir.

Haveri ve ark. (2005) mastitisli ineklerden izole ettikleri *S. aureus*'larda penisilin G, sefalekssin, kloramfenikol, siprofloksasin, eritromisin, gentamisin, neomisin, oksasilin, trimetoprim/sulfametoksazol gibi antibiyotiklerin MİK değerlerini araştırmışlardır. β -laktamaz geni taşıyan stafilokokal plazmidler üzerinde çoğunlukla diğer antibiyotikler içinde direnç genleri kodlanmaktadır. Ancak bu çalışmada diğer antibiyotiklere direncin nadir fakat tetrasikline dirençli suşların çoğunluğunun penisiline de dirençli olduğunu tespit etmişlerdir. Sığır mastitislerinden izole edilen *S. aureus* izolatları arasında penisilin G'ye direnç yaygındır (Haveri ve ark. 2005a).

Moroni ve ark.'ı (2005) İtalya'da keçi sütlerinden izole ettikleri 28 *S. aureus* izolatının penisilin, makrolid, aminoglikozid ve tetrasiklin grubu antibiyotikler için MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerlerini belirlemişlerdir. Penisilin MİK₅₀ = 0,025 μ g/ml ve MİK₉₀ = 0,1 μ g/ml değerleri sınır değerin (Sınır değer=0,25) altında olduğu için incelenen izolatlar için en etkin antibiyotik olduğunu vurgulamışlardır. Sadece iki izolatta penisilin direnci tespit etmişlerdir. Ancak makrolid, aminoglikozid ve tetrasiklin grubu antibiyotiklerin MİK₉₀ değerlerinin sınır değerlerden yüksek olduğu için bu antibiyotiklerin zayıf etkili olduklarını belirtmişlerdir. Bu çalışmada da incelenen 96 *S. aureus* izolatının çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıkları MİK değerleri olarak belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre, sefalotin, eritromisin, trimetoprim-sulfametaksazol, rifampin, enrofloksasin, oksasilin, vankomisin, gentamisin ve linezolid izolatlarına karşı yüksek oranlarda etkin bulunmuştur. En az etkili antibiyotik ise penisilin olarak belirlenmiştir.

Uçan ve Aslan (2002) Konya bölgesinde yaptıkları bir çalışmada 75 *S. aureus* izolatından bir tanesinde metisilin direnci saptamışlardır. Kireçci ve Çolak (2002) Kars bölgesinde yaptıkları bir çalışmada sadece iki (%8,7) suşta MRSA tespit etmişlerdir. Hadimli ve ark. (2001) 78 *S. aureus* izolatının 14 tanesinin MRSA olduğunu bildirmişlerdir. Kırkan ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada 85 *S. aureus* izolatının oksasilin direncini %60 olarak belirlemişlerdir. Tüm bu çalışmalarda metisilin direncini oksasilin diski ile Kirby-Bauer Disk Difüzyon metodu ile belirlenmiştir. Bu çalışmada ise çeşitli kaynaklardan izole edilen 96 *S. aureus* izolatının metisilin direnci, oksasilin (1µg) diski, sefoksitin diski (30 µg) ile disk difüzyon metodu ve ayrıca oksasilinli agar tarama plağı ile değerlendirilmiş ve Etest metodu ile de MİK'leri belirlenmiştir. Günümüzde metisilin direncinin belirlenmesinde tek başına oksasilin diski yeterli kabul edilmemektedir. Sefoksitin diskinin kullanımı, MİK'lerin belirlenmesi ve *mecA* geninin varlığının da PCR ile doğrulanması gerekmektedir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre inek kökenli izolatların tümü metisiline duyarlı bulunmuş, ancak 12 bakıcı kökenli izolatın 3 tanesinde metisilin direnci belirlenmiştir. Metisiline dirençli suşlar sefalosporinler de dahil tüm β-laktam antibiyotiklere dirençlidirler. β-laktamazlara dayanıklı olan antibiyotiklere direnç gelişimi Veteriner Hekimlikte henüz bir sorun teşkil etmezken, bu antibiyotiklerin kullanımının artmasıyla birlikte direnç gelişimi görülebileceği belirtilmektedir. Bu nedenle mastitis tedavisinde metisilin direncinin önemli bir faktör olarak dikkate alınmasının yararlı olacağı düşünülmektedir.

Diğer taraftan, etkenlerin tanımlanmasında ve antibiyotik duyarlılık testleri yapılmadan veya reçetesiz gelişigüzel antibiyotiklerin kullanımı mastitise neden olan mikroorganizmalardaki antibiyotik direncinin artmasına neden olmakta ve enfeksiyonların tedavisini zorlaştırmaktadır. Üstelik antibiyotik kullanımı sırasında sütlerin atılmaması tüketici için de risk oluşturmaktadır. Hayvanlarda antibiyotik kullanımını sınırlayan uluslararası önemli baskıların amacı bakterilerdeki direncin hayvansal ürünlerle insan patojenlerine aktarılma riskini azaltmaktır (Nascimento 2005).

Veteriner Hekimlik alanında antimikrobiyal direncin kritik seviyelere doğru gelişmesi, büyük ekonomik kayıplara ve hayvan refahı problemlerine yol açar. Stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde antimikrobiyal ilaçların yerini karşılamada yeterli olmasalar bile aşılama, immun sistemin güçlendirilmesi, pre- ve pro-biotiklerin geliştirilmesi önemlidir. Çiftlik hayvanlarında antibakteriyal ilaçların kullanılması olası ilaç kalıntıları nedeniyle insanlar için risk oluşturmaktadır. Veteriner Hekimlik alanında anti bakteriyel ilaçların kullanımının makul düzeyde olması teşvik edilmelidir. Ancak böyle bir politikanın yürütülmesi saha koşullarında kolay değildir (Catry ve ark. 2003).

Hayvanların, insanlarda enfeksiyonlara neden olan MRSA için rezervuar olabileceği çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (Cefai ve ark. 1994, Middleton ve ark. 2005). Cefai ve ark. (1994) bir köpeğin, MRSA taşıdığını ve iki hemşireye iki kez bulaştırarak bu hemşirelerinde hastalarını bu etkenle enfekte etmelerine aracılık ettiğini rapor etmişlerdir. Michigan Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesine 13 aylık bir zaman periyodunda gelen 11 hasta attan nazokomiyal epidemiyeye neden olan MRSA suşları izole edilmiş ve bu suşlar PFGE ile tiplendirilmiştir (Seguin ve ark. 1999). Bu yayımla hayvan hastanelerinden rapor edilen ilk nazokomiyal enfeksiyon bildirilmiştir.

Bu çalışmada elde edilen antibiyotik duyarlılık sonuçlarına göre oksasilin dirençli 3 izolatın da insan kaynaklı olduğu ve yine dört ilaca dirençli iki izolatın insan kaynaklı olduğu belirlenmiştir. İneklerden izole edilen izolatların ise hepsinin oksasiline duyarlı olduğu ve en fazla üç ilaca dirençli sadece bir izolatın olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu veriler Tıp alanında Veteriner Hekimlik alanına göre direnç sorununun daha önemli boyutlarda olduğunu göstermektedir.

