

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

**SUBKLİNİK MASTİTİSLİ İNEK SÜTLERİNDEN İZOLE EDİLEN
STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUŞLARINDA METİSİLİN DİRENCİNİN
FENOTİPİK VE GENOTİPİK ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bilge DİLSİZ

Danışman

Doç. Dr. Özkan ASLANTAŞ

HATAY-2010

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

**SUBKLİNİK MASTİTİSLİ İNEK SÜTLERİNDEN İZOLE EDİLEN
STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUŞLARINDA METİSİLİN DİRENCİNİN
FENOTİPİK VE GENOTİPİK ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bilge DİLSİZ

Danışman

Doç. Dr. Özkan ASLANTAŞ

Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 08 L 0603
nolu proje olarak desteklenmiştir.

HATAY-2010

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

**SUBKLİNİK MASTİTİSLİ İNEK SÜTLERİNDEN İZOLE EDİLEN
STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUŞLARINDA METİSİLİN DİRENCİNİN
FENOTİPİK VE GENOTİPİK ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Bilge DİLSİZ

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 09/02/2010 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi : Jüri Başkanı : Doç. Dr. Özkan ASLANTAŞ
Üye : Yrd. Doç. Dr. Burçin ÖZER
Üye : Yrd. Doç. Dr. Yaşar ERGÜN

Bu tez, Enstitümüz Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda hazırlanmıştır.

09/02/2010
Prof. Dr. Mehmet YALDIZ
Enstitü Müdürü

*Ruhumun derinliklerini her zaman sevgisiyle
ısıtan sevgili babam merhum Aydın DİLSİZ'in anısına...*

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitiminin süresince yardımlarını esirgemeyen ve büyük desteklerini gördüğüm danışman hocam Doç. Dr. Özkan ASLANTAŞ başta olmak üzere Arş. Gör. Dr. Zafer CANTEKİN'e Mikrobiyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencileri Cemil DEMİR ve Mehmet Ali YILMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez çalışmamın her aşamasında maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen, her zaman yanımda olan aileme ve sevgili eşim Çağdaş KARATAŐ'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VII
ŞİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
ÖZET	IX
ABSTRACT	X
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1.Tarihçe	5
2.2.Etiyoloji	5
2.3.Stafilokokların Hayvanlarda Neden Olduğu Hastalıklar	6
2.4.Türkiye’de <i>Staphylococcus aureus</i> Mastitislerin Görülme Sıklığı	6
2.5.Stafilokoklarda Virulens Faktörleri	8
2.5.1.Hücre Duvarı	8
2.5.2.Enzimler	9
2.5.2.1.Katalaz	9
2.5.2.1.Koagülaz	10
2.5.2.3.Hyaluronidaz	10
2.5.2.4.Fibrinolizin	10
2.5.2.5.Lipaz	10
2.5.2.6.Deoksiribonükleaz (DNaz)	10
2.5.2.7.Penisilinaz (beta-laktamaz)	11
2.5.3. Ekzotoksinler	11
2.5.3.1.Hemolizin	11
2.5.3.2.Lökosidin	12
2.5.3.3.Toksik Şok Sendromu Toksin-1 (TSST-1)	12
2.5.3.4.Eksfoliyatif Toksin (ET)	13
2.5.3.5.Stafilokokkal Enterotoksin (SE)	13
2.5.4.Antifagositik Maddeler	13
2.5.4.1.Biyofilm	13
2.6.Stafilokoklarda Metisilin Direnci	14
2.7.Staphylococcal Cassette Chromosome (SSC _{mec})	15
2.8.Hayvanlarda Metisilin Direnci	18
2.9.Direnç Fenotipini Belirleyen Faktörler	19
2.9.1.İç Faktörler	19
2.9.2. Dış Faktörler	21
2.10.Metisilin Direncinin Tespiti	21
2.11.Homojen Direnç	22
2.12.Heterojen Direnç	22
2.13.Metisilin Fenotipinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	23
2.13.1.Disk Difüzyon Yöntemi	23
2.13.2.Sulandırım (dilüsyon) Yöntemleri	23
2.13.3.Oksasilin Agar Tarama Testi	24
2.13.4.Epsilometrik Yöntem (E test)	24

2.13.5.PBP2a Lateks Aglutinasyon Testi	25
2.13.6.Otomatize Sistemler	25
2.13.7.Genotipik yöntemler	25
3.GEREÇ ve YÖNTEM	26
3.1.Bakteri Suşları	26
3.2.Antibiyotik Duyarlılık Testleri	26
3.2.1.Disk Difüzyon Yöntemi	26
3.2.2.Oksasilin Agar Tarama Yöntemi	27
3.2.3.Mikrodilüsyon Yöntemi	28
3.2.4.Kontrol suşları	29
3.3.PZR İle <i>mecA</i> Geninin saptanması	29
3.3.1.DNA İzolasyonu	29
3.3.2.Primerler	30
3.3.3. <i>mecA</i> Geninin Amplifiye Edilmesi	30
3.3.4. Amplifiye Edilen Gen Ürününün Gösterilmesi	31
3.4. İstatistiksel Analizler	32
4.BULGULAR	37
5.TARTIŞMA	33
6.SONUÇ	40
7.KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa no</u>
Şekil 2.1. Stafilokoklarda görülen SSC <i>mec</i> tipleri	17
Şekil 2.2. Stafilokoklarda <i>mec</i> -gene kompleksleri	18
Şekil 3.1. Oksasilin disk difüzyon testi	27
Şekil 4.1. PZR ile <i>mecA</i> geninin tespiti	33

ÇİZELGELER DİZİNİ

		Sayfa no
Çizelge 2.1.	Patojen stafilokok türlerinin neden olduğu hastalıklar	7
Çizelge 4.1.	İzolatların <i>mecA</i> geni varlığına göre ve kullanılan yöntemlerin MRSA, MSSA olarak belirledikleri izolat sayısı	34
Çizelge 4.2.	Genotipik ve fenotipik testlerle metisilin dirençli olarak belirlenen <i>S. aureus</i> izolatları	35
Çizelge 4.3.	<i>mecA</i> geni varlığına göre kullanılan yöntemlerin sensitivite, spesifite, pozitif ve negatif prediktif değerleri	36

KISALTMALAR

<i>agr</i>	: Accessory gene regulator
BHI	: Brain Heart Infusion
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
ETA-ETB	: Eksfoliyatif toksin A-B
<i>fem</i>	: Factor essential for methicillin resistance
IL-1	: Interlöykin-1
KNS	: Koagulaz negatif stafilokok
KPS	: Koagulaz pozitif stafilokok
kob	: Koloni oluşturan birim
MHA	: Mueller Hinton Agar
MHB	: Mueller Hinton Broth
MİK	: Minimal inhibitör konsantrasyon
MRSA	: Metisilin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	: Metisilin sensitif <i>Staphylococcus aureus</i>
NAGA	: N-asetil glukozamin
NAMA	: N-asetil muramikasit
PBP2a	: Penisilin bağlayan protein 2a
PNL	: Polimorf nükleer lökosit
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<i>sar</i>	: Staphylococcal accessory regulator
SE	: Stafilokokkal enterotoksin
SSC _{mec}	: Staphylococcal Cassette Chromosome <i>mec</i>
TSST-1	: Toksik şok sendrom toksin-1

ÖZET

Subklinik Mastitisli İnek Sütlerinden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarında Metisilin Direncinin Fenotipik ve Genotipik Araştırılması

Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) insanlarda hastane ve toplumsal kaynaklı infeksiyonların başta gelen nedenlerindedir. Son yıllarda farklı hayvan türlerinde MRSA kaynaklı infeksiyonların ve kolonizasyonunun bildirilmesi toplumsal kaynaklı MRSA infeksiyonlardaki artış ile ilişkilendirilmektedir. Bu çalışmada subklinik inek mastitislerinden izole edilen *S. aureus* suşlarında metisilin direncinin tespitinde farklı yöntemlerin karşılaştırılması amaçlandı. Bu amaçla, 148 *S. aureus* izolatında metisilin direnci altın standard olarak kabul edilen PZR ile *mecA* geninin gösterilmesi, oksasilin agar tarama testi, oksasilin disk difüzyon testi, sefoksitin disk difüzyon testi ve broth mikrodilüsyon yöntemleri ile araştırıldı ve sonuçları karşılaştırıldı. İncelenen 148 *S. aureus* suşundan 24 (%16.2)'ü PZR ile metisilin direnci yönünden pozitif bulundu. Oksasilin disk difüzyon testi ile 16 (%10.8), sefoksitin disk difüzyon testi ile 15 (%10.1), oksasilin agar tarama testi ile 16 (%10.8) ve broth mikrodilüsyon yöntemi ile de 18 (%12.2) suş metisiline dirençli olarak saptandı. PZR ile *mecA* negatif bulunan 124 suştan (MSSA) ise oksasilin disk difüzyon ve sefoksitin disk difüzyon testi ile 1'i (%1.6), broth mikrodilüsyon testi ve oksasilin agar tarama testi ile de 2'si metisiline dirençli olarak saptandı. Fenotipik yöntemlerin sensitivite ve spesifiteleri altın standard olarak kabul edilen PZR ile *mecA* geninin belirlenmesi referans alındığında sırasıyla oksasilin disk difüzyon testi için %66.7 ve %99.2, sefoksitin disk difüzyon testi için %62.5 ve %99.2, oksasilin agar tarama testi için %66.7 ve %98.4 ve broth mikrodilüsyon testi için ise %75 ve %98.4 olarak saptandı.

Sonuç olarak, hayvan orijinli MRSA suşları atipik metisilin direnç fenotipi gösterebileceğinden, PZR'in metisilin direncinin belirlenmesinde konvansiyonel fenotipik testlere göre daha sensitif ve spesifik olduğu görülmektedir. Ayrıca, hayvan orijinli *S. aureus* suşlarında metisilin direncinin araştırılmasında yeni metodların uygulanması gereklidir.

Anahtar kelimeler : İnek, mastitis, metisilin direnci, *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

Investigation of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Subclinical Bovine Mastitic Milk Samples by Phenotypic and Genotypic Methods

Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) one of the leading cause of hospital-acquired (HA) and community-acquired (CA) infections. In recent years, MRSA infections and colonization in different animal species has been reported, suggesting a correlation observed increase in the number of CA-MRSA infections. In this study, it was aimed to compare several methods for the detection of methicillin resistance in *S. aureus* isolated from subclinical bovine mastitis. For this aim, 148 *S. aureus* strain were screened for methicillin resistance by a PCR assay, which is accepted as golden standart and specific for the *mecA* gene, oxacillin disc diffusion test, ceftiofur disc diffusion test, an oxacillin agar screen test, broth microdilution test. Of the 148 *S. aureus* examined, 24 (16.2%) were found to be MRSA by PCR. Oxacillin disc diffusion, ceftiofur disc diffusion, oxacillin agar screen test and broth microdilution method detected methicillin resistance in 16 (10.8%), 15 (10.1%), 16 (10.8%) and broth microdilution 18 (12.2%), respectively. Of 124 MSSA *mecA* negative strains, oxacillin disc diffusion and ceftiofur disc diffusion test 1 (1.6%), broth microdilution test and oxacillin agar screen test 2 strains misclassified as MRSA. When detection of *mecA* gene by PCR taken as a reference method, sensitivities and specificities of oxacillin disc diffusion, ceftiofur disc diffusion, oxacillin agar screen test and broth microdilution method were 66.7-99.2%, 62.5-99.2%, 66.7-98.4% and 75-98.4%, respectively.

In conclusion, as MRSA of animal origin may display atypical methicillin resistance, PCR appears to be more sensitive and specific for detection of methicillin resistance according to phenotypic methods. In addition, it is necessary to implement new methods for screening methicillin resistance in *S. aureus* from animal origin.

Key words : Bovine mastitis, methicillin resistance, *Staphylococcus aureus*

1.GİRİŞ

Staphylococcus aureus tüm dünyada önemli ekonomik kayıplara neden olan sığır mastitislerinin en yaygın etiyolojik nedenidir (Van Duijkeren ve ark. 2004). Mastitislerin kontrolünde ve tedavisinde antibiyotikler önemli bir yere sahiptir. Ancak, antibiyotiklerin yaygın ve yanlış kullanımı insan ve hayvanlarda infeksiyona neden olan farklı bakteri türlerinde direnç gelişimine neden olmuştur (Hendriksen ve ark. 2008). Beta-laktam antibiyotikler mastitislerin tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Beta-laktam antibiyotiklere direnç; beta-laktamazların üretimi veya düşük affiniteye sahip penisilin bağlayan protein 2a (PBP2a) sentezi ile gerçekleşmektedir. PBP2a kromozomal *mecA* geni tarafından kodlanmaktadır ve beta-laktamaz dirençli penisilinler ile diğer beta-laktam antibiyotiklere dirençten sorumlu olduğu bildirilmiştir (Odd ve Maeland 1997). Bu mekanizmalardan sonuncusu metisilin direnci olarak bilinmekte ve metisiline dirençli *S. aureus* suşları “MRSA” olarak isimlendirilmektedir (Mandel ve ark. 1995).

Metisilin direnci ilk defa metisilin kullanıma girmesinden kısa bir süre sonra 1960 yılında İngiltere’de rapor edilmiştir (Jevons 1962). Bu tarihten sonra MRSA suşları yayılmaya başlamış ve 1970’li yıllarda dünya genelinde ciddi nozokomiyal infeksiyonlara neden olmaya başlamıştır (Locksley ve ark. 1982). Günümüzde halen önemli bir problem olmaya devam etmektedir (Mandel ve ark. 1995, Voss ve Doebbeling 1995, Ayliffe 1997). Etkenin hızlı yayılımında MRSA suşlarının tetrasiklinlere, aminoglikozidlere, makrolidlere, linkozamidlere ve diğer antibiyotiklere karşı gösterdiği çoğul direncin önemli payı bulunmaktadır.

