



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI

**MASTITİS İZOLATI STAFİLOKOK SUŞLARINDA
VANKOMİSİN DİRENÇLİLİĞİNİN FENOTİPİK VE
GENOTİPİK OLARAK ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mehmet Onur GÖKDAĞ

**Samsun
Temmuz-2017**



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI

**MASTITİS İZOLATI STAFİLOKOK SUŞLARINDA
VANKOMİSİN DİRENÇLİLİĞİNİN FENOTİPİK VE
GENOTİPİK OLARAK ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mehmet Onur GÖKDAĞ

**Danışman
Doç. Dr. Alper ÇİFTÇİ**

**Samsun
Temmuz-2017**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mehmet Onur GÖKDAĞ tarafından Doç. Dr. Alper ÇİFTÇİ Danışmanlığında hazırlanan “Mastitis izolatu stafilokok suşlarında vankomisin dirençliliğinin fenotipik ve genotipik olarak araştırılması” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 11/07/2017 tarihinde yapılan sınav ile Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç.Dr. Arzu FINDIK
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD

Üye: Doç.Dr. Serap SAVAŞAN
Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD

Üye: Doç.Dr. Alper ÇİFTÇİ
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD

ONAY

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

.... / /.....

Prof. Dr. Ahmet UZUN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim ve tez çalışmalarım süresince ilgi ve desteğini esirgemeyen, tez konusunun seçilmesinde ve çalışmaların yürütülmesinde büyük katkısını gördüğüm tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Alper ÇİFTÇİ'ye, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Oktay GENÇ, Prof. Dr. Timur GÜLHAN, Doç.Dr. Arzu FINDIK, Doç. Dr. Özlem BÜYÜKTANIR YAŞ'a ve bilgisine danıştığım, desteğini esirgemeyen tüm meslektaşlarıma ve aileme destekleri için teşekkür ederim.

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde PYO.VET.1904.14.005 nolu proje ile finansal destek sağlayan Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler (BAP) Birimine teşekkür ederiz.

ÖZET

MASTITİS İZOLATI STAFİLOKOK SUŞLARINDA VANKOMİSİN DİRENÇLİLİĞİNİN FENOTİPİK VE GENOTİPİK OLARAK ARAŞTIRILMASI

Amaç: Bu çalışmada mastitis izolatı stafilocok suşlarında vankomisin dirençliliğinin, diğer bazı antibiyotiklere dirençliliğinin ve bazı virülens faktörlerinin fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve metot: Çalışma kapsamında 100 adet stafilocok izolatı incelendi. İzolatlar PCR ile tanımlanarak edildi. Tüm izolatların oksasilin, vankomisin, teikoplanin, trimetoprim-sulfometaksazol, tetrasiklin, penisilin G, sefaperazon ve amoksisilin-klavulonik asite karşı antibiyotik dirençlilikleri Kirby bauer disk difüzyon yöntemi ile belirlendi. Vankomisin dirençli izolatların Minimal İnhibe Edici Konsantrasyonları (MİK)'nin belirlenmesi broth mikro dilüsyon tekniği ile gerçekleştirildi. Vankomisin direnç genotipleri PCR ile belirlendi. Vankomisin dirençli izolatların filogenetik yakınlıkları RAPD-PCR ile araştırıldı. *Staphylococcus aureus* izolatlarında virülenste rol oynadığı bilinen *coa* ve *spa* genlerinin polimorfizmleri PCR ile araştırıldı.

Bulgular: İzolatların 73 adeti *S. aureus* ve 27 adedi de *Staphylococcus* spp. olarak tanımlanarak edildi. İzolatların 9, 5, 5, 7, 6, 4, 11 ve 17 adedi sırasıyla 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ve 1 antibiyotiğe karşı dirençli olduğu belirlendi. Otuzaltı adet izolatın tüm antibiyotiklere duyarlı olduğu saptandı. *Staphylococcus* spp. izolatlarında vankomisin direnci bulunmazken, 9 adet *S.aureus* izolatında vankomisin direnci belirlendi. Vankomisin dirençli izolatların 2 adetinin 64 µg/ml ve 7 adetinin de 32 µg/ml oranında vankomisine dirençli olduğu saptandı. İki adet izolatın *vanA* ve 3 adetinin de *vanR* genini içerdikleri saptandı. Dört adet izolatta ise incelenen direnç genleri belirlenemedi. Vankomisin dirençli suşların %51-75 oranında benzerlik gösteren 9 adet tekli genotip gösterdikleri belirlendi. *S. aureus* izolatlarından 48 adeti 9 farklı profilde *coa* polimorfizmi gösterdi. Otuzbeş izolatın ise *coa* geni içermediği belirlendi. İncelenen 73 adet izolatın *spa* geni içerdiği ve 4 farklı profilde oldukları saptandı.