Ancak ülkemizde gerek Tıp ve gerek Veteriner Hekimlik alanında antimikrobiyal direnç sorunu üzerinde entegre sörveyans sistemleri oluşturulmalı, direnç özelliklerinin moleküler epidemiyolojisinin yeterli düzeyde açıklanabilmesi için daha çok sayıda moleküler çalışmalar yapılmalı ve direnç olgusunun kontrolü için gerekli stratejiler insan ve veteriner hekimlik alanında geliştirilip uygulamaya konmalıdır.

Tıp alanında ve Veteriner Hekimlik alanında *S. aureus*'un oluşturduğu enfeksiyonların epidemiyolojilerinin araştırılmasında plazmid profil analizine sıklıkla başvurulmaktadır (Baumgartner ve ark. 1984, Albay ve ark.1999, Lange ve ark. 1999, Sancak ve Günalp 2001, Şener ve ark. 2004, Aslantaş ve ark. 2005)

Plazmid profil analizi epidemiyolojik çalışmalarda DNA'ya dayalı yapılan ilk tiplendirme metotlarından biridir. Bu alanda plazmid analizi yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. İncelenen bakterinin plazmid ekstraksiyonu yapıldıktan sonra agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutulur. İzolatların taşıdıkları plazmid sayısı ve moleküler ağırlıkları belirlenerek suşlar birbirinden ayrılabilir (Weller 2000, Arbeit 2003).

Plazmid profil analizi hızlı, kolay ve tekrarlanabilirliği olan bir yöntemdir. Yapılması daha zor olan, zaman alan ve pahalı araç gereç gerektiren PFGE gibi tiplendirme yöntemleri her laboratuarda uygulanabilecek yöntemler değildir. Plazmid DNA'sının izolasyonunun hızlı ve kolay olması; ayrıca pek çok laboratuarda bu işlem için gerekli sistemlerin bulunabilmesi gibi nedenlerle bu tekniğin uygun olduğu düşünülmektedir (Sancak ve Günalp 2001). Ancak yine de bu yöntemin ülkemiz koşullarında Veteriner Hekimlik alanında *S. aureus* enfeksiyonlarının epidemiyolojilerinin araştırılmasında klinik laboratuarlarda yaygın olarak rutin uygulanmamaktadır. Plazmid profil analiz yöntemi bazı dezavantajlara sahiptir. *S. aureus* plazmidlerinin çok sabit olmaması yani plazmidlerini çabuk kaybedebilmeleri veya kazanabilmeleri nedeniyle aynı işletmeden izole edilen *S. aureus* suşları arasında küçük farklılıklar olmaktadır. Plazmid taşımayan suşların tiplendirilmesi yapılamayacağı gibi az sayıda (1-2) plazmid taşıyan suşlar için bu yöntemin ayırt etme gücü zayıftır

Baumgartner ve ark. (1984) inek mastitis olgularından izole ettikleri *S. aureus*'ların %75,2'sinde, Lange ve ark. (1999) mastitisli inek sütlerinden izole ettikleri *S. aureus* izolatlarının % 53,1'inde, Aslantaş ve ark. (2005) plazmid profillerini inceledikleri izolatların %94'ünde plazmid tespit etmişlerdir. Bu çalışmada ise plazmid

analizi yapılan suşların %88,5'inde plazmid tespit edildi. Plazmid izolasyon oranlarındaki farklılığın stafilokoklarda bulunan plazmidlerin stabil olmamalarından ve plazmidleri çabuk kaybedip kazanmalarından olabileceği kanısındayız.

Yapılan çeşitli çalışmalarda (Baumgartner ve ark. 1984, Lange ve ark. 1999, Aslantaş ve ark. 2005) plazmid tespit edilen izolatların çeşitli antibiyotiklere dirençli oldukları belirlenmiştir. *S. aureus* izolatlarındaki antibiyotik direncinin plazmidler üzerindeki direnç genleriyle kodlandığı vurgulanmıştır (Lyon ve Skurray 1987). Lange ve ark. (1999)' da 5 plazmid taşıyan bir izolatın incelenen tüm antibiyotiklere duyarlı olduğunu ve plazmid taşımayan üç izolatdan birinin kanamisine, ikisinde penisilin G/ampisiline dirençli olduklarını belirlemişler ancak izolatların tümü incelendiğinde plazmid taşımayan izolatların incelenen antibiyotiklerin tümüne duyarlı olduğunu belirlemişlerdir. *S.aureus* izolatları arasında antibiyotik direnç genlerinin plazmidle ilişkili olduğunu vurgulamışlardır. Bu çalışmada da benzer şekilde 4 plazmid taşıyan iki ve üç plazmid taşıyan bir izolatın incelenen tüm antibiyotiklere duyarlı oldukları belirlenmiştir. Ancak dirençli izolatların çoğunluğunun plazmid taşıması yine *S aureus* izolatlarında antibiyotik direnci ile plazmidler arasında bir bağlantının olduğunu desteklemektedir.

Baumgartner ve ark. (1984) *S. aureus* suşlarında virülans plazmidlerinin çok yaygın olmadığını var olan plazmidlerin antibiyotik direnç ile ilgili olduklarını belirtmişlerdir. Aslantaş ve ark.'nın (2006) yaptığı bir çalışmada 50 *S. aureus* izolatının 6 tanesinde (%12) plazmid taşıdığı halde incelenen tüm antibiyotiklere duyarlı olduğunu belirlemişlerdir. Yine bu çalışmada elde edilen verilere göre 10 tane (%10,4) *S. aureus* izolatının incelenen tüm antibiyotiklere duyarlı olmasına rağmen plazmid taşıdığı belirlendi ve *S. aureus* izolatlarının taşıdığı plazmidlerin hepsinin dirençle ilgili olmadığı belirlendi.

Bakıcılardan ve hayvanlardan izole edilen *S. aureus* suşlarının plazmid paternleri incelendiğinde. İncelenen bakıcı izolatları ile inek izolatlarının plazmid paternleri arasında bir ilişki belirlenemedi, yalnızca iki bakıcının ellerinden izole edilen *S. aureus* izolatları ile ilgilendikleri hayvanların süt ve meme başı derisinden izole

edilen *S. aureus* izolatlarının plazmid paternleri aynı bulunmuştur. Plazmid profil analizi ile inek ve bakıcılar arasında *S. aureus* izolatlarının bulaşmadığı söylenebilir.

Aynı ahırda birden fazla farklı plazmid paterninde izolat belirlendiği gibi farklı ahırlarda aynı plazmid paternine sahip izolatlarda belirlendi. Aynı ahırda bulunan hayvanlar arasında, bir hayvanın meme başı derisi ile süt izolatında ve burnundan izole edilen *S. aureus* izolatlarının aynı plazmid'lere sahip oldukları tespit edildi. Bu durumda plazmid profil analizi ile infekte hayvanların meme başı derilerinin, sütlerinin sağlıklı meme loblarına ve ahırdaki diğer sağlıklı hayvanlara *S. aureus* bulaşmasında önemli rol oynadıklarını düşünülebilir.

Bu çalışmada ve daha önce yapılan çalışmalarda (Goni ve ark. 2004, Sabour ve ark. 2004) genetik olarak yakın ilişkili olan izolatlarda farklı direnç profilleri belirlenmiştir. Bu durum izolatların direnç genlerini konjugasyon, transformasyon ve transdüksiyon mekanizmaları ile diğer organizmalardan, aynı veya farklı stafilocok türlerinden veya diğer gram pozitif bakterilerden gen transferi ile kazanmaları ile açıklanmaktadır.