Hayvanlarda ilk MRSA izolasyonu mastitisli ineklerin sütlerinden 1972 yılında gerçekleştirilmiştir (Devriese ve Vandame 1972). Bu tarihten itibaren köpek, kedi, sığır, koyun, tavuk ve at dahil farklı hayvan türlerinden MRSA izolasyonuna dair çalışmalar yayınlanmıştır (Devriese ve Hommeze 1975, Hartman ve ark. 1997, Tomlin ve ark. 1999, Lee 2003, Goni ve ark. 2004).

S. aureus dünyada ve ülkemizde klinik ve subklinik mastitislerin en önemli nedenlerindedir. Özellikle antibiyotiklere çoğul dirençlilik gösteren stafilokok suşlarının neden olduğu mastitislerin tedavisinde güçlükler ile karşılaşmaktadır (Sutra ve Poutrel 1990, Vintov ve ark. 2003). Antibiyotiklere dirençli suşların bizzat kendisi veya dirence aracılık eden genlerinin duyarlı suşlara aktarılması antimikrobiyal ajanlarla tedavide başarısızlığın nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Goh ve ark. 1992, Kreiswirth ve ark. 1993). Bu nedenle izole edilen suşların antibiyotiklere duyarlılık ve direnç durumlarının belirlenmesi klinik ve ekonomik açıdan oldukça önemlidir. Ayrıca dirençli bakterilerin direk temas veya gıda zinciri ile insanlara da bulaşabilmesi halk sağlığı açısından da büyük önem arz etmektedir (White ve McDermott 2001, Lee 2003).

Metisilin direncinin tespitinde rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın olarak disk difüzyon yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Son yıllarda oksasiline agar tarama yöntemi, otomatize sistemler ve ticari lateks aglütinasyon (PBP2a'nın saptanmasına yönelik) kitleri altın standart olarak kabul edilen *mecA* geninin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile saptanması yöntemine alternatif olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemlerin metisilin dirençli stafilokok suşlarını ortaya koymadaki etkinlikleri arasında farklılıklar bulunmaktadır. Bu çalışmada, Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda *S. aureus* olarak tanımlanmış izolatlarda metisilin direncinin *mecA* geni

referans olarak alınarak; oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon testi, oksasilin agar tarama testi ve mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılması amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

Mastitis süt sığırlarında sütün nitelik ve niceliğini etkileyen ve önemli ekonomik kayıplara neden olan bir meme hastalığıdır (Wilson ve ark. 1997, Jain 1979). Mastitisler klinik ve subklinik olmak üzere iki formda görülmektedir (Baştan 2002). Klinik mastitislerde yangının karakteristik belirtileri olan memede kızarıklık, ağrı, şişme, sıcaklık artışı, duyarlılık yanısıra ateş, halsizlik ve iştahsızlık gibi genel hastalık semptomları da görülür. Sütte ise koku, sulanma, pıhtı ve flakon oluşumu dikkati çeker (Karahan 2005).

Subklinik mastitis, meme dokusunda henüz önemli değişiklikler şekillenmeden ortaya çıkan mastitisin ikinci formudur. Meydana gelen değişikliklerin kolay farkedilememesi, özel yöntemler kullanılarak tanımlanabilmesi, süt veriminin ve kalitesinin azalması, klinik mastitislere göre daha yüksek oranda görülmesi nedeniyle süt sığırcılığı işletmelerinde daha fazla öneme sahiptir (Baştan 2002).

Mastitisler multifaktöriyel bir etiolojiye sahiptir ve mastitislerin gelişiminde konak, çevre ve mikroorganizmalara ait faktörler önemli rol oynamaktadır. Konağa ait faktörler arasında yaş, ırk, kalıtım, laktasyon dönemi ve sayısı, memeye ait doğal savunma faktörleri ve immun sistemin gücü sayılabilir. Çevresel faktörler arasında ise hava koşulları, mevsim, beslenme, sağım ve barınak koşulları (nem, ısı, ışık, havalandırma vs) önemli yere sahiptir (Arda 1997). Mastitise neden olan mikroorganizmalar ise kontagiyöz (bulaşıcı), çevresel ve fırsatçı olmak üzere üç farklı şekilde mastitis oluşumuna neden olmaktadır. *S. aureus* ve *Streptococcus agalactiae* kontagiyöz mastitisler içinde önemli bir yere sahiptir. Bu etkenler sağımçıların elleri ve sağım ekipmanları ile bulaşmaktadır. Çevresel mastitis etkenleri ise hayvanların buldukları ortamda (gaita, su, altlık, toprak) fazla miktarda bulunurlar.

Escherichia coli, *Streptococcus dysgalactiae* ve *Streptococcus uberis* çevresel kaynaklı mastitise neden olmaktadır (Baştan 2002, Kireçci 2004). Ancak, dünyada ve Türkiye’de *S. aureus* mastitisin etiyolojisinde önemli bir yere sahiptir. Stafilokokkal mastitislerin görülme oranı yerleşim yerlerine, mevsimsel farklılıklara ve uygulanan mastitis kontrol programlarına göre %60-80 arasında değişmektedir (Hadimli ve Erganiş 2001).

2.1.Tarihçe

Stafilokoklar ilk kez 1878 yılında Robert Koch tarafından irin içinde görülerek tanımlanmış ve ilk defa stafilokok adı 1881 yılında İskoçyalı bir cerrah olan Alexander Ongston tarafından kullanılmıştır (Archer 1990). Eski Yunanca’da üzüm salkımı anlamına gelen “staphylus”, bu bakterilerin üreme esnasında birbirlerinden ayrılmayarak üzüm salkımına benzer kümeler oluşturmasından dolayı kullanılmaktadır. Ancak, stafilokokların ilk defa izole edilmesi ve laboratuvar özelliklerinin tespit edilmesi 1884 yılında Rosenbach tarafından gerçekleştirilmiştir (Bilgehan 1993).

2.2.Etiyoloji

Daha önceki yıllarda Micrococcaceae familyasında yer alan stafilokok cinsi, Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology’nin son baskısında Bacilli sınıfında Bacillales takımında yer almaktadır. Stafilokok cinsi içerisinde yer alan türler, koagulaz enzimi sentezleme yeteneklerine göre koagulaz pozitif stafilokoklar (KPS) ve koagulaz negatif stafilokoklar (KNS) olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. KPS’lar *S. aureus*, *S. intermedius* ve *S. hyicus* türlerini içine almaktadır (Akan 2006).

Stafilokoklar, 0.5-1.5 µm çapında kok şekilli Gram pozitif bakterilerdir. Mikroskop altında çoğu kez üzüm salkımı şeklinde görülürler. Sporsuz, katalaz pozitif, oksidaz negatif ve hareketsizdirler. Birçok türünde karotenoid karakterinde pigment bulunabilir. Suda erime özelliği olmayan bu pigment *S. aureus* kolonilerinin altın sarısı renk almasına neden olur. Laboratuvarında 10-42 °C'de üreyebilmelerine rağmen optimum üreme ısısı 37 °C'dir. Sporsuz olmalarına rağmen dış etkilere ve dezenfektanlara karşı oldukça dayanıklıdır. Kültürlerde +4 °C'de 2-3 ay, - 20 °C de 3-6 ay kadar canlılıklarını muhafaza edebilirler. NaCl'ün %9'luk konsantrasyonunda üreme özelliğine sahiptir (Akan 2006).

2.3.Stafilokokların hayvanlarda neden olduğu hastalıklar

Evcil hayvanlarda stafilokoklar farklı klinik tablolarla karakterize infeksiyonlara neden olmaktadır. Stafilokok türlerinin farklı hayvan türlerinde neden olduğu hastalıklar Çizelge 2.1'de sunulmuştur.

2.4.Türkiye'de *Staphylococcus aureus* mastitislerin görülme sıklığı

Geliştirilen tüm kontrol programlarına rağmen mastitisin eradikasyonu gerek Türkiye'de gerekse de dünyanın diğer ülkelerinde mümkün olmamıştır. Ancak insidansının düşük seviyelere çekilmesi mümkün olmuştur. Bunun en önemli nedeni mastitisin multifaktöriyel bir yetiştiricilik hastalığı olmasıdır (Erganiş ve Uçan 2001). Sığırlardaki mastitis olgularından çok farklı türden mikroorganizma izole edilmesine rağmen infeksiyonların büyük kısmından stafilokoklar izole edilmektedir (Watts 1988). Türkiye'de konu ile ilgi yapılan çalışmalarda da stafilokoklar izole edilen mikroorganizmaların önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Türütoğlu ve ark. (1995) Marmara bölgesinde 1594 mastitisli inek

sütünün %28.1'inden *S. aureus* ve %23.1'inden *S. epidermidis*, Kuyucuoğlu ve Uçar (2001) Afyon ilinde klinik ve subklinik mastitisli 126 inekten alınan 164 süt örneğinin %40.1'inden *S. aureus*, Ergün ve ark. (2004). ise Hatay'da subklinik mastitisli 115 inekten alınan süt örneklerinin %42.4'ünden KNS ve %25.1'inden de *S. aureus* izole etmişlerdir.

Çizelge 2.1. Patojen stafilokok türlerinin neden olduğu hastalıklar (Quinn ve ark. 1994).

Tür	Konak	Hastalık
<i>S. aureus</i>	Sığır	Mastitis: subklinik, kronik, akut, perakut veya gangrenöz Meme impetigosu Meme başında küçük püstüller
	Koyun	Mastitis: akut, perakut veya gangrenöz Kene piyemisi Periorbital ekzama Stafilokokkal dermatitis
	Keçi	Mastitis: subakut veya perakut
	Domuz	Mastitis: akut, subakut ve kronik (botriyomikoz) Nekrotik stafilokokkal endometritis Meme impetigosu
	At	Mastitis: akut Botriyomikoz (kastrasyonu takiben)
	Tavşan	Yeni doğanlarda eksudatif dermatitis Apse, konjunktivitis, pyemi
	Kanatlı	Bumble-foot Hindilerde artritis ve septisemi Omfalitis (nadir)
	Kedi, köpek	Suppuratif lezyonlar
<i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i>	Koyun	Kazeöz lenfadenitise benzer lezyonlar
<i>S. intermedius</i>	Köpek, kedi	Pyoderma, Pyometra Otitis externa (diğer patojenler ile birlikte) Solunum yolu, kemik, eklem, yara, göz kapağı ve konjunktiva infeksiyonları
	At, sığır	Nadir infeksiyonlar
<i>S. hyicus</i>	Domuz	Eksudatif epidermidis Septik poliartritis
	Sığır	Mastitis (nadir)

2.5.Stafilokoklarda virulans faktörleri

Stafilokokların neden olduğu mastitislerin patogeneğinde etkenin sahip olduğu virulans faktörleri (toksinler, enzimler, yüzey proteinleri, kapsül ve biofilm) önemli bir yere sahiptir. Bu faktörler sayesinde etken konak savunma mekanizmalarına direnç göstermekte, memede infeksiyonu başlatmakta ve vücuda invaze olabilmektedir (Karahan 2005, Zecconi ve ark. 2006, Melchior ve ark. 2007). Stafilokokların patogeneğinde rol oynayan başlıca virulans faktörleri şunlardır :

2.5.1.Hücre duvarı

Hücre duvarı bakteri hücreğine şekil veren ve hücre içi ozmotik basınca karşı bakterinin parçalanmasını önleyen önemli bir yapıdır. Hücre duvarının bileşiminde peptidoglikan, teikoik asit ve protein A gibi üç önemli antijenik yapı bulunur. Peptidoglikan hücre duvarı kuru ağırlığının yarısını oluşturur ve N-asetilglukozamin (NAGA) ve N-asetilmuramik asit (NAMA) monomerlerinin β -1-4 glikozid bağları ile bağlanması ile meydana gelir. Ayrıca peptidoglikan zincirleri NAMA molekülüne bağlanmış tetrapeptit zincirleri arasındaki pentaglisin köprüsü ile de birbirine çapraz olarak bağlanmıştır (Dehart ve ark. 1995).

Peptidoglikan tabakası makrofajlardan sitokin salınımını indükleyerek komplementin aktivasyonuna ve trombosit agregasyonuna neden olur (Waldvogel ve ark. 2000). Ayrıca, monositlerden interlöykin-1 (IL-1) salınımını uyararak polimorfnükleer lökositlerin (PNL) infeksiyon bölgesine toplanmalarına ve apse oluşumuna yol açar (Waldvogel ve ark. 2000, Ünal 2004, Lodise ve McKinnon 2005).

Peptidoglikan tabakaya kovalent olarak bağlanmış olan teikoik asit hücre duvarını oluşturan diğer önemli bir yapıdır. Teikoik asit peptidoglikan tabakaya kovalent olarak bağlanmış fosfat içeren polimerlerdir (Langevelde ve ark. 1998). Teikoik asit, mukozal yüzeylerdeki özgül reseptörler aracılığı ile stafilocokların adhezyonuna aracılık eder (Lowy 1998, Bannerman 2003). Teikoik asit tek başına zayıf immunojen özellik göstermesine rağmen peptidoglikan ile birlikte bulunduğu komplement aktivasyonu, yangı hücrelerinin kemotaksisinin inhibisyonu ve antikor sentezinin uyarımı gibi virulansa yönelik önemli biyolojik aktivitelere sahiptir (Koneman 1997).

Stafilocokların virulansında önemli bir yapı olan ve peptidoglikan tabakasının dış yüzeyinde bulunan protein A, IgG'nin Fc bölgesine bağlanma özelliğine sahiptir (Koneman 1997). Protein A, opsonizasyon ve fagositozu engelleyerek komplementin aktivasyonuna neden olur (Bilgehan 1993). *S. aureus* suşlarının bir kısmının sahip olduğu kapsül ise, etkenin hücrelere adhezyonuna yardımcı olan aynı zamanda bakteriyi fagositozdan koruyan ekzopolisakkarit bir yapıdır (Koneman 1997).