Sonuç: Mastitis kökenli stafilocok suşlarında vankomisin direncinin belirlendi ve bu suşları içeren sütlerin ve süt ürünlerinin halk sağlığı yönünden bir risk teşkil ettiği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: PCR; mastitis; *Staphylococcus* spp.; vankomisin

Mehmet Onur GÖKDAĞ, Yüksek Lisans Tezi
Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Temmuz-2017

ABSTRACT

**THE PHENOTYPIC AND GENOTYPIC INVESTIGATION OF
VANCOMYCINE RESISTANCE AMONG MASTITIS ISOLATES OF
STAPHYLOCOCCI**

Aim: This study was aimed to determine the vancomycin resistances, antibacterial resistance profiles and some virulence genes pheno- and genotypically among staphylococci from mastitis.

Material ve methods: A total of 100 staphylococcal isolates which are available in our culture collection were investigated. The isolates were identified by PCR. The antibacterial resistances of the isolates against oxacillin, vancomycin, teicoplanine, trimetophrim-sulfometaxazole, tetracycline, penicilline G, cefaperazone and amoxicillin-clavulanic acide were determined by Kirby Bauer disc diffusion method. The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of vancomycin for phenotypically vancomycin resistant isolates were investigated by broth micro dilution technique. The vancomycin resistance genotypes were determined by PCR. The phylogenetic relation among vancomycin resistant isolates were determined by RAPD-PCR. *coa* and *spa* polymorphisms of *Staphylococcus aureus* isolates were determined by PCR.

Results: Seventy-three and 27 of the isolates were identified as *S.aureus* and *Staphylococcus* spp., respectively. The 9, 5, 5, 7, 6, 4, 11 and 17 isolates were determined as resistant to 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 and 1 antibiotics, respectively. Thirty-six isolates were found as sensitive to all antibiotics. Nine *S.aureus* isolates were found as vancomycin resistant. Among these isolates, the MIC of vancomycin for 2 isolates were 64 µg/ml and for 7 isolates MIC values were 32 µg/ml. Two and 3 of the isolates carried *vanA* and *vanR* genes, respectively. Four of the isolates did not carry any investigated *van* genes. The phylogenetic relations of the vancomycin resistant isolates were calculated as 51-75% and showed 9 unique genotypes. Forty-eight of the isolates showed polymorphism in *coa* gene and had 9 different *coa* profiles. All the investigated isolates carried *spa* gene and showed 4 different profiles.

Conclusion: In a study, determining the vancomycine resistant isolates from mastitis isolates of staphylococci were showed that the milks and milk products which carry vancomycine resistant staphylococci possess a risk for public health.

Keywords: PCR; mastitis; *Staphylococcus* spp.; vancomycine

Mehmet Onur GÖKDAĞ, Master Thesis
Ondokuz Mayıs University-Samsun, July-2017

SİMGELER VE KISALTMALAR

CNS	: Koagulaz negatif
<i>coa</i>	: Koagulaz
CPS	: Koagulaz pozitif
FnbpA	: Fibronektin bağlayıcı proteinler A
FnbpB	: Fibronektin bağlayıcı proteinler B
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
I	: Orta derecede duyarlı
Ig	: İmmunglobulin
MgCl₂	: Magnezyum klorür
MİK	: Minimal İnhibe Edici Konsantrasyon
NaCl	: Sodyum klorür
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
R	: Dirençli
RAPD-PCR	: Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA- polimeraz zincir reaksiyonu
S	: Duyarlı
<i>spa</i>	: Stafilokokkal protein A
TSST-1	: Toksik şok sendrom toksin-1

İÇİNDEKİLER	
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR	iv
İÇİNDEKİLER	
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
3.MATERYAL VE METOT	11
3.1. Bakteri izolatları	11
3.2. İdentifikasyon	11
3.3. Antibiyotik duyarlılık testleri	12
3.4. Vankomisin direnç seviyesinin belirlenmesi	13
3.5. Vankomisin direncinin genotipik olarak belirlenmesi	14
3.6. Virülens genlerinin belirlenmesi	15
3.7. Genotiplendirme ve filogenetik analiz	16
4. BULGULAR	17
4.1. Bakteri izolatları	17
4.2. İdentifikasyon	17
4.3. Antibiyotik duyarlılık testleri	18
4.4. Vankomisin direnç seviyesinin belirlenmesi	23
4.5. Vankomisin direncinin genotipik olarak belirlenmesi	23
4.6. Virülens genlerinin belirlenmesi	24
4.7.Genotiplendirme ve filogenetik analiz	25
5. TARTIŞMA	27
6. SONUÇ	32
KAYNAKLAR	33
ÖZGEÇMİŞ	38

1.GİRİŞ

Sığır varlığı bakımından dünyada 27, AB ülkeleri içinde 3. sırada yer alan Türkiye, önemli bir hayvancılık potansiyeline sahip olmasına rağmen elde edilen verim bakımından dünya standartlarının çok altında bulunmaktadır. Süt ve süt ürünleri üretiminde mevcut materyal ile olması gereken üretim seviyesi arasında büyük fark bulunmaktadır. Süt üretiminde istenilen hedeflere ulaşmak için seçkin gen kaynaklarına sahip olmak bir yana bırakılırsa, mevcut materyalden yeterince yararlanamamak da ekonomik kaybın önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Bu kaybın oluşmasına katkıda bulunan faktörler arasında meme hastalıkları önemli yer tutmaktadır (Anonim, 2007; Dinç, 1995).