Bu çalışmada Kırıkkale ve çevresinde süt sığırcılık işletmelerinde çeşitli materyallerden izole edilen *S. aureus* izolatlarının kromozomal DNA'larının makrorestriksiyon analizi yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre yapısal aynılık oranları değerlendirildi. PFGE paternleri, (pulsotip Goni ve ark.2004), *S. aureus* izolatları arasındaki genetik yapısal farklılıklara uygun olarak ortaya çıkmaktadır. Kırıkkale ve çevresinde bulunan süt sığırcılık işletmelerinde bir işletme içinde inek sütlerinden izole edilen *S. aureus* izolatları arasında 1, 2, 3 ve 4 farklı pulsotip bulunabilmektedir. Ancak ineklerin meme içine adapte olan dominant bir pulsotip varlığı belirlenmiştir. Bu çalışmada mastitisli inek sütlerinden izole edilen toplam 46 izolatın %76'sı (35 tane) tipA pulsotipi içerisinde bulunmuştur.

Zadoks ve ark. (2000) yaptıkları bir çalışmada süttten izole ettikleri 38 *S. aureus* izolatını 7 ana ve 4 alt pulsotipe ayırmışlar ve izolatlarının tümünü tiplendirmişlerdir. Üç pulsotip (A, F ve G) ve alt tipleri yalnızca bir sürüden, C, D ve E pulsotiplerini sırasıyla iki, üç ve dört sürüden izole etmişlerdir. Annemüeller ve ark. (1999)

Almanya’da subklinik mastitisli ineklerin sütlerinden izole ettikleri 25 *S. aureus* izolatını PFGE tekniği ile tiplendirmişler ve 5 pulsotip belirlemişlerdir. Pulsotip I, III ve IV’ün sırasıyla üç, dört ve üç farklı çiftlikte bulunduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Mastitisli inek sütlerinden izole edilen *S. aureus* izolatları 6 ana pulsotipe ayrılmıştır. A pulsotipi 10 işletmede de belirlenen yaygın bir *S. aureus* klonu olarak saptanmıştır. B pulsotipi 4 işletmede belirlenirken, E, F, G ve M pulsotipleri yalnızca bir işletmede saptanmıştır. C, D, H, I, J, K, L pulsotipleride süt kökenli izolatlar bulunmamaktadır. Bir işletmede en fazla dört farklı pulsotip belirlenmiştir. Bir işletmede üç pulsotip, iki işletmede iki pulsotip ve yedi işletmede ise bir pulsotip belirlenmiştir. Bu çalışmada yukarıda açıklanan çalışmaların sonuçlarına benzer sonuçlar elde edilmiştir. İneklerde mastitislere neden olan *S. aureus* klonları işletmelerin çoğunda bulunan yakın ilişkili klonlardır ve Kırıkkale ve çevresinde yaygındır.

Zadoks ve ark. (2000) 55 insan ve 38 sığır kökenli *S. aureus* izolatlarını “binary metod” ile tiplendirmişler ve 16 sığır ve 5 insan izolatını %90-95 oranlarında yakın ilişkili bulmuşlardır. Vautor ve ark. (2003) keçi sütlerinden üretilen peynirlerden izole edilen *S. aureus*’ larla sağım işlemi yapan insanların ellerinden izole edilen *S. aureus*’ların aynı pulsotipte bulunduğunu belirlemişler ve sağımçıların ellerinin bir çiftlikte *S. aureus* bulaşmasında rol alabildiklerini belirtmişlerdir. Bundan dolayı bazı *S. aureus* izolatlarının hem insan hem ineklerde kolonize olabileceklerini belirtmişlerdir. Hennekinne ve ark. (2003) kesimhanelerde kasap burunlarından, domuz, tavşan, kanatlı etlerinden, Veteriner fakültesi öğrencilerinden, domuz burunlarından, mastitisli inek sütlerinden ve kanatlılardan izole ettikleri 73 adet *S. aureus* izolatlarını makrorestriksiyon analizini yapmışlar ve 61 PFGE paterni belirlemişlerdir. Sığır kökenli suşların bir alt kümede toplandığını belirlemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre aynı türden köken alan suşların aynı pulsotip içerisinde yer aldıklarını ve pulsotip ile tür arasında yüksek korelasyon olduğunu belirlemişlerdir. Bizim çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre bakıcıların el ve burunlarından izole edilen *S. aureus* izolatları ile mastitisli ineklerin sütlerinden ve meme başı derilerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının benzer pulsotipte oldukları belirlenmiştir. Örneğin 7 nolu işletmede bakıcıdan izole edilen iki burun izolatının, aynı işletmede bulunan bir hayvanın meme başı derisinden ve yine aynı işletmedeki başka bir ineğin de burnundan izole edilen

S. aureus izolatlarının genetik olarak aynı oldukları belirlenmiş ve C pulsotipinde gruplandırılmıştır. Yine 10 nolu işletmedeki bakıcının elinden izole edilen izolatın aynı işletmedeki üç ineğin meme başı derisinden izole edilen izolatın ve 17 nolu işletmedeki bir bakıcının burun izolatı ile de aynı işletmedeki mastitisli inek sütünden izole edilen izolatın yakın ilişkili oldukları belirlendi. İnekler ve bakıcılardan izole edilen izolatların benzer olmaları sağım işlemi sırasında bakterilerin insanlardan hayvanlara ya da hayvanlardan insanlara geçebildiğini göstermektedir. Ancak ineklerin meme başı derisi ve sütlerinden izole edilen 56 adet (%58) izolatın A pulsotipinde tiplendirilmesi ve bu tipte hiç bakıcı kökenli izolatın bulunmaması *S. aureus* izolatlarının tür özgüllüğünün olduğunu ve yalnızca bazı *S. aureus* izolatlarının hem insan hem ineklerde kolonize olabileceklerini belirtmişlerdir.

Zadoks ve ark. (2002) yaptıkları bir çalışmada 70 adet inek meme başı derisi, 4 adet sağımçı eli, 34 adet sağım makinası ve 117 adet inek sütü kökenli *S. aureus* izolatlarını PFGE metodu ile tiplendirmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre inek meme başı derisinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının, inek sütü izolatlarından farklı, bakıcıların ellerinden izole edilen az sayıdaki izolatlarla ise aynı pulsotipte olduklarını belirlemişlerdir. İnsan izolatlarının inek meme başı derisine bulaşmasında süt sağım makinalarının rol alabileceğini ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada ise inek meme başı derisinden izole edilen *S. aureus* izolatları ile mastitisli inek sütlerinden izole edilen *S. aureus* izolatları genetik olarak yakın ilişkili bulunmuştur. Bu durumun bölgede elle sağımın yapıldığı küçük aile tipi işletmelerinin yaygın olmasından dolayı mastitisli ineklerin sütlerindeki patojen etkenlerin sağım işlemi sırasında meme başı derisine ve diğer hayvanlara bulaştığını göstermektedir. Ayrıca bu çalışmada süt sığırcılığı işletmelerinde, infekte ineklerin memelerinin sürüdeki diğer hayvanlara *S. aureus* bulaşmasında önemli rol oynayan ana rezervuar olduğu ve *S. aureus* bulaşmasında ineklerin meme başı derilerinin ve bakıcılarında bulaşmada rol oynadıkları da gösterilmiştir.