2.5.2.Enzimler

2.5.2.1.Katalaz

Katalaz, stafilocoklar için toksik etkili olan hidrojen peroksidi (H_2O_2) oksijen (O_2) ve suya (H_2O) ayıran bir enzimdir. Katalaz enzimi fagositozu takiben fagositik hücreler tarafından oluşturulan miyeloperoksidaz ve serbest radikalleri inaktive eder (Akalın ve ark. 1987).

2.5.2.2.Koagülaz

Stafilocoklar tarafından ekstrasellüler olarak salgılanan koagülaz enzimi fibrinojeni fibrine çevirme özelliğinde olan protrombin benzeri aktiviteye sahip bir enzimdir. Bu enzim

infeksiyon sırasında *in vivo* fibrin bir bariyer oluşturarak bakteriyi fagositozdan korur ve invazyon yeteneklerinin artmasını sağlar (Akalin ve ark. 1987).

Koagülaz, serbest ve bağlı koagülaz (clumping factor) olmak üzere iki farklı formda bulunur. Bunlar hem immunolojik hem de etki mekanizmaları yönünden birbirlerinden farklıdırlar. Serbest koagülaz protein yapıda olup fibrinojenin fibrine dönüşmesi ile plazmanın pıhtılaşmasına yol açar. Bağlı koagülaz ise bakteriyel hücre duvarına bağlı halde bulunup, ortamda serbest olarak bulunmaz. Bu yapı plazmadaki fibrinojene doğrudan bağlanarak, fibrinojenin fibrine dönüşümü ile hücre yüzeyinde fibrin iplikçikleri oluşumuna ve bakterilerin gözle görünür kümeler oluşturmaya neden olur (Baron ve ark. 1994).

2.5.2.3.Hyaluronidaz

S. aureus suşlarının %90'ında bulunan bir enzimdir. Bağ dokusunun yapısında bulunan hyaluronik asitin parçalanmasını ve stafilokokların bakterinin doku içerisinde yayılmasını sağlar (Koneman 1997).

2.5.2.4.Fibrinolizin

Dokularda fibrin kümelerini parçalayarak infeksiyonun çevre dokulara yayılmasını sağlar (Koneman 1997).

2.5.2.5.Lipaz

Deri ve deri altı dokulardaki lipitleri parçalayarak bakterilerin lipid yönünden zengin olan bölgelerde yaşamasına olanak sağlar (Koneman 1997).

2.5.2.6.Deoksiribonükleaz (DNaz)

KPS'lerin çoğu tarafından oluşturulan bir enzimdir. DNA omurgasındaki fosfodiester bağlarını hidrolize ederek *S. aureus*'un invazyon yeteneğini artırır (Arda 2000).

2.5.2.7.Penisilinaz (beta-laktamaz)

Beta-laktamazlar, antibiyotiklerin beta-laktam halkasını hidrolize ederek, antibiyotik etkinliğini gideren ve direnç gelişmesine neden olan enzimlerdir. Beta-laktamaz enzimi, büyük bir plazmid üzerinde yer alan *blaZ* geni tarafından kodlanmaktadır (Fuda ve ark. 2005).

S. aureus'un beta-laktamazı penisilinaz niteliğinde olup bakterinin metisilin ve oksasilin gibi penisilinaza dirençli penisilinler dışındaki tüm penisilin türevlerine karşı direnç kazanmasına yol açar (Jawetz ve ark. 1995, Koneman 1997). Çok geniş bir enzim grubu olan beta-laktamazlar molekül yapılarına ve işlevsel özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır. Beta-laktamazlarda 4 farklı moleküler sınıf (A, B, C, D) tanımlanmıştır. Stafilokokların sentezlediği beta-laktamazlar A sınıfında yer almaktadır (Özmen 2001).

2.5.3.Ekzotoksinler

Stafilokoklar sıvı besiyerlerinde üretildiklerinde kültür filtratlarında ekzotoksin özelliğinde maddeler sentezler. Bu maddelerin eritrosit ve çeşitli hücreler üzerinde sitolitik, deney hayvanlarında ise nekrotik ve letal etkilerinin olduğu saptanmıştır (Koneman 1997, Akan 2006). Bunlar;

2.5.3.1.Hemolizin

S. aureus suşlarında dört tip hemolizin tanımlanmıştır.

a)Alfa toksin: Hemolitik, dermonekrotik ve sitolitik özellikleri olan bir nörotoksindir. Kanlı agarda üreyen *S. aureus* kolonilerinin etrafında eritrositlerin tam lizisi sonucu oluşan hemoliz zonundan sorumludur (Koneman 1997).

b)Beta toksin: Birçok hücre tipi üzerine sitotoksik özellikte olan bir sfingomiyelinazdır. İnsan, koyun ve tavşan eritrositleri üzerine hemolitik etkisi vardır (Dinges

ve ark. 2000). B grubu streptokoklar tarafından oluşturulan CAMP faktörü ile birlikte sinerjistik hemolizden sorumludurlar (Koneman 1997).

c)Gama toksin: İnsan, koyun ve tavşan eritrositleri bu toksine duyarlı, at eritrositleri dirençli bulunmuştur. Etki mekanizması bilinmemektedir (Dinges ve ark. 2000).

d)Delta toksin: Eritrosit, lökosit ve trombositler üzerinde deterjanlara benzer bir etki ile hücre membranlarında hasara neden olur. Alfa ve beta toksinlerden farklı olarak immunolojik aktiviteye sahip değildirler (Dinges ve ark. 2000).

2.5.3.2.Lökosidin

Hem PNL'ler hem de makrofajlar üzerine sitolitik etkiye sahiptir. Bu hücreler tarafından yürütülen fagositoz olayını engelleyerek virulansa katkı sağlar (Fox ve ark. 1991). Toksinin birbiriyle sinerjistik etki yapan, S (slow) ve F (fast) olarak adlandırılan iki komponenti vardır. Toksin hücre zarında porlar açarak permeabilitenin bozulmasına neden olur (Koneman 1997).

2.5.3.3.Toksik Şok Sendrom Toksin-1 (TSST-1)

Stafilokokkal enterotoksin F olarak bilinen bu toksin insanlarda toksik şok sendromuna yol açmaktadır. Toksinin sentezi bakteriyofaj kaynaklıdır (Koneman 1997). İnsanlarda ateş, hipotansiyon, kusma, baş ağrısı, böbrek yetmezliği ve üşüme ile karakterize klinik tabloya neden olur. Toksin çok geniş bir biyolojik aktiviteye sahip olmakla birlikte, TSST-1'in hastalık oluşumundaki rolü tam olarak belli değildir. Stafilokokkal enterotoksinler ile (SE) birlikte süperantijen aktivitesine sahiptir. Yardımcı T lenfositlerini uyararak aşırı sitokin salınımına ve toksik şok tablosuna neden olmaktadır (Dinges ve ark. 2000).

2.5.3.4.Eksfoliyatif Toksin (ET)

Bazı *S. aureus* suşları tarafından sentezlenen ETA ve ETB olarak adlandırılan immunolojik olarak farklı iki tipi bulunmaktadır. ETA ve ETB aynı biyolojik aktiviteye ve yüksek oranda genetik yakınlığa rağmen; ETA kromozomal ETB ise plazmid üzerinde yer alan genler tarafından kodlanmaktadır. Her iki toksin insanlarda veziküler ve eksfoliyatif deri lezyonlarından sorumludur (Marrack ve Kappler 1990, Johnson ve ark. 1991).

2.5.3.5.Stafilokokkal Enterotoksin (SE)'ler

S. aureus suşları tarafından oluşturulan, suda erime özelliğine sahip, termostabil (100 °C'de 30 dk) superantijen özelliğinde maddelerdir. Özellikle yüksek CO₂'li ortamlarda, karbonhidrat ve proteinden zengin besiyerlerinde üreyen stafilokoklar tarafından sentezlenirler. İnsanlarda kısa inkübasyon süresini (2-6 saat) takiben ortaya çıkan bulantı, kusma, karın ağrısı ve diyare gibi klinik semptomlarla karakterize gıda zehirlenmesine neden olur (Erol ve İşeri 2004). Önceleri antijenik özelliklerine göre birbirinden ayrılan klasik 5 SE (SEA-SEE) tipine ilave olarak günümüzde 14 yeni SE tipi (SEG to SER, SEU and SEV) daha bildirilmiştir (Wang ve ark. 2009).

2.5.4.Antifagositik Maddeler

2.5.4.1.Biyofilm

Biyofilm bakterilerin canlı ve cansız yüzeylere lokalize olmasını sağlayan bir maddedir (Demir 2008). Konak immun sistemin ve antibiyotiklerin etkinliğini bozmak suretiyle infeksiyonun persiste olmasına yardımcı olur. Biyofilm içinde üreyebilen bakterilerin neden olduğu mastitis vakalarının yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere daha az oranda duyarlı olduğu gösterilmiştir (Melchior ve ark. 2007).

2.5.5. Stafilokoklarda Metisilin Direnci

Penisilinin keşfini takiben 1940'lı yıllarda kullanıma girmesiyle stafilokokların neden olduğu infeksiyonların mortalite oranlarında önemli düşüşler gözlenmiştir. Ancak kısa sürede 1944 yılında beta-laktamaz üretimine bağlı ilk penisilin direnci bildirilmiştir. Benzer şekilde alternatif olarak kullanılan tetrasiklin, makrolid, sülfonamid gibi ilaçlara da direnç gelişimi bildirilmiştir (Sevgican 2006).

Penisilinaza bağlı olarak gelişen bu direnç sorununu çözmek amacıyla benzilpenisilindeki fenoksi grubunun yerine metoksi grubunun eklenmesiyle 1959 yılında metisilin elde edilmiştir. Klinik kullanıma girmesinden kısa bir süre sonra İngiltere'de 1961 yılında metisiline dirençli ilk *S. aureus* (MRSA) izole edilmiştir. Bu tarihten sonra dünyanın birçok ülkesinde MRSA kaynaklı infeksiyonlar artan oranda görülmeye başlamıştır (Sevgican 2006).

Metisilin direncinden sorumlu mekanizmalar; *mecA* geninin kodladığı PBP2a yapımı, PBP'lerin beta-laktam antibiyotiklere affinitesinde azalma ve beta-laktamazların aşırı üretimi şeklinde özetlenebilir (Fluit ve ark. 2001). Bu mekanizmalar içerisinde en sık görüleni, stafilokokların yeni bir penisilin bağlayan protein (PBP) kazanmaları ile oluşan dirençtir. Bu mekanizma nedeniyle dirençli olan stafilokoklarda, metisiline duyarlı olanlardan farklı olarak yeni bir PBP mevcuttur. Metisilin direncinin oluşmasından sorumlu olan, *mecA* gen kompleksi tarafından kodlanan PBP2a adı verilen, 78 kDa molekül ağırlığındaki bu enzimin beta-laktam antibiyotiklere affinitesi diğer PBP'lerden daha düşüktür. Dolayısıyla beta-laktam antibiyotiklerin varlığında diğer PBP'ler inhibe olurken, bu enzimin affinitesi düşük olduğu için beta-laktam antibiyotiklere bağlanamaz ve fonksiyonunu sürdürmeye devam eder. PBP2a, ortamda beta-laktam antibiyotik olsa da olmasa da sentezlenir ancak ortamda

antibiyotik yoksa fonksiyon göstermez. PBP2a metisiline dirençli tüm KPS ve KNS izolatlarında gösterilmiştir. Metisiline duyarlı stafilocoklarda ise yoktur (Ünal 1996). Transdüksiyon ile bu genetik bilgi dirençli suşlardan duyarlı suşlara aktarılabilmektedir

2.7. Staphylococcal Cassette Chromosome (SCC*mec*)

Metisilin direncinden sorumlu olan *mecA* geni stafilocok türlerinde staphylococcal cassette chromosome (SCC*mec*) olarak adlandırılan hareketli bir genetik element üzerinde bulunmaktadır. SCC*mec* metisiline dirençten sorumlu *mec* ve bakteriyel genom üzerinde yer değiştirmeden sorumlu *ccr* kompleksinden oluşmaktadır. Günümüzde tanımlanan SCC*mec*'nin 5 tipi (I, II, III, IV ve V) bulunmaktadır (Martins ve Cunha 2007) (Şekil 2.1). *ccr* gen kompleksinin *ccrAB1*, *ccrAB2*, *ccrAB3*, *ccrAB4* ve *ccrC* olarak isimlendirilen 5 allotipi, *mecA* gene kompleksinin ise A, B, C, D, E olarak tanımlanan 5 tipi vardır (Şekil 2.2) (Hanssen ve Sollid 2005).

İlk üç SCC*mec* tipi detaylı olarak Ito ve ark. (2001) tarafından tanımlanmıştır. Aynı araştırmacılar 2004 yılında SCC*mec* tip V'i rapor etmişlerdir. Daha çok toplumsal kaynaklı MRSA suşlarında bulunan SCC*mec* tip IV ise Ma ve ark. (2007) tarafından tanımlanmıştır. SCC*mec* I, II ve III başlıca nozokomiyal infeksiyonlara neden olur ve tip IV ile V'ten daha büyüktür. SCC*mec* tip I 34 364 bp büyüklüğünde olup bu üç tipin en küçüğüdür ve metisilin veya ağır metallerin dışında diğer antibiyotiklere dirence neden olan transpozon veya plazmid taşır. SCC*mec* tip IA olarak bilinen alt tipi, tip I'den kasete integre pUB110 plazmidinin varlığı ile ayrılır (Martins ve Cunha 2007).