Türkiye’de süt üretiminde ilk sırada bulunan sütçü ineklerin payı her geçen yıl artmaktadır. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre 2005 yılında sütçü ineklerden elde edilen süt, toplam üretilen sütün %90.26’sını oluştururken, 2007 yılında bu oran %91.26’ya çıkmıştır (Anonim, 2007). Tarımsal ekonominin önemli ve dinamik bir sektörünü oluşturan süt endüstrisinin ve süt sığırı yetiştiriciliğinin tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de karşılaştığı en büyük sorunların başında “Mastitis” gelmektedir (Baştan ve ark., 2001). Mastitis latent, subklinik ve klinik olarak görülebilmektedir. Subklinik mastitis meme dokusunda ve sütte gözle görülebilen bozukluklara yol açmayan, ancak uzun süreçte süt veriminde azalma ve kalitesinde düşmeyle seyreden bir meme yangısı olarak tanımlanmaktadır (Baştan ve ark., 1997b). ABD’nde mastitis nedeniyle meydana gelen yıllık zararın toplam 2 milyar dolar (Schroeder, 1997), Japonya’da yıllık yaklaşık 69 milyar yen zarar oluşturduğu (Sugimoto ve ark., 2006) ve İngiltere’de ise 300 milyon sterlin olduğu tahmin edilmektedir (Hillerton ve Berry, 2005). Türkiye’de yılda 11 milyon ton süt üretildiği, süt ineklerinin ortalama % 30’unun mastitisli olduğu, mastitis nedeniyle süt verimindeki azalmanın yaklaşık %10 olduğu görülmektedir. Mastitisler toplam sığır hastalıklarının % 26’sını oluşturmaktadırlar. Ülkemizde önceki yıllarda yapılan araştırmalarda birçok mastitis vakası tespit edilmiş, tespit edilen vakaların çoğunluğunun subklinik olarak seyrettiği görülmüştür (Özdemir, 2005, Yeşilmen ve ark., 2012). Ülkemizde mastitiste bağlı ekonomik kaybın yılda yaklaşık 57,7 milyon TL olduğu tahmin edilmektedir ve mastitis kontrol programı için harcanan paranın 5 katının verim olarak geri döneceği bildirilmektedir (Tekeli, 2005; Çokal ve Konuş, 2012). Türkiye’de sütçü sığırlardaki

mastitisin durumu, hastalığın oluşumunda rol oynayan etkenler ve tedavisi ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Baştan ve ark., 1997a; Glc ve Ertaş, 2002; Küplülü ve ark., 1995; Köker ve Salmanoğlu, 2000; Rişvanlı ve Kalkan, 2002).



2.GENEL BİLGİLER

Sığır mastitisleri süt işletmelerinde azalan süt üretimi, artan tedavi masrafları, itlaf ve ölüm oranları nedeniyle işletmeler ve üreticiler için maliyetli ve multifaktöriyel bir hastalıktır. Mastitis, fiziksel ve kimyasal ajanlarla birlikte çoğunlukla çeşitli infeksiyöz ajanlar (genellikle bakteriler) tarafından oluşturulmaktadır. Mastitisli inek sütlerinde bakteriyel, viral ve fungal olmak üzere 130'dan fazla farklı mikroorganizma türü izole edilmiştir. En yaygın bakteriyel mastitis nedenleri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* ve *Enterococcus faecalis* gibi patojenlerdir (Bray ve Shearer, 1994). *S.agalactiae* ve *S.aureus* infekte sığırlarda kontagiyöz infeksiyona neden olan meme patojenleri iken *E. faecalis*, *E.coli*, *S.uberis* ve *S.dysgalactiae* çevresel kaynaklı, altlık, toprak gibi yerlerden fekal kontaminasyon ile infeksiyon oluşturan bakterilerdir. Oluşan meme infeksiyonlarının şiddeti ise bakterilerin sahip oldukları virulens faktörlerine ve konak cevabına göre değişmektedir. İnfeksiyonun oluşması için öncelikle meme bezine bakterilerin kolonize olması gerekmektedir. Kolonizasyonun sağlanması mastitis etkenlerinin epitel hücrelerine adezyonu ile başlar ve bakterinin sahip olduğu çeşitli virulens özellikler ile infeksiyon devam ettirilir. Son yapılan çalışmalarda geliştirilen moleküler teknikler ile bakterilerin virülens özellikleri araştırılmış ve çevresel koşulların değişimi, infeksiyon sırasında konak-bakteri arasındaki etkileşimler sonucunda virulens özelliklerin ortaya çıkma durumunun da değiştiği belirlenmiştir.