PFGE, ayırım gücü ve tekrarlanabilirliği yüksek olan güvenilir bir genotiplendirme metodudur. Bu yöntem tekrarlanabilirlik özelliğinin yüksek olması nedeniyle moleküler yöntemler içerisinde altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak masraflı olması, pahalı ekipmanlara gerek olması, zaman alıcı olması, zahmetli

olması ve sonuçların yorumlanması zor olması gibi dezavantajları nedeniyle PCR metotlarının daha uygun olduğu vurgulanmaktadır (Lange ve ark. 1999, Zadoks ve ark. 2000).

Baumgartner ve ark. (1984) ile Lange ve ark. (1999) mastitisli sütlerden izole edilen *S. aureus* suşları üzerinde yaptıkları çalışmalarda çok sayıda plazmid taşımayan ve incelenen tüm antibiyotiklere duyarlı suşların varlığını ortaya koymuşlar ve bu nedenle antibiyotik tiplendirme, plazmid profil analizlerinin *S. aureus* suşlarının sınıflandırılmasında güvenilir metotlar olamayacaklarını ileri sürmüşlerdir. Bu çalışmada % 9,3 oranında plazmid taşımayan *S. aureus* suşunun varlığını belirledik ve yukarıdaki görüşleri doğrular nitelikte veriler elde ettik. Ayrıca 12 kb büyüklükte tek plazmid taşıyan izolatlar makrorestriksiyon analizi ile 13 farklı pulsotipe ayrıldı. Bundan dolayı PFGE tekniğinin ayırım gücünün plazmid analizine göre yüksek olduğu doğrulandı.

Stephan ve ark. (2001) tarafından yapılan çalışmada mastitisli ineklerden izole edilen 34 *S. aureus* izolatları PFGE analiz sonuçlarına göre 11 farklı pulsotipe ayrılmıştır. Makrorestriksiyon analiz sonuçlarına göre İsviçre’de mastitislerin yakın ilişkili *S. aureus* ‘lar tarafından oluşturulduğunu ve bunların geniş bir alana yayıldığını ortaya koymuşlardır. Annemüeller ve ark. (1999) inek mastitisli sütlerinden izole ettikleri 25 *S. aureus* izolatının makrorestriksiyon analizini yapmışlar ve Almanya’da ineklerde mastitise neden olan yaygın bir *S. aureus* klonunun olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmada da elde edilen makrorestriksiyon analiz sonuçları Kırıkkale ve çevresindeki ineklerden izole edilen *S. aureus* izolatlarında yaygın bir klondan köken aldıklarını göstermektedir.

Sonuç olarak, inek meme başı derisinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının mastitisli sütlerden izole edilenlerle yakın ilişkili olması patojenlerin yayılmasında meme başı derisinin ve mastitisli inek sütünün önemli rol oynadığını göstermektedir. Bu durum sağım işlemi sırasında enfekte meme loblarındaki patojenlerin meme başı derisine bulaşmasıyla ortaya çıkmaktadır. Bundan dolayı *S. aureus* izolatlarının epidemiyolojisinin araştırılmasında makineli sağım ile elle sağımın yapıldığı işletmelerde daha detaylı ve karşılaştırmalı çalışmalar yapılmalıdır. Ayrıca *S. aureus*

izolatlarının inek burnunda bulunma oranları daha geniş araştırmalarla ortaya konulmalıdır.

İnek kökenli *S. aureus* izolatlarının çeşitli antibiyotiklere karşı dirençleri incelendi ve en yüksek direnç penisiline, bunu takiben tetrasikline karşı belirlendi. Mastitisli inek sütlerinden izole edilen *S. aureus*'ların (n:46), penisiline duyarlılığı %19,5, tetrasikline duyarlılığı %26, eritromisin % 95,7 olarak belirlenirken diğer antibiyotiklere duyarlılık %100 olarak belirlendi. İneklerin meme başı derisi ve burun sürüntü örneklerinden izole edilen *S. aureus* (n:38) izolatlarının penisilin duyarlılığı %13,2, tetrasiklin duyarlılığı %50 olarak belirlenirken diğer antibiyotiklere tüm izolatlar duyarlı olarak belirlendi. Meme başı derisi ve süt kökenli izolatlar arasında antimikrobik ilaçlara duyarlılık yönünden önemli bir fark belirlenmedi. Ayrıca inek kökenli izolatlar arasında MRSA suşlarına rastlanmadı. Bundan dolayı ineklerden izole edilen stafilokoklarda antibiyotik direnç tehlikesi şimdilik sınırlı görünmektedir. Ancak diğer antibiyotiklere de direncin oluşmasını ve bakterilerdeki çoğul dirençliliğin engellenmesi için ülke genelinde çok merkezli sörveyans programları uygulanarak patojen ve indikatör bakterilerde direnç durumunun sürekli kontrol edilmesi gerekmektedir.

İneklerden izole edilen *S. aureus* izolatlarında belirlenen antibiyotik direncinin kromozom veya plazmid kaynaklı olup olmadığı bakterilerde ethidiyum bromid ile plazmid eliminasyonu sağlandıktan sonra direnç analizinin tekrar yapılması ile belirlenebilir.

Bu çalışmada, elde edilen verilere ek olarak ortaya konulan pulsotipin dizi analizlerinin yapılmasıyla *S. aureus* izolatlarının moleküler epidemiyolojisi daha aydınlatıcı hale getirilebilir. Ayrıca çalışmada elde edilen moleküler veriler, ülkemizin diğer bölgelerinde gerçekleştirilecek çalışmalardan elde edilecek verilerle birlikte değerlendirilerek mastitis enfeksiyonunun kontrolünde yararlanılacak etkili aşılar geliştirilebilir.

KAYNAKLAR

AARESTRUP FM, LARSEN HD and JENSEN NE (1999). Characterization of *Staphylococcus simulans* strains Isolated From Cases of Bovine Mastitis. *Vet. Microbiol.*, 66:165-170.

AKAY Ö, İZGÜR M, USLANOĞLU B, ve ERGANİŞ O (1987). Hastalıklı Piliçlerden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarının Kültürel- Biyokimyasal ve Biyolojik Karakterlerinin Belirlenmesi Üzerinde Bir Araştırma. *Ank. Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 34: 294-308.

ALBAY A, YILDIRAN T, SARAÇLI M A, KISA Ö, GÜNEY Ç.(1999). Nozokomiyal MRSA suşlarının plazmid profillerinin araştırılması. *Gülhane Tıp Dergisi*.41: 134-137.

ANNEMUELLER C, LAMMLER Ch, ZSCHOCK M. (1999) Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Vet. Microbiol* 69: 217-224.

Anonim 2006 a About Food Poisoning <http://www.vdacs.virginia.gov/foodsafety/poisoning.html>. 02.08.2006

Anonim 2006b xlstat statistic program <http://www.xlstat.com>.

ANTHONISEN IL, SUNDE M, STEINUM TM, SIDHU MS and SORUM H. (2002). Organization of the Antiseptic Resistance Gene *qacA* and Tn 552-Related β -Lactamase Genes in Multidrug-Resistant *Staphylococcus haemolyticus* Strains of Animal and Human Origins. *Antimicrobial Agents and Chemother.*, 46: 3606- 3612.

ARBEIT RD (1999). Laboratory Procedures for the Epidemiologic Analysis of Microorganisms. *Manual of Clinical Microbiology*. Ed. MURRAY P.R, BARON E.J, PFALLER M.A, TENOVER FC and YOLKEN R. H, 7rd ed, ASM press, Washington U.S.A. p: 116-137..