SCC*mec* tip II 53 017 bp büyüklüğünde olup metisilin direncine neden olan *mecA* ve *mecRI* genlerine ilave olarak, eritromisin ve streptomisin direncine neden olan Tn554

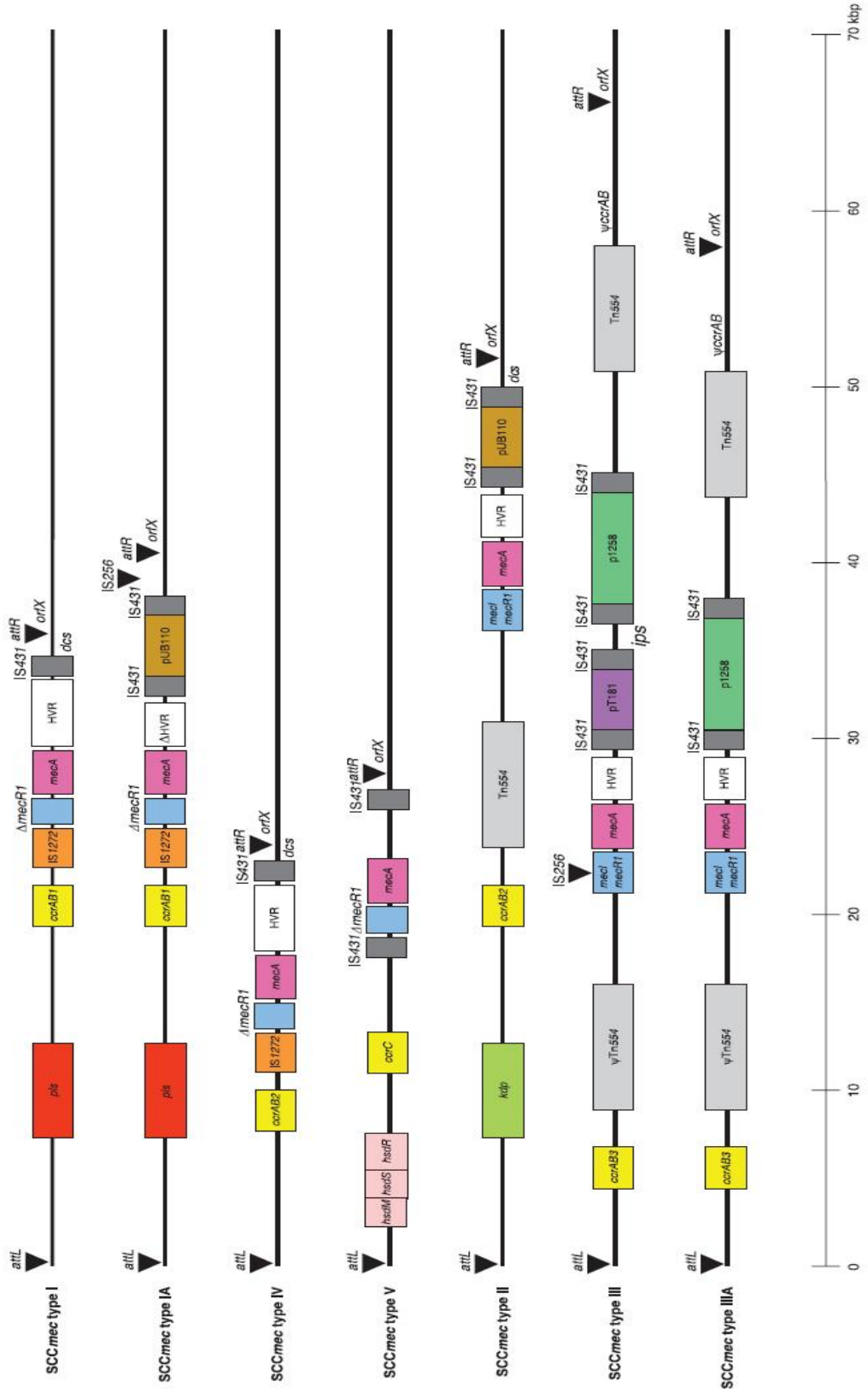
transpozonunu yapısında bulundurur. Tip IIA olarak adlandırılan ve tip II'den 40 bp daha büyük bir alt tipi bulunmaktadır.

SCC*mec* tip III, 5 SCC*mec* tipinin en büyüğüdür (66 896 bp). Yapısında *mecA* ve *mecRI* genlerini, Tn554 ve Ψ Tn554 transpozoonlarını ve pT181 plazmidini taşır. Ψ Tn554 kadmiyuma ve pT181 plazmidini tetrasiklin ve civaya dirençten sorumludur. Bu kaset tipinin IIIA ve IIIB olarak ifade edilen iki alt tipi vardır. Alt tip IIIA pT181 plazmidini veya IS431 elementini içermezken, alt tip IIIB pT181 ve Tn554'ten yoksundur.

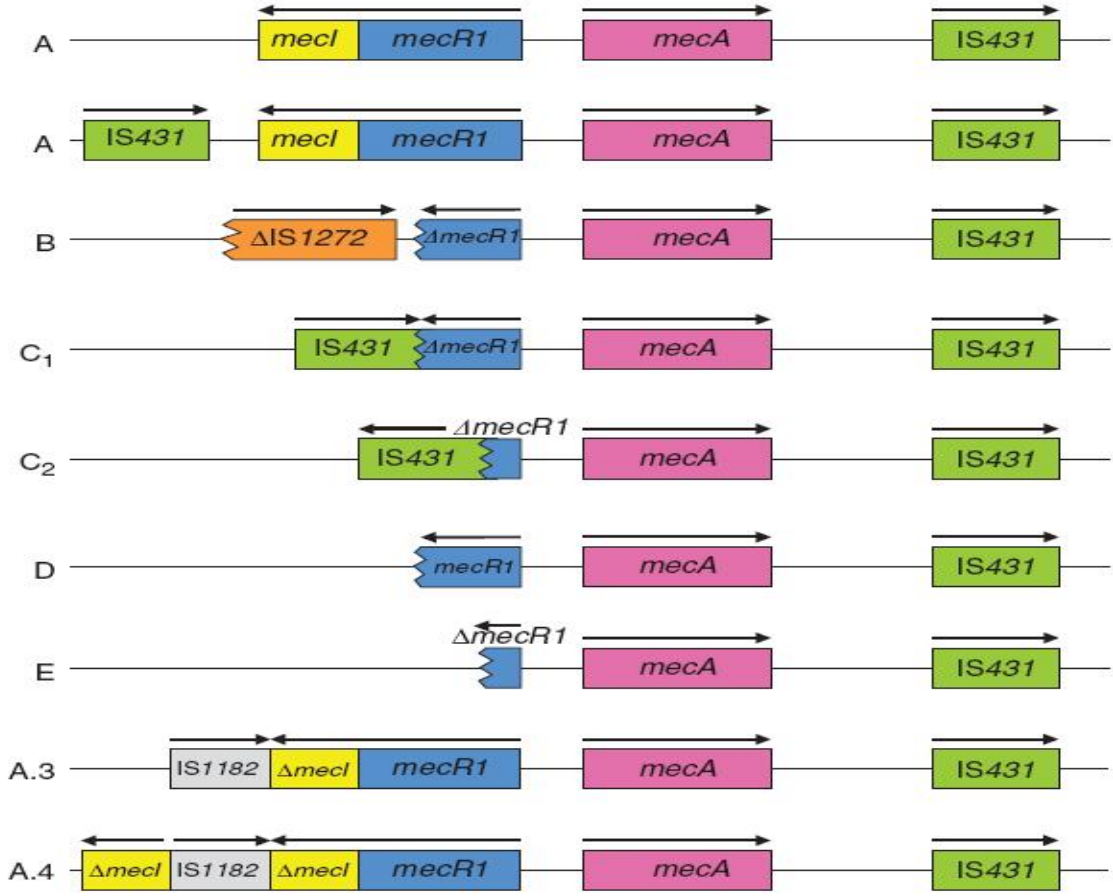
SCC*mec* tip IV genellikle toplumsal kaynaklı infeksiyonlardan sorumludur. Bu element küçüktür ve *mecA* dışında direnç geni taşımaz. Ayrıca bu kaset tipinin çok sayıda alt tipi (IVA, IVB, IVC ve IVD) bulunmaktadır. Bu alt tipler *ccr* kompleksinin L-C bölgesi olarak bilinen sekanslarında farklılığa sahiptir.

En son olarak belirlenen SCC*mec* tip V bir Avustralya izolatında tanımlanmıştır (Ito ve ark. 2004). Tip V'in büyüklüğü 27 624 bp olup, tip IV'ten daha büyük, fakat diğer tiplerden ise daha küçüktür (Martins ve Cunha 2007).

Günümüzde birçok araştırmacı tarafından metisilin dirençli stafilokok suşlarında SCC*mec* tipi ve alt tiplerini belirlemeye yönelik multipleks PZR yöntemleri geliştirilmiştir (Oliveira ve de Lencastre 2002, Zhang ve ark. 2005, Kondo ve ark. 2007).



Şekil 2.1. Stafliokoklarda görülen SCC*mec* tipleri (Hanssen ve Sollid, 2006)



Şekil 2.2. Stafilokoklarda *mec* gene kompleksleri (Hanssen ve Sollid 2006).

2.8. Hayvanlarda Metisilin Direnci

S. aureus'un sığırlarda mastitisin önemli nedenlerinden biri olduğu ve yaygın antibiyotik kullanımı dikkate alındığında ilk MRSA izolasyonununun 1972 yılında mastitisli inek sütünden izole edilmesi şaşırtıcı olmamıştır (Leonard ve Markey 2008). Bu tarihten itibaren farklı evcil hayvan türlerinde; mastitisli sütçü sığırlarda (Lee 2003, Sareyyüpoğlu ve ark. 2006, Moon ve ark. 2007, Turutoğlu ve ark. 2009, Türkyılmaz ve ark. 2009), pet hayvanlarında (Strommenger ve ark. 2003, O'Mahony ve ark. 2005, Loeffler ve ark. 2005,

Baptiste ve ark. 2005, Bağcıgil ve ark. 2006) ve atlarda (Yasuda ve ark. 2000, Weese ve ark. 2005, Busscher ve ark. 2006) metisilin dirençli *S. aureus* ve KNS taşıyıcılığı ile neden olduğu enfeksiyonlar artan oranda bildirilmektedir. Hayvanlarda metisilin dirençli stafilocokların kolonizasyonunun ve enfeksiyona neden olduğunun anlaşılması konu üzerine olan ilginin ve çalışmaların artmasına neden olmuştur. Bu durum insanlarda toplumsal kaynaklı MRSA enfeksiyonlarında gözlenen artış ile de ilişkilendirilmektedir. Nitekim hayvanlardan ve bunlar ile temasta olan insanlardan aynı MRSA klonlarının izole edilmesi, insan ve hayvanlar arasında bulaşmanın olduğunun göstergesi olarak kabul edilmektedir (Weese ve ark. 2003, Lee 2003, O'Mahony ve ark. 2005, Strommenger ve ark. 2006, Juhász-Kaszanyitzky ve ark. 2007).

2.9.Direnç fenotipini belirleyen faktörler

2.9.1.İç Faktörler :

Metisilin direnci *mecA* geninin dışında başka genler ve faktörlerce düzenlenir. Bu nedenle *mecA* geni taşıdığı halde metisiline değişik düzeylerde dirençli ve hatta duyarlı stafilocok suşları bulunabilmektedir. Diğer bir ifade ile *mecA* geninin varlığı metisilin direnci için mutlaka gerekli ancak yeterli değildir. *mec* (*mecI* ve *mecR1*) ve *blaZ* (*blaI* ve *blaR1*) regülatör genleri ile *fem* (factor essential for methicillin resistance; metisilin direnci için gerekli faktör) metisilin direnci için gerekli faktörlerdir. PBP2a sentezine yol açan *mecA* geninin ekspresyonu *mecI* ve *mecR1* genleri tarafından regüle edilmektedir. *mecI* *mecA* geninin ekspresyonunu baskılayıcı, *mecR1* ise destekleyici yönde etkiye sahiptir (Ünal 1996, Nimeyer ve ark. 1996). Bu genlerdeki yapısal değişiklikler fonksiyonel *mec* kompleksi bulursa da stafilocok suşlarında PBP2a sentezinin az veya hiç olmamasına yol açar. *mecA*

promotor bölgesindeki mutasyonlar represörün operatöre bağlanmasını olumsuz yönde etkileyerek veya eksprese edilen proteini etkisiz kılan yapısal gen mutasyonları duyarlı fenotip oluşmasına neden olabilir (Chambers 1997).

Stafilokokkal beta-laktamaz plazmidini metisilin direncini farklı mekanizmalarla etkileyebilir. Beta-laktamaz plazmidinin homojen direnç fenotipine sahip bir bakteriye girişi heterojen direnç fenotipine yol açar. *blaR1*'in inaktivasyonu, *blaI*'in represör aktivitesinin baskınlaşmasına ve heterojen direnç oluşumuna neden olur (Nimeyer ve ark. 1996).

fem faktörleri de metisilin direncinin tam olarak ortaya çıkması için gerekli *mec* dışı faktörlerdir. Hem duyarlı hem de dirençli stafilokoklarda bulunur. Stafilokok genomunun farklı bölgelerine dağılmış durumda 6 *fem* (*femA*, *femB*, *femC*, *femD*, *femE*, ve *femF*) geni tanımlanmıştır. Bunlardan *femE*'nin fonksiyonu bilinmemektedir. *femAB* operonu pentaglisin interpeptid köprüsünün formasyonu için gerekli 40 kDa ağırlığında iki protein kodlar. *femB* dördüncü ve beşinci glisinleri zincire ilave ederken *femA* ikinci ve üçüncü glisinleri zincire ilave eder. Bu genlerin fonksiyonlarının engellenmesi direncin seviyesini hemen hemen duyarlı seviyesine indirir. PBP2a ve diğer PBP'lerin üretimi etkilenmez. *femC* mutantlarının ekspresyonu *femAB* mutasyonlarının aksine heterojen direnç fenotipinin ekspresyonuna neden olur, çoğu dirençli hücrelerin direnç seviyesini etkilemez. *femD*'nin inaktivasyonu hücre duvarından pentapeptid disakkaritin kaybolması ile sonuçlanır. *femF* mutasyonları ile heterojen direnç fenotipinin oluşumu ile sonuçlanır. *femF*'in inaktivasyonu lizin eklenmesi basamağında peptidoglikan prekürsör sentezinin blokajına neden olur (Chambers 1997).