ARDA M ve İSTANBULLUOĞLU E (1980). Mastitislere Neden Olan Aerob, Anaerob, Mikoplazma ve Mantarların İzolasyonu, İdentifikasyonu, bunlara karşı Etkili Olan Antibiyotik ve Fungusitlerin Saptanması. *Ank. Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 15-29.

ASLANTAŞ Ö, ÖZTÜRK F, ÇELEBİ A, AÇIK L ve ERGÜN Y (2006). Characterization of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Subclinic Bovine Mastitis by Protein Patterns, Antibiotic Resistance and Plasmid Profile *Ank. Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 53:47-51.

AVORN JL, BARRETT JF, DAVEY PG, MCEWEN SA, O'BRIEN TF and LEVY (2001) Antibiotic resistance: synthesis of recommendations by expert policy groups. World Health Organization. p: 81-82.

AYDIN F, LELOĞLU N, ŞAHİN M, ÇOLAK A ve OTLU S (1995). Kars Yöresi Süt İneklerinde Klinik ve Subklinik Mastitislere Neden Olan Mikroorganizmanın İdentifikasyonları ve Antibiyotiklere Duyarlılıkları Üzerine Çalışmalar. *Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 26: 55-65.

BALABAN N and RASOOLY A (2000) Staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* 61:1-10.

BANNERMAN TL (2003). Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase-Positive Cocci That Grow Aerobically *In Manual of Clinical Microbiology*. Ed. MURRAY PR., BARON EJ., JORGENSEN JH., PFALLER MA., YOLKEN RH., 8rd ed, ASM press, Washington U.S.A. p: 384-404.

BANNERMAN TL, HANCOCK GA, TENOVER FC and MILLER JM. (1995) Pulsed-Field Gel Electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 33:551-555.

BARON E, PETERSON LR and FINEGOLD SM (1994). Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology 9rd ed Mosby-year Book Inc., Missouri, USA. p:101-323.

BAUMGARTNER A, NICOLET J, EGGIMANN M (1984). Plasmid profiles of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis. *J. Appl. Bacteriol.* 56:159-163.

BEYTUT E, AYDIN F, ÖZCAN K ve GENÇ O (2002). Kars İli ve Yöresindeki İneklerde Mastitislerin Patolojik ve Bakteriyolojik Olarak İncelenmesi. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, 8:111-122.

BIBERSTEIN EL, JANG SS, HIRSH DC (1984). Species Distrubution of Coagulase-positive Staphylococci in Animals. *J. Clin. Microbiol.* 19: 610-615.

BOERLIN P, KUHNERT P, HUSSY D, and SCHAELLIBAUM M (2003). Methods for Identification of *Staphylococcus aureus* Isolated in Cases of Bovine Mastitis. *J. Clin. Microbiol.* 41: 767-771.

CAMPANAUD P J (2006) Resistance aux Antibiotiques: L'etat D'urgence. *Science & Vie.* November 51-55.

CATRY B, LAEVENS H, DEVRIESE LA, OPSOMER G and KRUIF A (2003). Antimicrobial Resistance in Livestock. *J. Vet. Pharmacol. Therapy*, 26: 81-93.

CEFAI C, ASHURST S and OWENS C. (1994). Human carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* linked with pet dog. *Lancet* 344: 539- 540.

CENGİZ T, (1999). *Staphylococcus*, *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji USTAÇELEBİ Ş 1.* Baskı Güneş Kitabevi Ltd. Şti.Ankara s:339-348.

CHADWICK PR and WOOSTER SL (2000). Glycopeptide Resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Infection*, 40: 211-217.

CIZMAN M (2003). The Use and Resistance to Antibiotics in The Community *Int. J. of Antimicrob.Agents*, 21: 297-307.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard- Second Edition. M31-A2 and M37-A2. Clinical Laboratory Standards Institute Pennsylvania, USA, 2002.

DERBENTLİ Ş (1996). Stafilokok ve Enterokoklarda Antibiyotik Duyarlılık Deneylerinin Özellikleri. *Ankem Dergisi*, 10:211-219.

DERBENTLİ Ş (2002). Hastane İnfeksiyonlarının Epidemiyolojisinde Moleküler Biyolojik Yöntemlerin Yeri. Ed. AĞAÇFİDAN A, BADUR S, TÜRKOĞLU S, 1rd.ed. Genomed Aş. İnfeksiyon Hastalıkların Laboratuvar Tanısında Moleküler Yöntemler. 6-13.

DEVRIESE LA, BAELE M, VANEECHOUTTE M, MARTEL A and HAESEBROUCK F (2002). Identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus chromogenes* isolates from intramammary infections of dairy cows. *Vet. Microbiol* 87:175-182.

DÜNDAR V ve DÜNDAR D (2002). Bakterilerde Antibiyotiklere Karşı Direnç. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji Sistemlere Göre Hastalıklar*. Ed. TOPÇU A.W. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Sti., İstanbul, s: 1507-1516.

EROL İ VE USCA A. (1996). Donmuş Piliç Karkaslarında İzole Edilen Koagulaz Pozitif Stafilokokların Enterotoksin Oluşturma Yeteneklerinin Set-RPLA Testi ile Belirlenmesi. *Ank. Üniv. Vet. Fak. Derg.* 43: 443-448.

FACKLAM R.R.(1971). Recognition of Group D Streptococcal Species of Human Origin by Biochemical and Physiological Tests. *Appl. Microbiol.* 23:1131-1139.

FALLER A and SCHLEIFER KH (1981) Modified Oxidase and Benzidine Test for Separation of *Staphylococci* from *Micrococci*. *J. Clin. Microbiol.* 1031-1035.

FARRELL AM (1999) *Staphylococcal* Scalded- Skin Syndrome. *The Lancet*, 354: 880-881.

FOSTER T (2003). *Staphylococcus*. Erişim:[<http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch012>] 02.06.2003

GIALLULY C, LOULERGUE J, BRUANT G, MEREGHETTI L, MASSUARD S, MEE N, AUDURIER A and QUENTIN R (2003). Identification of New Phages to Type *Staphylococcus aureus* Strains and Comparison with A Genotypic Method. *J. Hospital Inf.*, 55:61-67.

GONI P, VERGARA Y, RUIZ J, ALBIZU I and GOMEZ-LUS R (2004). Antibiotic Resistance and Epidemiological Typing of *Staphylococcus aureus* Strains from Ovine and Rabbit Mastitis. *Int.J. Antimicrob. Agents*, 23:268-272.

GÜR D (2002). Bakterilerde Antibiyotiklere Karşı Direnç. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji Sistemlere Göre Hastalıklar. Ed. Topçu A.W. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Sti., İstanbul, S: 167-190.

HADİMLİ, H. H, ATEŞ M, GÜLER L, KAV K ve ÖNCEL T (2001). Mastitisli Süt İneklerinden İzole Edilen Stafilokokların β -Laktamaz Aktiviteleri ve Antibiyotiklere Duyarlılıkları *Vet. Bil. Derg.*, 17:21-25.

HAUSLER T. (2006) Viruse vs. Superbugs a Solution to the Antibiotics Crisis?. 1st ed. Macmillan, New York, U.S.p:16-30.

HAVERI M, TAPONEN S, VUOPIO-VARKILA J, SALMENLINNA S and PYORALA S (2005b) Bacterial Genotype Affects the Manifestation and Persistence of Bovine *Staphylococcus aureus* Intramammary Infection. *J. Clin. Microbiol.* 43: 959-961.

HAVERI M, SUOMINEN, RANTALA L, HONKANEN-BUZALSKI T and PYORALA S (2005a). Comparison of Phenotypic and Genotypic Detection of Penicillin G Resistance of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Intramammary Infection *Vet. Microbiol.*, 106:97-102.

HENNEKINNE JA, KEROUANTON A, BRISABOIS A and DE BUYSER ML (2003) Discrimination of *Staphylococcus aureus* biotypes by pulsed- field gel electrophoresis of DNA macro-restriction fragments. *J. Appl. Microbiol.* 94: 321-329.

HIRAMATSU K. (2001). Vancomycin-Resistance *Staphylococcus aureus*: a New Model of Antibiotic Resistance. *The Lancet*, 1:147-155.

HIRSH DC, MACLACHLAN NJ and WALKER RL (2004). *Vet. Microbiol.*, 2nd ed , Blackwell Publishing , Iowa, p:153-160.

HUEBNER J and GOLDMAN DA (1999). Coagulase-Negative *Staphylococci*: Role as Pathogens *Ann. Rev. Med.*, 50:223-236.

IGIMI S, ATOBE H, TOHYA Y, INOUE A., TAKAHASHI E and KONISHI S (1994). Characterization of The Most Frequently Encountered *Staphylococcus spp.* in Cats. *Vet. Microbiol.*, 39:255-260.

ITO T, OKUMA K, MA XX, YUZAWA H and HIRAMATSU K (2003). Insights on Antibiotic Resistance of *S. aureus* From Its Whole Genome: Genomic Island SCC. *Drug Resistance Updates*, 6: 41-52.

JEHL F, CHOMARAT M, WEBER M and GERARD A (2004). *Antibiyotik Duyarlılık Testinden Reçeteye* 2.Baskı Söyletir G., Bal Ç., Gür D.,Topçu Aw. Biomerieux Yayınları, S: 11-22.

JEVONS MP (1961). "Celbenin"-resistan staphylococci. *Brit. Medical J.* 1:124-125.

JONES RH and BENNETT FW (1965). Bacteriophage Types and Antibiotic Sensitivity of *Staphylococci* from Bovine Milk and Human Nares. *App. Microbiol.*, 13:725-731.

KAHN CM (2005). Mastitis in Large Animals The Merck *Veterinary Manual* Merck & CO., INC.Whitehouse Station. N.J. U.S.A p:1120-1130.

KAPUR V, SISCHO WM, GREER RS, WHITTAM TS and MUSSER JM. (1995). Molecular Population genetic Analysis of *Staphylococcus aureus* Recovered from Cows. *J. Clin. Microbiol.* 33: 376-380.

KIRKAN Ş, GÖKSOY EÖ ve KAYA O, (2005). Identification and Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* and Coagulase Negative *Staphylococci* from Bovine Mastitis in the Aydın Region of Turkey. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 29:791-796.

KİREÇCİ E ve ÇOLAK A (2002). Kuru Dönem Başlangıcında Subklinik Mastitisli İneklerden İzole Edilen Stafilokok Suşlarında Metisilin Direnci. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, 8: 98-100.

KONEMAN EW, ALLEN SD, JANDA WM, SCHRECKENBERGER PC and WINN WC (1997). *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5rd ed, J.B. Lippincott Company. Philadelphia p: 539-566.

KOZARSKY PE, RIMLAND D, TERRY PM and WACHSMUTH K (1986). Plazmid Analysis of Simultaneous Nosocomial Outbreaks of Methicilli Resistant *Staphylococcus aureus* . *Infection Control*, 7: 577-581

KUYUCUOĞLU Y ve UÇAR M (2001). Afyon Bölgesi Süt İneklerinde Subklinik ve Klinik Mastitlerin Görülme Oranları ve Etkili Antibiyotiklerin Tespiti. *Vet. Hek. Mikrobiyol. Derg.*, 1: 19-24.

LANGE C, CARDOSO M, SENCZEK D and SCHWARZ S (1999). Molecular Subtyping of *Staphylococcus aureus* from Cases of Bovine Mastitis in Brazil. *Vet. Microbiol*, 67: 127-141.

LARSEN HD,, SLOTH KH, ELSBERG C, ENEVOLDSEN C, PEDERSEN LH, ERIKSEN NHR, AARESTRUP FM, JENSEN NE. (2000) The dynamics of *Staphylococcus aureus* intramammary infection in nine Danish dairy herds. *Vet. Microbiol.* 71: 89-101.

LEE J H (2003). Methicillin (Oxacillin)-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Major Food Animals and Their Potential Transmission to Humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:6489-6494.

LENCASTRE H, CAUTO I, SANTOS I, MELO-CRISTINO J, TORRES-PEREIRA A, TOMASZ A. (1994) Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* disease in a Portuguese Hospital: Characterization of clonal types by a combination of DNA typing methods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 13:64- 73.

LEONARD FC, MARKEY BK. (2007). Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: A review. *VeterinaryJournal*. doi: 10.1016/j. tvjl. 2006.11.008.

LILENBAUM W, NUNES EL and AZEREDO MA.(1998). Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of Staphylococci Isolated from The Skin Surface of Clinically normal Cats. *Lett. Appl. Microbiol.* 27: 224-228.

LOWY FD.(1998). *Staphylococcus aureus* Infections. *The New Eng. J. Med.* 20: 520-531.

LYON B.R and SKURRAY R (1987). Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus*: Genetic Basis. *Microbiological Reviews*, 51: 88-134.

MACLACHLAN NJ and WALKER RL (2004). *Veterinary Microbiology*, 2nd ed , Blackwell Publishing , Iowa, p:153.

MIDDLETON JR, FALES WH, LUBY CD, OAKS JL, SANCHEZ S, KINYON JM, WU CC, MADDOX CW and WELSH RD. (2005). Surveillance of *Staphylococcus aureus* in Veterinary Teaching hospitals. *J. Clin. Microbiol*43: 2916- 2919.

MORK T, TOLLERSRUD T, KVITILE B, JORGENSEN H.J and WAAGE S. (2005). Comparison of *Staphylococcus aureus* Genotypes Recovered from Cases of Bovine, Ovine and Caprine Mastitis. *J. Clin. Microbiol.*, 43: 3979-3984.

MORONI P, PISONI G, VIMERCATI C, RINALDI M, CASTIGLIONI B, CREMONESI P and BOETTCHER P. (2005) Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolated from Chronically Infected Dairy Goats. *J. Dairy Sci.* 88: 3500- 3509.

MULLIGAN ME, MURRAY KA, STANDIFORD HC, JOHN JF, KAUFFMAN CA and YU VL (1993). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Consensus Review of The Microbiology, Pathogenesis, and Epidemiology With Implications for Prevention and Management. *The American J. Med.*, 94: 313-328.

MUTLU G ve ÖĞÜNÇ D. (1999). Mikroorganizmalarda hücre yapısı. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. USTAÇELEBİ Ş. Güneş Kitabevi Ltd. Şti. Ankara, p:7-10.

NAGASE N, SHIMIZU A, KAWANO J, YAMASHITA K, YOSHIMURA H, ISHIMARU M and KOJIMA A. (2002). Characterization of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Bovine Mastitis in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 64: 1169-1172.