Yukarıda bahsedilen faktörlerin dışında, çok sayıda stafilokokkal virulens faktörlerinin ve ekzoproteinlerinin ekspresyonunun kontrolünden sorumlu olan *agr* (accessory gene regulator) ve *sar* (staphylococcal accessory regulator) lokusları da metisilin direnç fenotipi üzerine etkili olabilmektedir. Heterojen direnç fenotipi gösteren suşlarda her iki lokustaki inaktivasyonların yüksek dirençli bakterilerin sayısında azalma ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Chambers 1997).

2.9.2.Dış Faktörler

Tuz konsantrasyonu, pH, besiyeri kompozisyonu, ozmolarite ve ısı metisilin direnci üzerine etkili olan başlıca faktörlerdir. Bunlardan tuz konsantrasyonu (% 2) ve düşük ısılarda inkubasyon (30-35 °C) heterojen metisilin direnci gösteren suşların tespitinde laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Chambers 1997, Berger-Bachi ve Rohrer 2002).

2.10.Metisilin Direncinin Tespiti

Metisilin direncini tespit etmek için yaygın olarak kullanılan testler kültür koşullarının modifiye edilmesi esasına dayanmaktadır. Bunlar; oksasilin kullanılması, 35 °C yerine 30 °C'de ve 24 saat yerine 16-18 saat inkübasyonu içermektedir. Metisilin veya oksasilin yerine diğer antibiyotiklerin (sefalosporinler, imipenem gibi) duyarlılık testlerinde kullanılması güvenilir sonuçlar vermemektedir. Ancak metisilin direncinin heterojen yapısı duyarlılık testlerinin doğruluğunu sınırlandırmaktadır. *mecA* geninin PZR ile belirlenmesi heterojen suşları bile doğru olarak tanımlama etmesi nedeniyle altın standart olarak kabul edilmektedir (Chambers 1997).

Fenotipik olarak dirençli ancak *mecA* geni yönünden negatif suşlarda oksasiline minimal inhibitör konsantrasyon değerleri genellikle $<16 \mu\text{g/ml}$ olup; bu suşlara karşı beta-laktam antibiyotikler etkili olduğundan klinik önemleri bulunmamaktadır (Chambers 1997).

2.11.Homojen direnç

Kültürdeki koloniyi oluşturan bakterilerin tamamı *mecA* genini taşırlar ve bu direnç geni tamamında eksprese olur. Oksasiline MİK değerleri 400 mg/L ve üzerinde olup yüksek düzeyde dirence neden olur. Genellikle izole edilen stafilokokların az bir bölümünde rastlanan direnç şekli olup, bu direncin saptanması üzerine ortamın pH'ı, ısı, tuz konsantrasyonu ve inkübasyon süresi gibi çevresel faktörlerinin etkisi yoktur (Resende ve Figueriedo 1997).

2.12.Heterojen direnç

Heterojen direnç, klinikte stafilokok suşlarında daha sık karşılaşılan ve direnç oluşumunun çevre koşullarından etkilenmesi nedeniyle saptanması güç olan bir direnç türüdür. Heterojen metisiline direnci yapısal bir özellik olmakla birlikte, kültür ortamı ve beta-laktam antibiyotiklerin kullanımına bağlı olarak direnç seviyesi değişir. Kromozomal olarak *mecA* geni taşıyan ve metisiline dirençli olan suşların bazılarında fenotipik olarak metisiline duyarlı bir alt popülasyonun bulunmasıyla karakterizedir. *mecA*'nın ekspresyon seviyesine göre bunlara heterozistan suşlar da denilmektedir. Heterojen direncin PBP 2a'nın fonksiyonunda önemli olan hücre duvarı sentezindeki biyokimyasal yolaktaki bir faktörün azlığı ve/veya eksikliğinden veya kritik bir noktadaki modifikasyondan kaynaklanması ile açıklanmaktadır

(Chambers 1997). Heterojen dirençte 10^4 - 10^8 bakteriden birinde direnç saptanmaktadır ve bu direnç de üç gruba ayrılmaktadır (Resende ve Figueriedo 1997).

Sınıf I heterojen direnç: 10^7 - 10^8 bakteriden biri dirençli olup metisilin MİK değeri 1,5-3 µg/ml düzeyindedir.

Sınıf II heterojen direnç: 10^5 - 10^6 bakteriden biri dirençli olup metisilin MİK değeri 6-12 µg/ml düzeyindedir.

Sınıf III heterojen direnç: 10^2 - 10^3 bakteriden biri dirençli olup metisilin MİK değeri 50-200 µg/ml düzeyindedir.

2.13.Metisilin Fenotipinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Metisilin direnç fenotipinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler şunlardır :

2.13.1.Disk difüzyon yöntemi

Oksasilin disk difüzyon yöntemi metisilin direncinin belirlenmesinde kullanılan duyarlılığı az olan bir metoddur. Diğer metodlarla karşılaştırıldığında daha düşük spesifiteye (ortalama % 80) sahiptir. Bu amaçla %2 oranında NaCl ilave edilmiş Mueller Hinton agar (MHA) plaklarının yüzeyine bakterinin standart süspansiyonu yayıldıktan sonra oksasilin (1 µg) veya metisilin (5 µg) diski yerleştirilir. İnkübasyon süresi sonunda disk çevresindeki inhibisyon alanının çapı ölçülerek değerlendirilir (Chambers 1997, Cengiz 1999, Gülay 1999, Jorgense ve Tumidge 2003).

2.13.2.Sulandırım (dilüsyon) yöntemleri

Sıvı ve katı besiyerlerinde uygulanabilen sulandırım yöntemleri *in vitro* duyarlılık testleri arasında "altın standard" olarak kabul edilmektedir (Cengiz 1999, Gülay 1999,

Jorgense ve Turnidge 2003). Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2006) standartlarına göre sıvı dilüsyon yöntemi % 2 oranında NaCl ilave edilmiş Mueller Hinton Broth (MHB)'da antibiyotiğin iki katlı dilüsyonlarının yapılmasını, 5×10^5 cfu/ml yoğunluğunda inokulum kullanılmasını ve 35 °C'de 24 saat inkübasyonu, agar dilüsyon testinde ise antibiyotiğin dilüsyonlarının % 2 oranında NaCl içeren MHA plaklarında yapılmasını ve aynı inkübasyon koşullarını önermektedir. Her iki yöntem benzer sonuçlar vermektedir.

2.13.3.Oksasilin Agar Tarama Testi

Bu yöntemin duyarlılığı metisilin dirençli *S. aureus* suşlarını saptamada % 100'e, KNS suşlarını saptamada ise % 95'e yaklaşan bir sensitiviteye sahiptir. Metisiline dirençli KNS'ların tespit oranını artırmak için 48 saat inkübasyon tavsiye edilmektedir (Chambers 1997). Agar tarama testi, test mikroorganizmasının %4 NaCl ve 6 µg/ml oksasilin eklenmiş MHA plaklarına 10^4 cfu yoğunluğunda ekilmesini ve 35 °C'de 24 saat inkübasyonu şeklinde yapılmaktadır. Tek bir koloninin bile üremesi direncin göstergesi olarak kabul edilmektedir (CLSI 2006).

2.13.4.Epsilometrik yöntem (E test)

Bu yöntemde, difüzyon temeline dayanan diskler yerine plastik stripler kullanılarak bir antibiyotiğin MİK değerinin hesaplanması amaçlanmaktadır. Stripin bir yüzünde antibiyotiğin belirli ve sürekli bir konsantrasyon değişimi olacak şekilde ve kurutulmuş olarak diğer yüzünde antimikrobiyal ajanın stripin ucundan olan uzaklığına karşılık gelen konsantrasyonları bir cetvel gibi sıralanmış olarak yer alır. Standart bakteri süspansiyonu MHA gibi katı bir besiyeri üzerine yayıldıktan sonra stripler yerleştirilir. İnkübasyon süresi

sonunda, elips şeklindeki inhibisyon zonunun stribi kestiği konsantrasyon MİK olarak belirlenir (Cengiz 1999, Gülay 1999).

2.13.5.PBP2a Lateks Aglutinasyon Testi

PBP2a'ya karşı elde edilen monoklonal antikorlarla kaplanmış lateks partiküllerinin aglutinasyonu esasına dayanır. *S. aureus* için sensitivitesi ve spesifitesi yüksek ve 10 dakika gibi kısa bir sürede sonuç veren bir testtir (Louie ve ark. 2000, Griethuysen ve ark. 1999).

2.13.6.Otomatize Sistemler

Vitek/Vitek2 (bioMérieux), Phoenix (Becton Dickinson) ve Microscan (Dade Behring) gibi otomatize sistemlerin metisilin direncinin belirlenmesinde güvenilir olduğu fakat az oranda yanlış sonuçlar verdiği (çoğunlukla yanlış pozitif) bildirilmiştir (Brown ve ark. 2005).

2.13.7.Genotipik Yöntemler

Metisilin direncinin heterojen ekspresyonundan dolayı dirençli suşları fenotipik yöntemlerle her zaman doğru olarak tanımlamak mümkün olmamaktadır. Bu nedenle stafilokoklarda metisiline dirençten sorumlu *mecA* geninin PZR ile tespiti altın standart olarak kabul edilmektedir. Bu yöntem dirençli suşların kısa sürede ve doğru olarak saptanmasına taşıyıcıların tanımlanmasına ve sağaltımına olanak sağlamaktadır (Gülay 1999).

Bu çalışmada, subklinik inek mastitislerinden izole edilen *S. aureus* türlerinde metisilin direncinin genotipik ve farklı fenotipik yöntemler kullanılarak araştırılması, altın standart olarak kabul edilen PZR tekniği esas alınarak fenotipik testlerin spesifite, sensitivite, pozitif ve negatif yorumlama gücü değerlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

3.GEREÇ ve YÖNTEM

3.1.Bakteri Suşları

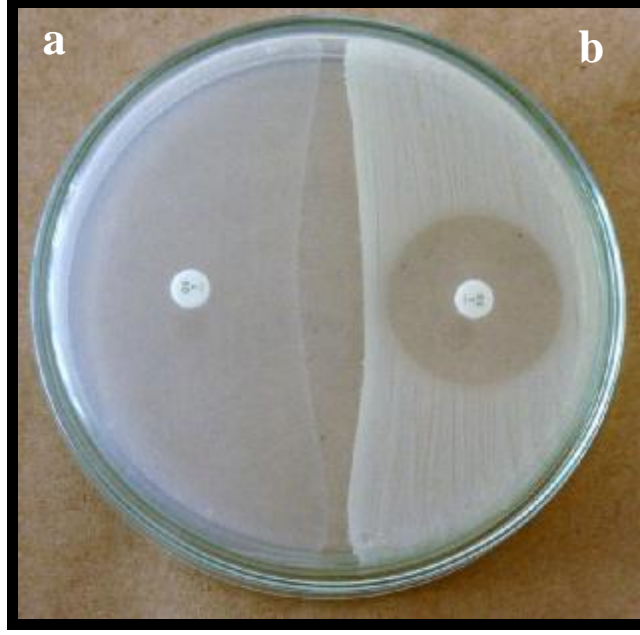
Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonundan seçilen ve subklinik inek mastitislerinden izole edilen 148 *S. aureus* suşu çalışmanın materyalini oluşturdu.

3.2.Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Antibiyotik duyarlılık testi CLSI (2006) önerileri doğrultusunda yapıldı ve değerlendirildi.

3.2.1.Disk Difüzyon Yöntemi

S. aureus suşlarının % 5 defibrine koyun kanlı agardaki (Merck, Germany) kültürlerinden McFarland 0.5 yoğunluğunda % 0.9'luk fizyolojik tuzlu su içinde süspansiyonları yapıldı. Bu süspansiyondan steril bir svab yardımı ile %2 oranında NaCl içeren MHA (Merck, Germany) besiyeri yüzeyine yayıldı. Besiyeri yüzeyi kuruduktan sonra üzerine oksasilin (1 µg) (Oxoid, England) ve sefoksitin (30 µg) (Oxoid, England) diskleri yerleştirilerek 35 °C'de 24 saat inkübe edildi. Süre sonunda her iki antibiyotiğe ait zon çapları ölçülerek sonuçlar değerlendirildi. İnhibisyon zon çapı ≤10 mm olan izolatlar oksasiline dirençli, 11-12 mm olanlar orta duyarlı, ≥13 mm olanlar ise duyarlı kabul edildi. Sefoksitin disk difüzyon testinde ise zon çapı *S. aureus* için ≤ 21 mm olan izolatlar sefoksitine dirençli, ≥22 mm olanlar ise duyarlı olarak kabul edildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Oksasilin disk difüzyon testi a)MRSA b)MSSA

3.2.2.Oksasilin Agar Tarama Yöntemi

Test önerileri doğrultusunda % 4 NaCl eklenmiş ve ml'de 6 µg/ml oksasilin (Sigma-Aldrich, USA) içeren MHA'da yapıldı. MHA'a % 4 NaCl ilave edilip 121 °C'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra 50 °C'ye soğutuldu ve steril şartlarda 6 µg/ml olacak şekilde oksasilin eklenerek agar kalınlığı 4 mm olacak şekilde 90 mm çapında petrilere döküldü. Stafilokok suşlarının kanlı agardaki kültürlerinden fizyolojik tuzlu su içinde McFarland 0.5 yoğunluğunda süspansiyonları hazırlandı. Süspansiyona daldırılan steril svab yardımı ile fazla sıvı kısmı tüpün iç cidarına bastırılarak uzaklaştırıldıktan sonra besiyeri üzerinde 10-15 mm çapındaki bir alana sürmek suretiyle ekildi ve 35 °C'de 24 saat inkübe edildi. Tek bir koloninin dahi görülmesi oksasiline dirençli olarak kabul edildi.