NASCIMENTO JS, FAGUNDES PC, PAIVA BRITO MAV, SANTOS K and FREIRE BASTOS MC (2005). Production of Bacteriocins by Coagulase-Negative *Staphylococci* Involved in Bovine Mastitis. *Vet. Microbiol*, 106:61-71.

NOUWEN JL, BELKUM A and VENBRUGH H (2001). Determinants of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *The Netherlands J. Med.*, 59: 126-133.

PARISI JT.(1985).Coagulase Negative Staphylococci and the Epidemiological Typing of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiol. Rev.*49:126-139.

PEREIRA MSV and SIQUEIRA-JUNIOR JP (1995). Antimicrobial drug Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolated from Cattle in Brazil. *Lett. Appl. Microbiol.*, 20: 391-395.

PICCININI R. and ZECCONI A (2001) Relationship Among Plasmids Recovered from *Staphylococcus aureus* , Milk Leukocytes, and Antimicrobial Resistance. *J. Dairy Sci.* 84:2642-2648.

PRESCOTT JF (2004). Antimicrobial Chemotherapy. *Veterinary Microbiology* HIRSH DC., MACLACHLAN NJ and WALKER RL., 2nd ed , Blackwell Publishing , Iowa, p:26.

QUINN PJ, CARTER ME, MARKEY B and CARTER GR (2000). *Clinical Veterinary Microbiology*. 6rd ed, Grafos, S. A. Arte Sobre Papel. Spain p:118-126.

RADOSTITS OM, GAY CC, BLOOD DC and HINCHCLIFF KW. (1999) Diseases caused by *staphylococcus* spp. *Veterinary Medicine*. 9rd ed., WB Saunders Company Ltd., London p:716

RAIMUNDO O, HEUSSLER H, BRUHN JB, SUNTRARACHUN S, KELLY N, DEIGHTON MA and GARLAND SM. (2002). Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococcal bacteraemia in a newborn intensive care unit.. *J Hostp. Infect.* 51: 33-42.

RAJALA-SCHULTZ PJ, SMITH KL, HOGAN JS AND LOVE BC (2004). Antimicrobial Susceptibility Of Mastitis Pathogens From First Lactation And Older Cows. *Vet. Microbiol* 102:33-42.

RICH M (2005) Staphylococci in Animals: Prevalence, Identification and Antimicrobial Susceptibility, with an Amphasis on Methicillin-Resistant *S. aureus*. *Brit. J. Biomed. Sci.*, 62: 98-105.

RİŞVANLI A ve KALKAN C (2002). İneklerde Stafilokokal Mastitisler Üzerine Çalışmalar. *Vet. Bil. Derg.*, 18: 51-56.

ROBERSON JR, FOX LK, HANCOCK DD and BESSER TE (1992) Evaluation of Methods for Differentiation of Coagulase-Positive *Staphylococci*. *J. Clin. Microbiol.* 30: 3217-3219

RUOFF KL and FERRARO MJ (1986) Presumptive Identification of *Streptococcus* Milleri in 5h *J. Clin. Microbiol* 24:495-497.

RYAN KJ (2004) Antimicrobial resistance. *Sherris Medical Microbiology*. Ed.: RYAN KJ, RAY CG, SHERRIS JC. 4. ed., McGraw-Hill Companies U.S.A. p: 215-227

SABOUR PM, GILL JJ, LEPP D, PACAN JC, AHMED R, DINGWELL R and LESLIE K (2004). Molecular Typing and Distribution of *Staphylococcus aureus* Isolated in Eastern Canadian Dairy Herds. *J Clin Microbiol*, 42:3449-3455.

SANCAK B ve GÜNALP A (2001). Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* İzolatların Kantitatif Antibiyogram ve Plazmid Profil Analizi Yöntemleri İle Tiplendirilmesi *Mikrobiyoloji Bülten*, 35:11-24.

SANFORD BA, THOMAS VL, RAMSAY MA and JONES JO (1986). Characterization of Clinical Strains of *Staphylococcus aureus* Associated with Pneumonia. *Amc. Society Microbiol.*, 24: 131-136.

SCHLIEVERT PM, TRIPP TJ and PETERSON ML.(2004) Reemergence of Staphylococcal Toxic Shock Syndrome in Minneapolis-St. Paul, Minnesota, during the 2000-2003 Surveillance Period. *J. Clin. Microbiol.* 42: 2875-2876.

SEGUIN JC, WALKER RD, CARON JP, KLOOS WE, GEORGE CG, HOLLIS RJ, JONES RN and PFALLER A. (1999) Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Outbreak in a Veterinary Teaching Hospital: Potential Human-to-Animal Transmission. *J. Clin. Microbiol* 37: 1459-1463.

SHRYOCK TR, APLEY M, JONES RN and LEIN DH (2002) Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals. *Approved Standard*. M-31-A2.

SOLL DR, LOCKHART SR, PUJOL C (2003). Laboratory Procedures for the Epidemiological Analysis of Microorganism. Manual of Clinical Microbiology Ed. MURRAY P.R, BARON E.J, JORGENSEN J.H, PFALLER M.A, and YOLKEN R. H, 8 th ed,ASM press,Washington p: 139-161.

SOUSA MA and LENCASTRE H (2004). Bridges from Hospitals To The Laboratory: Genetic Portraits of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones. *FEMS Immunol. Medical Microbiol.*, 40: 101-111.

STEPHAN R, ANNEMUELLER C, HASSAN AA, LAMMLER Ch.(2001). Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. *Vet. Microbiol.* 78: 373-382.

SKURRAY RA and FİRTH N (1997). Molecular evolution of multiply-antibiotic-resistant staphylococci. *AntibioticResistance: Origins, Evolution, Selection and Spread*. Ed: CHADWICK DJ and GOODE J. John Wiley & Sons Ltd. West Sussex, England. p: 167-183.

ŞAHİN M, ÇOLAK A, OTLU S, AYDIN F, GENÇ O, GÜLER M.A ve ORAL H (1997). Kars Yöresi İthal Simental İneklerde Subklinik ve Klinik Mastitislerin Görülme Oranı ve Etkili Antibiyotiklerin Belirlenmesi. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, 3:49-55.

ŞENER K, SARAÇLI MA, AÇIKEL CH, Doğançlı L (2004) Nozokomiyal Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) izolatlarının serotiplendirilmesinde üç ayrı yöntemin incelenmesi. *Mikrobiyol. Bült.* 38:363-375.

TENOVER FC, ARBEIT RD, GOERING PA, MURRAY BE, PERSING DH and SWAMINNATHAN B. (1995). Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *J. Clin. Microbiol* 33:2233-2239.

TODAR K. *Staphylococcus aureus* .<http://textbookofbacteriology.net/staph.html> 01. 08 2006.

TSIODRAS S, GOLD HS, SAKOULAS G, ELIOPOULOS GM, WENNERSTEN C, VENKATARAMAN L, MOELLERING RC and FERRARO MJ (2001). Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *The Lancet*, 358:207.

TÜRÜTOĞLU H, ATEŞOĞLU A, SALİHOĞLU H ve ÖZTÜRK M (1995). Marmara Bölgesi Süt İneklerinde Mastitise Neden Olan Aerobik Etkenler. *Pendik Vet. Mikrobiyol. Derg.*, 26: 125-137.

UÇAN US ve ASLAN E (2002). İnek Mastitislerinden İzole Edilen Koagülaz Pozitif Stafilokok Suşlarının Penisilin Direnci ve Bazı Antibiyotiklere Duyarlılıkları. *Vet. Bil. Derg.*, 18: 19-22.

UGUR, A ve CEYLAN Ö (2003). Occurrence of Resistance to Antibiotics, Metals, in Clinical Strains of *Staphylococcus aureus* spp. *Arch. Medical Res.*, 34: 130-136.

VAUTOR E, ABADIE G, GUIBERT J-M, HUARD C and PEPIN M. (2003) Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from sites on farms with dairy sheep using pulsed-field gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.*96:69-79.

VERNOZY-ROZAND C, MAZUY C, PREVOST G, LAPEYRE C, BES M, BRUN Y and FLEURETTE J (1996). Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci isolated from goat's milk and cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 30: 271-280.

VINTOV J, AARESTRUP FM, ZINN CE and OLSEN JE (2003). Association Between Phage Types and Antimicrobial Resistance Among Bovine *Staphylococcus aureus* From 10 Countries. *Vet. Microbiol*, 95:133-147.

WEGENER HC, WATTS JL, SALMON SA and YANCEY RJ (1994). Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus hyicus* Isolated from Exudative Epidermitis in Pigs. *J. Clin. Microbiol.*, 32: 793-795.

WELLER TMA (2000). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Typing Methods: Which Should Be The International Standard? *J. Hosp. Infec.*, 44:160-172.

YAVUZ MK ve ESENDAL ÖM (2002). Mastitisli İnek Sütlerinden İzole Edilen Stafilokokların Tür Düzeyinde İdentifikasyonu ve Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi. *Etlik Vet. Mikrobiyol. Derg.*, 13: 19-27.

YOSHIMURA H, ISHIMARU M, and KOJIMA A (2002). Minimum Inhibitory Concentrations of 20 Antimicrobial Agents Against *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Intramammary Infections in Japan. *Journal of Veterinary Medicine B*, 49:457-469.

ZADOKS RN, LEEUWEN W, KREFT D, BARKEMA H, SAMPION O, VERBRUGH H, SCHUKKEN YH and BELKUM A. (2000) Application of Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Binary Typing as Tools in Veterinary Clinical Microbiology and Molecular Epidemiologic Analysis of Bovine and Human *Staphylococcus aureus* Isolated. *J. Clin. Microbiol* 38:1931-1939.

ZADOKS RN; VAN LEEUWEN WB, KREFT D, FOX LK, BARKEMA HW, SCHUKKEN YH and BELKUM A. (2002) Comparison of Isolates from Bovine and Human Skin, Milking Equipment, and Bovine Milk by Phage Typing, Pulsed- Field Gel Electrophoresis, and Binary Typing. *J. Clin. Microbiol.*40: 3894-3902.

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel bilgiler

Adı: Nilgün

Soyadı: ÜNAL

Doğum yeri ve tarihi: Ankara, 1977

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Evli

İletişim adresi ve telefonu: Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD. Kırıkkale. Tel: 0 (318) 357 33 01

Eğitim

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi 1999

Kurtuluş Lisesi - Ankara 1993

Meslek deneyimi

Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Araş. Gör. 2001

Lalahan Belediyesi, Veteriner Hekim 2001

Gima A.Ş., Veteriner Hekim 2000

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti

Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Derneği

Bilimsel Etkinlikler

A. Projeler

İstanbuluoğlu E, Üçkarakaya N. Kırıkkale ve çevresindeki insan ve hayvan popülasyonlarından izole edilen stafilococcus suşlarının fenotipik, genotipik özellikleri ve epidemiyolojileri üzerine çalışmalar. K.Ü.BAP 2005/12.

İstanbuluoğlu E, Gür D, Ünal S, Üçkarakaya N, Bulun H. Pulsed field gel elektroforez yöntemi ile insan ve sığır kökenli *Staphylococcus aureus* suşlarının moleküler populasyon genetiği üzerine çalışmalar. TÜBİTAK /TOVAG 105O100, (Proje devam etmektedir).

B. Uluslararası Yayınlar

Yıldırım M, İstanbuluoğlu E, Ayvalı B, Ünal N. Comparison of Disc diffusion and E Test for in vitro antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from poultry. Rev. Med.Vet, 156(10) 510-513, 2005.

C. Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

Yıldırım M., Başalan M., Istanbuluoğlu E., Özarslan B., **Uckarakaya N.** Effects of Feding Sodium Chlorate Prior to Slaughter on Campylobacter jejuni and Intestinal Environment of Turkey. 5. th International Symposium on Turkey Diseases. 16-19th June 2005, Book of Abstracts.pp. 16, Berlin Germany.

Başalan M., Yıldırım M., Istanbuluoğlu E., **Uckarakaya N.**, Yaman S. Effects of Deep Stacking Methods for Recycled Poultry Bedding. 14th World Veterinary Poultry Congress, 22-26 August 2005, İstanbul - Turkey.

D.Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

İstanbuluoğlu E, **Ünal N.** Johne ve Crohn Ulusal Mikobakteri Sempozyumu, 23-25 Kasım 2006, Kızılcahamam - Ankara.

İstanbuluoğlu E., **Ünal N.**, Bulun, H. Antibiyotiklere karşı direnç: önleme stratejileri, VII. Ulusal Mikrobiyoloji Kongresi, 26-28 Eylül 2006, Side-Antalya

Ünal N., İstanbuluoğlu E, Yıldırım M, Aşkar S. Bakteriyel zoonozların yayılmasında karasineklerin (Musca Domestica) vektör rolünün araştırılması. 7. Ulusal (Uluslar arası katılımlı) Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, 26-28 Eylül 2006, Side-Antalya.

İstanbuluoğlu E, **Ünal N.** İnsan ve Hayvan Orjinli Stafilokokların Antibiyotik Direnci ve Beta Laktamaz Aktivitesi Üzerine Çalışmalar. 7. Ulusal (Uluslar arası katılımlı) Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, 26-28 Eylül 2006, Side-Antalya.

Gür D., Gülay Z, Arıkan Akan Ö, Aktaş Z, Bal Ç, Çakıcı Ö, Eraç B, Gültekin M, Ögünç D, Söyletir G, Uysal S, **Ünal N.** Gram Negatif Hastane İzolatlarında Yeni β -Laktamlara Direnç ve GSBL Sıklığı- Çok Merkezli HİTİT Projesinin Sonuçları. KLİMİK 2005 XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, 16-20 Kasım 2005, Belek- Antalya.

Başalan M., Yıldırım M, Istanbuluoğlu E, Özarslan B, **Uckarakaya N.** Hindilerde Kesim Öncesi Sodium Chlorate Uygulamasının *C. jejuni* ve Barsak Ortamı Üzerine Olan Etkisi. 14-16 Eylül 2004, Elazığ.

Yıldırım M., Istanbuluoğlu E, Ayvalı B, **Uckarakaya N.** Kanatlılardan İzole Edilen *C. jejuni* ve *C. coli* İzolatlarının İn vitro Antimikrobiyal Duyarlılıklarının Saptanmasında Disk Difüzyon ve Etest Metodlarının Karşılaştırılması. 6. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, 14-16 Eylül 2004, Elazığ.

E. Seminerler

İnspektlerde ve Memelilerde Doğal Bağışıklığın Karşılaştırılması

Moleküler Biyolojinin Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis Araştırmalarına Katkısı