3.2.3.Mikrodilüsyon Yöntemi:

Mikrodilüsyon yöntemi U tabanlı steril mikropleytlerde %2 NaCl ve oksasilinin değişik konsantrasyonlarını (0.125-512 µg/ml) içeren MHB (Merck, Germany) kullanılarak yapıldı. *S. aureus* için oksasilin MİK değeri ≥ 4 µg/ml olan suşlar dirençli kabul edildi (CLSI 2006). Oksasilin dilüsyonu yapılırken aşağıdaki formül kullanıldı.

$$\text{Ağırlık (mg)} = \frac{\text{Volüm (ml)} \times \text{Konsantrasyon (µg/ml)}}{\text{Antibiyotik potensi (µg/ml)}}$$

Potensi %95 olan oksasilinden 52.6 mg tartılıp 5 ml %2 oranında NaCl içeren MHB besiyerinde çözdürülerek 1000 µg/ml stok antibiyotik solüsyonu elde edildi. Bu solüsyondan 512 µg/ml antibiyotik solüsyonu hazırlamak için stoktan 512 µl alınarak üzerine 488 µl %2 oranında NaCl içeren MHB besiyeri eklendi. Daha sonra mikropleytin tüm gözlerine 100 µl %2 oranında NaCl içeren MHB besiyeri eklendi. Daha sonra mikropleytin ilk kuyucuklarına 512 µg/ml oksasilin içeren antibiyotik solüsyonundan 100 µl ilave edilerek birinci kuyucuktan itibaren 12. kuyucuğa kadar seri dilüsyonlar yapıp 12. kuyucuktan 100 µl solüsyon dışarı atıldı. Bakteri süspansiyonundan her bir kuyucuktaki son konsantrasyonu 5×10^5 cfu/ml olacak şekilde tüm kuyucuklara 100 µl dağıtıldıktan sonra, plaklar 35 °C'de 24 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda üreme görülmeyen en düşük konsantrasyon değerleri tespit edildi. *S. aureus* için oksasilin MİK değeri ≥ 4 µg/ml olan suşlar dirençli kabul edildi (CLSI 2006).

3.2.4.Kontrol suşları

Çalışmada kontrol suşları olarak *S.aureus* ATCC 25923 (duyarlı köken) ve *S. aureus* ATCC 43300 (dirençli köken) kullanıldı.

3.3. PZR ile *mecA* geninin saptanması

3.3.1. DNA İzolasyonu

Stafilokok suşlarından DNA izolasyonu Hesselbarth ve Schwarz (2005) tarafından bildirilen yöntemine göre yapıldı. Bu amaçla, izolatlar 10 ml Brain Heart Infusion (Merck, 1.10493, Germany) sıvı besi yerinde bir gece inkube edildikten sonra 3500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve supernatant atılarak bakteri pelleti 1 ml TES buffer eklenerek süspanse edildikten sonra tekrar santrifüj edildi. Supernatant atıldıktan sonra pelet 500 µl TES buffer ile süspanse edilerek 2 µl lizostafin (10 mg/ml) (Sigma, USA) eklendi ve 37 °C'de 30 dk inkube edildi. Bu sürenin sonunda %10'luk sodyum dodesil sulfattan (SDS) (Sigma, USA) 20 µl ve 50 µl Proteinaz K (Sigma, Germany) ilave edildikten sonra 65 °C'de 20 dakika inkube edildi. DNA ekstraksiyonu için karışım üzerine, eşit miktarda fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1) (Sigma; USA) ilave edilip vortekslendikten sonra 10 000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Üst tabaka dikkatlice yeni bir tüpe alınarak üzerine 0.1 hacim 3 M sodyum asetat (Merck, Germany) ve 2-3 hacim absolut alkol (Merck, Germany) ilave edilerek -20 °C'de 2 saat tutuldu. Karışım 13 000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra supernatant atıldı, pelet %70'lik etanol ile yıkandı. Pelet kurutulduktan sonra 100 µl DPEC su ile süspanse edildi.

TES (10 mM Tris-HCl [pH 8], 1 mM EDTA, 100 mM NaCl) Buffer

Trisma base (Sigma, USA)	1.21 g
EDTA (Sigma, USA)	0.372 g
NaCl (Merck, Germany)	5.844 g

Maddeler distile su içinde iyice çözüldükten sonra pH:8'e ayarlandı ve hacim 1000 ml'ye tamamlandı. Küçük hacimlere porsiyonlanarak otoklavda sterilize edildi ve oda ısısında saklandı.

3.3.2. Primerler

Choi ve ark. (2003) tarafından bildirilen *mecA* geninin 314 bp'lik segmentini spesifik olarak amplifiye eden MECA1-F (5'-CCT AGT AAA GCT CCG GAA-3') ve MECA2-R (5'-CTA GTC CAT TCG GTC CA-3') primerleri kullanıldı.

3.3.3. *mecA* Geninin Amplifiye Edilmesi

PZR karışımı 25 µl final hacimde, final konsantrasyonları her bir primerden 0.2 µM, 200 µM dNTP, 10x PZR buffer, 0.5 U Taq Polimeraz, 1.5 mM MgCl₂ ve 2 µl template DNA olacak şekilde yapıldı. Karışım termal döngü cihazına (Techne, England) konularak aşağıdaki amplifikasyon işlemi uygulandı:

95 °C'de 2 dk ilk denaturasyon	
94 °C 30 sn denaturasyon	} 30 siklus
58 °C 30 sn bağlanma	
72 °C 30 sn sentez	
72 °C'de 7 dk son sentez	

3.3.4. Amplifiye Edilen Gen Ürünün Gösterilmesi

Amplifiye edilen PZR ürünleri, DNA marker (Gene Ruler, 100 bp DNA ladder MBI, Fermentas, Lithuania), pozitif kontrol ve negatif kontrol ile birlikte Loading Dye (MBI, Fermentas, Lithuania) ile 1/5 oranında karıştırılarak 1 x TBE tamponu içindeki jele yüklendi. 120 V'da 1 saat elektroforez işlemini takiben UV transilluminatörde 314 bp'lik gen ürünü varlığı yönünden değerlendirildi.

0.5 M EDTA (Ethylenediamine Tetraacetic Acid)

Na ₂ EDTA x 2H ₂ O (Sigma, USA)	186.1 g
Distile su	700 ml
Son hacim	1000 ml

Maddeler 700 ml distile su içinde eritildikten sonra 10 M NaOH ile pH'sı 8'e ayarlandı ve distile su ile 1 litreye tamamlandı.

10x TBE (Tris/borate/EDTA) Elektroforezis Buffer

Trisma base (Sigma, USA)	108 g
Borik asit (Sigma, USA)	55 g
0.5 M EDTA (Sigma, USA)	40 ml
Distile su	1000 ml

Maddeler distile su içinde iyice çözüldükten sonra pH:8'e ayarlandı ve hacim 1000 ml'ye tamamlandı. Çalışmada, 1/10 sulandırması kullanıldı.

3.3.5. İstatistiksel Analizler

3.3.5.1. Duyarlılık ve Özgüllük Saptanması

Testlerin birbiriyle karşılaştırılması amacıyla sensitivite, spesifite, pozitif ve negatif prediktif değerleri hesap edildi. Sensitivite ile uygulanan testin gerçek pozitifleri saptama oranı, spesifite ile uygulanan testin gerçek negatifleri saptama oranı, pozitif ve negatif prediktif değer ile de toplam pozitif ve negatif sonuçlar içerisinde gerçekten pozitif ve negatif olanların oranı belirlendi (Erganiş ve Uçan 2001). Bu amaçla aşağıdaki formüllerden yararlanıldı:

$$\text{Sensitivite (duyarlılık)} = \frac{\text{Gerçek pozitif}}{\text{Gerçek pozitif} + \text{Yanlış negatif}} \times 100$$

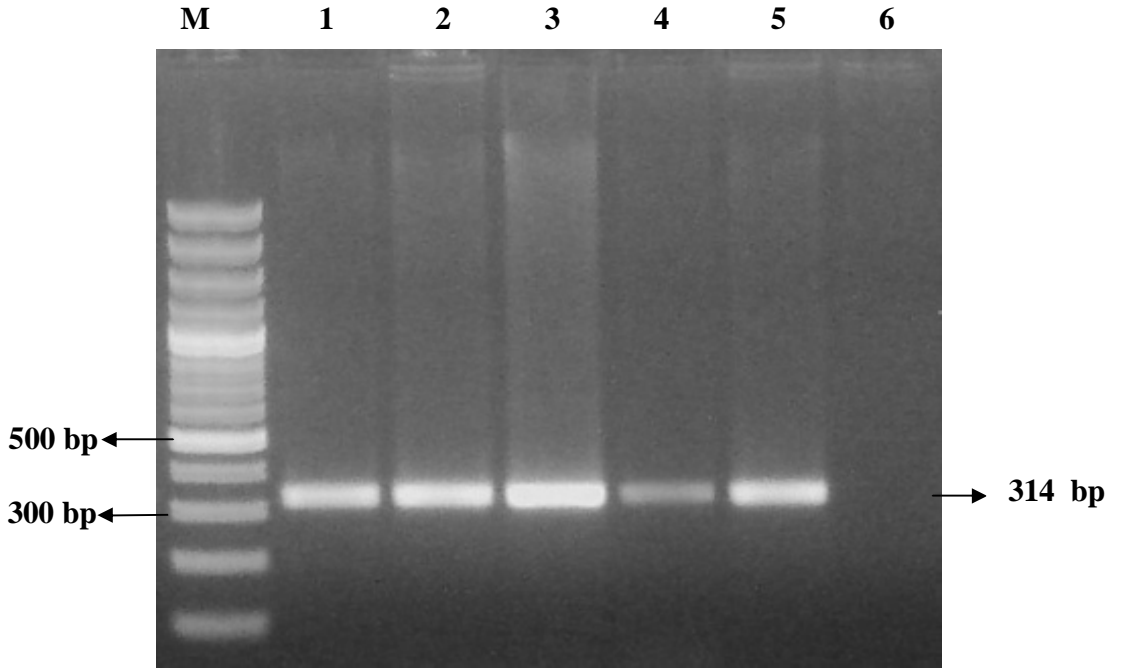
$$\text{Spesitife (özgüllük)} = \frac{\text{Gerçek negatif}}{\text{Gerçek negatif} + \text{Yanlış pozitif}} \times 100$$

$$\text{Pozitif Prediktif Değer} = \frac{\text{Gerçek pozitif}}{\text{Gerçek pozitif} + \text{Yanlış pozitif}} \times 100$$

$$\text{Negatif Prediktif Değer} = \frac{\text{Gerçek negatif}}{\text{Gerçek negatif} + \text{Yanlış negatif}} \times 100$$

4.BULGULAR

Subklinik inek mastitislerinden izole edilen toplam 148 *S. aureus* suşundan PZR ile *mecA* geni yönünden pozitif bulunan 24 (% 16.2)'ü gerçek MRSA ve 124'ü de metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) olarak kabul edildi (Şekil 4.1). *mecA* pozitif izolatlardan 16'sı (%66.7) oksasilin disk difüzyon ve 15'i (%62.5) sefoksitin disk difüzyon testi ile, 18'i (%75) mikrodilüsyon yöntemi ile ve 16'sı (%66.7) da oksasilin agar tarama testi ile metisiline dirençli olarak saptandı. *mecA* negatif bulunan 124 izolattan 1'i (%0.81) oksasilin disk difüzyon ve sefoksitin disk difüzyon testi ile 2'si de (%1.6) mikrodilüsyon yöntemi ve oksasilin agar tarama testi ile metisiline dirençli olarak saptandı (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2).



Şekil 4.1. PZR ile *mecA* geninin tespiti M: 100 bp Marker, 1: Pozitif kontrol (*S. aureus* ATCC 43300) 2-5: *mecA* pozitif suşlar, 6: Negatif Kontrol (*S. aureus* ATCC 25923)

Çizelge 4.1. İzolatların *mecA* geni varlığına göre ve kullanılan yöntemlerin MRSA, MSSA olarak belirledikleri izolat sayısı

Yöntemler	<i>mecA</i> (+) (n: 24)		<i>mecA</i> (-) (n: 124)	
	MRSA	MSSA	MRSA	MSSA
Oksasilin disk difüzyon	16	8	1	123
Sefoksitin disk difüzyon	15	9	1	123
Oksasilin agar tarama	16	8	2	122
Mikrodilüsyon	18	6	2	122

Çizelge 4.2. Genotipik ve fenotipik testlerle metisilin dirençli olarak belirlenen *S. aureus* izolatları

Suş Adı	<i>mecA</i>	Oksasilin Disk Difüzyon	Sefoksitin Disk Difüzyon	Mikrodilüsyon	Oksasilin Agar Tarama
B4	+	R	R	16	+
B6	+	R	R	16	+
B10	+	R	R	16	+
B45	+	S	S	0,5	-
B46	+	S	S	4	-
B102	+	S	S	0.25	-
B106	+	S	S	0.5	-
B111	+	S	S	0.25	-
B114	+	R	R	128	+
B123	+	S	S	2	-
B124	+	R	R	64	+
B125	+	S	S	0.25	-
B133	+	S	S	8	-
B137	+	R	R	64	+
B143	+	R	R	64	+
B145	+	R	R	64	+
B147	+	R	R	32	+
B151	+	S	S	16	+
B152	+	R	R	128	+
B159	+	R	R	32	+
B163	+	R	R	16	+
B180	+	R	R	64	+
B181	+	R	R	64	+
B193	+	R	R	64	+
B8	-	R	R	16	+
B69	-	S	S	8	+

Metisilin direncinin fenotipik olarak saptanmasında kullanılan testlerin altın standart olarak kabul edilen *mecA* pozitifliği esas alınarak hazırlanan sensitivite, spesifite, pozitif ve negatif prediktif değerleri Çizelge 4.3.'te sunulmuştur.

Çizelge 4.3. *mecA* geni varlığına göre kullanılan yöntemlerin sensitivite, spesifite, pozitif ve negatif prediktif değerleri

Yöntem	Sensitivite (%)	Spesifite (%)	Pozitif Prediktif Değer (%)	Negatif Prediktif Değer (%)
Oksasilin Disk Difüzyon	66.7	99.2	94.1	93.9
Sefoksitin Disk Difüzyon	62.5	99.2	93.8	93.2
Oksasilin Agar Tarama	66.7	98.4	88.9	93.9
Mikrodilüsyon	75	98.4	90.0	95.3

5.TARTIŞMA

Mastitis kuru dönemdeki ve laktasyondaki süt sığırlarında antibiyotiklerin yaygın olarak kullanıldığı infeksiyonların başında gelmektedir. Ancak antibiyotiklerin yanlış kullanımı antibiyotiklere direnç problemine neden olmaktadır. Bu problemlerden biri metisilin direncidir. Son yıllarda metisilin direnci mastitisli inek sütlerinden izole edilen stafilokok suşlarında sıklıkla gözlenmektedir (Sareyyupoğlu ve ark. 2006, Moon ve ark. 2007, Juhász-Kaszanyitzky ve ark. 2007, Turutoglu ve ark. 2009, Türkyılmaz ve ark. 2009). MRSA suşlarının beta-laktam antibiyotikler dışında diğer antibiyotiklere de dirençli olması nedeniyle bu suşların neden olduğu infeksiyonların hızlı ve doğru teşhisi infeksiyonun erken aşamada eliminasyonu açısından önem taşımaktadır. Çünkü antibiyotiklere dirençli suşlardan kaynaklanan infeksiyonlar hem ciddi seyretmekte hemde çevreye yayılabilmektedir (Lee ve ark 2004).

Rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında metisilin direncinin tespiti amacıyla çok sayıda metod geliştirilmesine rağmen, bu metodların her birinin sensitivite ve spesifitesinde farklılıklar bulunmaktadır (Swenson ve ark. 2001, Cauwelier ve ark. 2004.). *mecA* geninin PZR ile tespiti altın standart olarak kabul edilmekle birlikte tüm laboratuvarlar tarafından uygulama imkanı bulunmamaktadır. Fenotipik testler arasında sefoksitin disk difüzyon ve oksasilin agar tarama testinin metisilin direncinin tespitinde faydalı olduğu iddia edilmektedir (Skov ve ark. 2003).

İnsan orijinli *S. aureus* izolatlarında metisilin direncinin fenotipik metodlarla araştırılmasında iyi sonuçlar elde edilmesine rağmen (Sancak ve ark. 2003, Zeeshan ve ark. 2007, Mohanasoundaram ve Lalitha 2008, Adaleti ve ark. 2008), hayvanlardan ve hayvansal

ürünlerden izole edilen *S. aureus* suşlarında metisilin direncinin belirlenmesinde uyumsuz sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (Sareyyupoglu ve ark. 2006, Corrente ve ark. 2007, Turutoglu ve ark. 2009). Corrente ve ark. (2007), Güney İtalya’da hayvansal ürünlerden izole ettikleri 200 *S. aureus* suşunun 6’sını PZR ile *mecA* geni yönünden pozitif bulurlarken, fenotipik testlerin sensitivitelelerini düşük saptamışlardır. Özellikle oksasilin agar tarama testi ile ancak *mecA* pozitif 6 suştan birisini tespit edebilirlerken, sefoksitin disk difüzyon testi ile pozitiflik tespit edememişlerdir. Turutoglu ve ark (2009), oksasilin disk difüzyon testi ile MRSA olarak saptadığı 18 suştan ancak 3’ünü PZR ile *mecA* geni yönünden pozitif bulmuşlardır. Sareyyüpoğlu ve ark. (2006), mastitisli inek sütlerinden izole ettikleri 83 stafilokok izolatinın 24’ünü (%28.4) oksasilin disk difüzyon yöntemi ile 17’sini (%20.5) ise PZR ile *mecA* geni yönünden pozitif bulmuşlardır. Bu çalışmada, incelenen 148 *S. aureus* suşundan 24’ü PZR ile pozitif olarak saptanırken, 16’sı oksasilin disk difüzyon, 15’i sefoksitin disk difüzyon, 18’i mikrodilüsyon ve 16’sı da oksasilin agar tarama testi ile metisiline dirençli bulundu. Fenotipik testler ile genotipik test sonuçları arasındaki uyumsuzluk *mecA* geninin regülasyon mekanizmalarındaki farklılıklardan kaynaklanmış olabilir (Rohrer ve ark. 2003). Çalışmada *mecA* pozitif suşların bazılarının heterojen direnç fenotipi göstermesi ve bu suşların oksasilin için kabul edilen eşik değerinin altında veya hemen üstünde (borderline direnç) MİK değerleri göstermesi bu durumu desteklemektedir.

Fenotipik metod ve PZR sonuçları spesifikite açısından iki suş hariç uyumlu sonuçlar verdi. Bu suşlardan biri çalışmada kullanılan 4 fenotipik yöntemle, diğer suş ise sadece mikrodilüsyon ve oksasilin agar tarama yöntemi ile yanlış MRSA sonuç verdi. Bu fenotipin ortaya çıkması normal PBP2a sentezinden direkt veya indirekt sorumlu genlerdeki

mutasyonlar veya aşırı stafilokokkal beta-laktamaz üretimi ile açıklanabilir (Massisida 1996, Chambers 1997, Corrente ve ark. 2007).

Metisilin direncinin belirlenmesi amacıyla kullanılan/kabul edilen veya önerilen antimikrobiyal duyarlılık testleri (oksasilin disk difüzyon, sefoksitin disk difüzyon, oksasilin agar tarama, mikrodilüsyon gibi) atipik fenotip gösterebilen hayvan orijinli *S. aureus* suşlarının tespitinde yeterli olmayabilir. Bemis ve ark. (2006) köpeklerden izole ettikleri stafilokok suşlarında metisilin direncini PBP2a lateks aglütinasyon, sefoksitin ve oksasilin disk difüzyon testi, oksasilin E-test ve *mecA* yönünden PZR ile araştırmışlardır. Araştırmacılar *S. intermedius* ve *S. schleiferi* suşlarında sefoksitin disk difüzyon testinin duyarlılığını önemli oranda düşük saptamışlardır. Bu nedenle de, borderline duyarlılık gösteren izolatlarda *mecA* veya PBP2a'nın varlığını doğrulamak için CLSI tarafından da belirtildiği gibi çok sayıda testin uygulanması gerekliliğinin önemini vurgulamışlardır.

6.SONUÇ

Sonuç olarak hayvanlardan izole edilen *S. aureus* izolatlarında metisilin direncinin belirlenmesi için yaygın olarak kullanılan fenotipik testlerin yanlış sonuçlar verdiği görülmüştür. Bu çalışmada, elde edilen bulgular dikkate alındığında hayvansal orijinli *S. aureus* suşlarında metisilin direncinin doğru olarak saptanmasında *mecA* geninin spesifik olarak PZR ile belirlenmesinin konvansiyonel fenotipik testlere göre daha sensitif ve spesifik olduğu görülmüştür.

7.KAYNAKLAR

1. **Adaleti R, Nakipoglu Y, Karahan ZC, Tasdemir C, Kaya F.** Comparison of polymerase chain reaction and conventional methods in detecting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dev Ctries*, **2008**, s.2:46-50.
2. **Akalm H, Çelik E, Baykal M, Kardeş T.** Metisiline dirençli stafilocokların bazı antibiyotiklere *in vitro* duyarlılıkları. *ANKEM Derg*, **1987**, s.12:104-107.
3. **Akan M.** *Staphylococcus* infeksiyonları. İçinde: Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). Ed. Nejat Aydın, Jale Paracıkoglu. İlke Emek Yayınları, Ankara, **2006**, s.5-15.
4. **Archer GL.** *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase negative staphylococci. In: Mandel GL, Douglas RG, Bennett J.E. (eds.). Principles and Practice of Infectious Diseases. 3th ed. Melbourne, Churchill Livingstone, **1990**, s. 1511-1517.
5. **Arda M.** Temel Mikrobiyoloji. 2. Baskı, Medisan Yayın Seri No: 46, Ankara, **2000**, s.19-50.
6. **Arda H, Minbay A, Leloğlu N, Aydın N, Kahraman M ve ark.** Özel Mikrobiyoloji 4. Baskı, Ankara, Medisan Yayın Serisi No: 26, **1997**, s.31-34.
7. **Ayliffe GA.** The progressive intercontinental spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*, **1997**, s. 24:74-79.
8. **Bağcigil FA, İkiz S, Güzel Ö, Parkan Ç, Ilgaz A.** Kliniğe getirilen köpeklerden ve klinik ortamından metisiline dirençli stafilocokların izolasyonu ve *mecA* geninin PCR ile araştırılması. VII. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), Side-Antalya, Türkiye, 26-28 Eylül 2006, s.96.
9. **Bannerman TL.** *Staphylococcus*, Micrococcus and other catalase positive cocci that grow aerobically. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds). Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. Washington DC: ASM Press, **2003**, s.384-404.
10. **Baptiste KE, Williams K, Williams N, Wattret A, Clegg PD ve ark.** Methicillin-resistant staphylococci in companion animals. *Emerg Infect Dis*, **2005**, s.11:1942-1944.
11. **Baron EJ, Pererson LR, Finegold SM.** Micrococcaceae: Staphylococci, Micrococci and Stomatococci. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 9th ed. London: Mosby, 1994, s.321-332.
12. **Baştan A.** İneklerde meme hastalıkları. 1. Baskı. Hatiboğlu Yayınevi, Ankara, **2002**.
13. **Bemis DA, Jones RD, Hiatt LE, Ofori ED, Rohrbach BW ve ark.** Comparison of tests to detect oxacillin resistance in *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus schleiferi* and *Staphylococcus aureus* isolates from canine hosts. *J Clin Microbiol*, **2006**, s.44:3374-3376.
14. **Berger-Bachi B, Rohrer S.** Factor influencing methicillin resistance in staphylococci. *Arch Microbiol*, **2002**, s. 178:165-171.
15. **Bilgehan H.** Klinik Mikrobiyoloji. Özel Bakterioloji ve Bakteri İnfeksiyonları. 8. Baskı, Fakülteler Kitapevi, İzmir, **1993**, s.186-210.

16. **Brown DFJ, Edwards DI, Hawkey PM, Morrison D, Ridgway GL ve ark.** Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Antimicrob Chemother*, **2005**, s.56:1000-1018.
17. **Busscher JF, van Duijkeren E, van Oldruitenborgh-Oosterbaan S.** The prevalence of methicillin resistant staphylococci in healthy horses in the Netherlands. *Vet Microbiol*, **2006**, s.113:131-136.
18. **Cauwelier B, Gordts B, Descheemaeker P, Van Landuyt H.** Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin (30 microg) for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **2004**, s.23:389-392.
19. **Cengiz AT.** *Staphylococcus*. İçinde: Ustaçelebi Ş (Ed). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitapevi Ankara, **1999**, s.339-347.
20. **Chambers HF.** Methicillin resistance in staphylococci; molecular and biochemical basis and implications. *Clin Microbiol Rev*, **1997**, s.10:781-791.
21. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement (M100-S15). Wayne, PA. **2006**, CLSI.
22. **Dehart HP, Heath HE, Heath LS, LeBlanc PA, Sloan GA.** The lysostaphin endopeptidase resistance gene (*epf*) specifies modification of peptidoglycan cross bridges in *Staphylococcus simulans* and *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol*, **1995**, s.61:1475-1479.
23. **Demir C.** Subklinik mastitisli sığır sütlerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* izolatlarında slime üretiminin araştırılması. Yüksek lisans tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Hatay, **2008**.
24. **Devriese LA, Hommez J.** Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy herds. *Res Vet Sci*, **1975**, s.19:23-27.
25. **Devriese LA, Vandamme LR, Fameree L.** Methicillin (cloxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. *Zbl Vet B*, **1972**, s.19:598-605.
26. **Diep BA, Otto M.** The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis. *Trends Microbiol. Review*, **2008**, s.16:361-369.
27. **Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM.** Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev*, **2000**, s.13:16-34.
28. **Erol İ ve İşeri Ö.** Stafilokokal enterotoksinler. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **2004**, s.51:239-245.
29. **Erganiş O, Uçan US.** Veteriner Epidemiyoloji. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayın Ünitesi. 2. Baskı, Konya, **2001**, s. 48-60.
30. **Ergün Y, Aslantaş Ö, Cantekin Z, Doğruer G.** Hatay ilindeki aile tipi süt sığırcılığı işletmelerinde subklinik mastitislerin epidemiyolojisi. *Vet Bil Derg*, **2004**, s.20:25-28.
31. **Fluit AC, Visser MR, Schmitz FJ.** Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, **2001**, s.14:836-871.

32. Fox LK, Gershman M, Hancock DD, Hutton CT. Fomites and reservoirs of *Staphylococcus aureus* causing intramammary infections as determined by phage typing; the effect of milking time hygiene practices. *Cornell Vet*, **1991**, s.81:183-193.
33. Fuda CCS, Fisher JF, Mobashery S. β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: the adaptive resistance of a plastic genome. *Cell Mol Life Sci*, **2005**, s.62:2617-2633.
34. Goh SH, Byrne SK, Zang JL, Chow AW. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphism. *J Clin Microbiol*, **1992**, s.30:1642-1645.
35. Goni P, Vergara Y, Ruiz J, Albizu I, Vila J ve ark. Antibiotic resistance and epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* strains from ovine and rabbit mastitis. *Int J Antimicrob Agents*, **2004**, s.23:268-272.
36. Griethuysen A, Pouw M, Leeuwen N. Rapid slide latex agglutination test for detection of methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, **1999**, s.37:2792-3789.
37. Gülay Z. Antimikrobiyal ilaçlara direnç. İçinde: Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö (Editörler). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara, Güneş Kitapevi, **1999**, s.91-108.
38. Hadimli HH ve Erganiş O. Mastitis ve bağışıklık. *Veterinarium*, **2001**, s.13(1):37-42.
39. Hanssen AM, Ericson Sollid JU. SCCmec in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2006, s. 46:8-20.
40. Hartman FA, Trostle SS, Klohnen AA. Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a postoperative wound infection in a horse. *J Am Vet Med Assoc*, **1997**, s. 21:590-592.
41. Hendriksen RS, Mevius DJ, Schroeter A, Teale C, Meunier D ve ark. Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from cattle in different European countries: 2002–2004. *Acta Vet Scand*, **2008**, s.50:28-38.
42. Hesselbarth J ve Schwarz S. Comparative ribotyping of *Staphylococcus intermedius* from dogs, pigeons, horses and mink. *Vet Microbiol*, **1995**, s.45:11-17.
43. Hitamatsu K. Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother*, **2002**, s.46:1147-1152.
44. Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K ve ark. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, **2001**, s.45:1323-1336.
45. Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H ve ark. Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob. Agents Chemother*, **2004**, s.48:2637-2651.
46. Jain NC. Common mammary pathogens and factors in infection and mastitis. *J Dairy Sci*, **1979**, s.62:128-134.
47. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. Antimicrobial Chemotherapy. Medical Microbiology. 20th ed. Stanford. Appleton and Lange, **1995**, s.137-166.

48. **Jevons MP.** 'Celbenin'-resistant staphylococci. *Br Med J*, **1961**, s.1:124-125.
49. **Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton FE, Pollard DR ve ark.** Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, **1991**, s.29:426-430.
50. **Jorgense JH ve Turnidge JD.** Susceptibility Test Methods: Dilution and Disk Diffusion Methods. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds) *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. Washington DC: ASM Press, **2003**, s.1108-1127.
51. **Juhász-Kaszanyitzky E, Jánosi S, somogyi P, Dán A, van der Graaf-van Bloois L, van Duijkeren E ve ark.** MRSA transmission between cows and humans. *Emerg Infect Dis*, **2007**, s.13:630-632.
52. **Karahan M.** Mastitisli inek sütlerinden izole edilen streptokok ve stafilokok etkenlerinde genetik polimorfizmin araştırılması. Doktora Tezi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ, **2005**.
53. **Kireççi E.** Erzurum yöresinde klinik ve subklinik mastitisli inek sütlerinden izole edilen stafilokok türlerinin tanımlanması, patojenite testleri, beta-laktamaz aktiviteleri ve antibiyotik duyarlılıkları. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzurum, **2004**.
54. **Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, Hiramatsu K.** Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob Agents Chemother.* s. 51,264-774.
55. **Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC.** The color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 5th ed., Lippincott Williams and Wilkins, Wolter Kluwe Company, Philadelphia, PA, USA, **1997**, s.539-576.
56. **Kreiswirth B, Kornblum J, Arbeit RD.** Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Science*, **1993**, s.259:421-426.
57. **Kuyucuoğlu Y ve Uçar M.** Afyon bölgesi süt ineklerinde subklinik ve klinik mastitislerin görülme oranları ve etkili antibiyotiklerin tespiti. *Vet Hek Mikrobiyol Derg*, **2001**, s.1:19-24.
58. **Langevelde P, Dissel JT, Ravensbergen E, Appelmek BJ, Schrijver IA, Groeneveld HD.** Antibiotic-induced release of lipoteichoic acid and peptidoglycan from *Staphylococcus aureus*; quantitative measurements and biological reactivities. *Antimicrob Agents Chemother*, **1998**, s.42:3073-3078.
59. **Lee JH.** Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl Environ Microbiol*, **2003**, s.69:6489-6494.
60. **Leonard FC ve Markey BK.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals. Review. *Vet J*, **2008**, s.175:27-36.
61. **Locksley RM, Cohen ML, Quinn TC, Tompkins LS, Coyle MB ve ark.** Multiple antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: Introduction, transmission and evolution of nosocomial infection. *Ann Intern Med*, **1982**, s.97:317-324.
62. **Lodise TP ve McKinnon PS.** Clinical and economic impact of methicillin resistance in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **2005**, s.52:113-122.

63. Loeffler A, Boag AK, Sung J, Lindsay JA, Guardabassi L ve ark. Prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* among staff and pets in a small animal referral hospital in the UK. *J Antimicrob Chemother*, **2005**, s.56:692-697.
64. Louie L, Matsumura SO, Choi E. Evaluation three rapid methods for detection of methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, **2000**, s.38:2170-2173.
65. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *New Engl J Med*, **1998**, s.8:520-532.
66. Mandell GJ, Douglas R, Bennett ED. Principles and practices of infectious disease disease. 4th ed. Churchill Living Stone, Edinburg, UK, **1995**.
67. Marrack P ve Kappler J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science*, 1990, s.248:705-711.
68. Martins A ve Cunha Mde L. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects. *Microbiol Immunol*, **2007**, s.51(9):787-95.
69. Ma XX, Ito T, Tiensaitorn C, Jamklang M, Chongtrakool P ve ark. Extended antimicrobial susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis growing in biofilms. *Vet Microbiol*, **2007**, s.125:141-149.
70. Melchior MB, Fink-Gremmels J, Gaastra W. Extended antimicrobial susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis growing in biofilms. *Vet Microbiol*, **2007**, s.125:141-149.
71. Mohanasoundaram KM ve Lalitha MK. Comparison of phenotypic versus genotypic methods in the detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Indian J Med Res*, **2008**, s.127(1):78-84.
72. Moon JS, Lee AR, Kang HM, Lee ES, Kim MN ve ark. Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea. *J Dairy Sci*, **2007**, s.90:1176-1185.
73. Niemeyer DM, Pucci MJ, Thanassi JA, Sharma VK, Archer GL. Role of *mecA* transcriptional regulation in the phenotypic expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, **1996**, s.178:5464-5471.
74. Odd GB ve Maeland JA. Mechanism of methicillin resistance in staphylococci. *APMIS*, **1997**, s.105:264-276.
75. Ogawa H. Antibiotic resistance in pathogenic and producing bacteria with special reference to β -lactam antibiotics. *Microbiol Rev*, **1981**, s.45:591-619.
76. Oliveira DC ve de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. **2002**, s.46:2155-2161.
77. O'Mahony AP, Abbott Y, Leonard FC, Markey BK, Quinn PJ ve ark. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from animals and veterinary personel in Ireland. *Vet Microbiol*, **2005**, s.109:285-296.

78. **Özmen Ö.** Mastitislerde etiopatogenez. Süt inekçiliğinde mastitis sempozyumu. Akdeniz Üniv Vet Fak Yayın Ünitesi. Yayın No: 2, 04-05 Mayıs 2001, Burdur, Türkiye, s.21-29.
79. **Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR.** Clinical Veterinary Microbiology. Blackwell Science Ltd, Oxford, **1994**, s.118-126
80. **Resende CA ve Figueriedo MS.** Discrimination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from borderline-resistant and susceptible isolates by different methods. *J Med Microbiol.* **1997**, s.46:145-149.
81. **Roberson JR, Fox LK, Hancock DD.** Evaluation methods for differentiation of coagulase positive staphylococci. *J Clin Microbiol.* **1992**, s.30:3217-3219.
82. **Sancak B, Ercis S, Haşcelik G.** Comparison of the value of disk diffusion methods and polymerase chain reaction for fixation of methicillin resistant staphylococcus. *Mikrobiyol Bul,* **2003**, s.37:109-115.
83. **Sareyyüpoğlu B, Cantekin Z, Akan M.** Mastitiisli sütlerden izole edilen stafilkoklarda metisilin direncinin fenotipik ve genotipik olarak belirlenmesi. VII. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), Side-Antalya, Türkiye, 26-28 Eylül 2006, s.98.
84. **Sevgican E.** Staphylococcus türlerinde metisilin direncinin farklı yöntemlerle saptanması ve SCCmec tiplendirmesi. Uzmanlık tezi. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa, **2006**.
85. **Skov R, Larsen AR, Frimodt-Møller N, Espersen F.** Evaluation of different disk diffusion/media combinations for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *APMIS*, **2003**, s.111:905-914.
86. **Strommenger B, Kehrenberg C, Kettlitz C, Cuny C, Verspohl J ve ark.** Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from pet animals and their relation to human isolates. *J Antimicrob Chemother*, **2006**, s.57:461-465.
87. **Sutra L ve Poutrel B.** Detection of capsular polysaccharide in milk of cows with natural intramammary infection caused by *Staphylococcus aureus*. *Am J Vet Res*, **1990**, s.5:1857-1859.
88. **Swenson JM, Williams PP, Killgore G, O'Hara CM, Tenover FC.** Performance of eight methods, including two new rapid methods, for detection of oxacillin resistance in a challenge set of *Staphylococcus aureus* organisms. *J Clin Microbiol*, **2001**, s.39:3785-3788.
89. **Tomlin J, Pead MJ, Lloyd DH, Howell S, Hartmann F ve ark.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in 11 dogs. *Vet Rec*, **1999**, s.16: 60-64.
90. **Turutoğlu H, Hasoksuz M, Ozturk D, Yildirim M, Sagnak S.** Methicillin and aminoglycoside resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis and sequence analysis of their *mecA* genes. *Vet Res Commun*, doi: 10.1007/s11259-009-9313-5, **2009**.
91. **Türkyılmaz S, Tekbıyık S, Oryasin E, Bozdoğan B.** Molecular epidemiology and antimicrobial resistance mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. *Zoonoses Public Hlth*. doi: 10.1111/j.1863-2378.2009.01257.x, **2009**.
92. **Türütoğlu H, Ateşoğlu A, Salihlioğlu H, Öztürk M.** Marmara bölgesi süt ineklerinde mastitise neden olan etkenler. *Pendik Vet Mikrobiyol Derg*, **1995**, s.26:125-137.

93. Ünal S. *Staphylococcus aureus*: Direnç Mekanizmaları. Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. Gram pozitif bakteri infeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, **2004**, s.23-38.
94. Ünal S. Stafilocoklarda metisilin direnç mekanizmaları ve metisilin direnç tespit yöntemleri. *Flora Derg.* **1996**, s.1:14-17.
95. van Duijkeren E, Box AT, Heck ME, Wannet WJ, Fluit AC. Methicillin-resistant staphylococci isolated from animals. *Vet Microbiol*, **2004**, s.103:91-97.
96. Vitov J, Aarestrup FM, Zinn CE, Olsen JE. Association between phage types and antimicrobial resistance among bovine *Staphylococcus aureus* from 10 countries. *Vet Microbiol*, **2003**, s.95:133-147.
97. Voss A ve Doebbeling BN. The worldwide prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents*, **1995**, s. 5:101-106.
98. Yasuda R, Kawano J, Onda H, Takagi M, Shimizu A ve ark. Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci isolated from healthy horses in Japan. *Am J Vet Res*, **2000**, s. 61:1451-1455.
99. Waldvogel FA. *Staphylococcus aureus* In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th ed. Churchill Livingstone, New York, **2000**, s. 2069-2091.
100. Wang SC, Wu CM, Xia SC, Qi YH, Xia LN ve ark. Distribution of superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates from milk samples of bovine subclinical mastitis cases in two major dairy production regions of China. *Vet Microbiol*, **2009**, s.137:276-281.
101. Watts JL. Etiological agents of bovine mastitis. *Vet Microbiol*, **1988**, s.16:41-66.
102. Weese JS, Archambault M, Willey BM, Hearn P, Kreiswirth BN ve ark. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and horse personnel, 2000-2002. *Emerg Infect Dis*, **2005**, s.11:430-435.
103. White DG ve McDermott PF. Emergence and transfer of antibacterial resistance. *J. Dairy Sci*, 84(E Suppl.), **2001**, E151-E155.
104. Wilson DJ, Gonzales RN, Das HH. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania-prevalence and effects on somatic cell count and milk production. *J Dairy Sci*, **1997**, s.80:2592-2598.
105. Zecconi A, Cesaris L, Liandris E, Daprà V, Piccinini R. Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microb Pathog*, **2006**, s.40:177-183.
106. Zeeshan M, Jabeen K, Khan E, Irfan S, Ibrahim S ve ark. Comparison of different phenotypic methods of detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* with the molecular detection of *mec-A* gene. *Coll Physicians Surg Pak*, **2007**, s. 17:666-670.
107. Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Louie T, Conly JM. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, **2005**, s. 43:5026-5033.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Bingöl'ün Karlıova ilçesinde doğdu. 2002 yılında kazandığı Mustafa Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2006 yılında mezun oldu. Aynı yıl Mustafa Kemal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisansa başladı. Yüksek Lisansını 2010 yılında tamamladı.