Stafilokokları ilk kez 1878'de Robert Koch tanımlamış, 1880'de Pasteur sıvı besi yerinde üretmiş ve 1881'de İskoçyalı cerrah Alexander Ogston fare ve kobaylar için patojen olduğunu vurgulamıştır. *Staphylococcus* ismi Grekçe "staphyle" (üzüm salkımı) tabirinden türetilmiştir ve karakteristik kümelenmeler yaptıklarından dolayı Alexander Ogston tarafından seçilmiştir. Rosenbach 1884'te beyaz renkli kolonileri *Staphylococcus albus*, sarı-portakal rengi kolonileri ise *Staphylococcus aureus* olarak isimlendirmiştir. Bakteride 1900 yılında alfa toksini, 1935 yılında ise beta toksini, 1938'de gama ve 1947'de de delta toksini bulunmuştur. 1978'de bakterinin "Toksik Şok Sendromu" adında yeni bir hastalığa neden olduğu bulunmuştur.

Staphylococcus aureus, hem subklinik hem de klinik mastitis vakalarında oldukça fazla bulunmakta olup en çok karşılaşılan kronik mastitis etkenlerinden biridir. Vakalar genellikle subklinik olup ne sütte bir anormallik ne de memede belirlenebilir

bir değişiklik yoktur. Bazı sığırlarda özellikle buzağılamadan sonra klinik mastitis olayları patlak verir. Subklinik mastitis vakaları diğer sığırlar için bir infeksiyon kaynağı oluşturabilmekte olup klinik olanlara kıyasla 40-50 kez daha fazla şekillenmesi hastalığın ekonomik önemini artırmaktadır (Quinn ve ark., 1994). Günümüzde *S. aureus* nedenli sığır mastitis vakalarından uzaklaştırılmasına yönelik yapılan çalışmalar yetiştiricilerin birden fazla ve belki de bilinmeyen bazı rezervuarları belirlemedeki yetersizliklerine bağlı olarak tüm infeksiyonları ortaya koyamamaları ve birçok antibiyotik tedavi girişimleri sonucunda ortaya çıkan antibiyotik dirençliliği yüzünden başarılı olamamaktadır (Fox ve ark., 2001).

Stafilokoklar *Micrococcaceae* ailesine ait olup, fakültatif anaerobik, Gram pozitif, katalaz pozitif koklardır. Stafilocokların ideal üreme sıcaklıkları 37°C civarındadır. Laboratuvarlarda besi yerlerinde 37°C’de 24-48 saat inkübasyon süresinde üreme gözlenir. Kolonileri düzgün ve ortalama 2-4 mm çapındadır. Karbonhidrat fermentasyonu gözlenebilir. Pigment üretimi sonucu farklı renkte koloniler oluşturabilirler. Örneğin *S. aureus* altın sarısı, *S. epidermidis* ise beyaz renkte koloni oluşturur. Eğer anaerobik şartlar mevcutsa pigment oluşturamazlar (Tanrıbuyurdu., 2014). Stafilocoklar yüksek NaCl derişimlerinde (%10-15) üreyebilirler bununla birlikte kanlı agar, nutrient agar, triptik soy agar veya beyin kalp infüzyon agar gibi birçok besi yerinde de ürerler. *S. aureus* yüksek tuz yoğunluğunda üreyebilir. *S. aureus* diğer stafilocoklardan mannitol salt agar’da koloniler etrafında sarı bir hale oluşturmasıyla ayrılır. Fakat *S. saprophyticus* gibi diğer bazı stafilocoklar da MSA’da benzer koloniler oluşturabilirler. Patojen olan stafilocok suşlarında pigment ve hemoliz görülebilir. Patojenik stafilocok suşlarının ayırımında özel besi yeri olarak DNase testi için DNase agardan yararlanılır. Stafilocoklar genel sıvı besi yerlerinde 24 saatlik inkübasyon sonunda orta dereceden koyuya kadar değişen bir bulanıklık oluşturur. Sıvı besi yerinde üreyen stafilocoklar pigment oluşturmazlar. Genellikle aerobiktirler. *S. saccharolyticus* ve *S. aureus subsp. anaerobius* türleri zorunlu anaerobiktir. Fakültatif anaerob türleri de bulunmaktadır. Anaerobik ortamda glukozdan asit oluşumu gözlenmektedir. MacConkey agarda da üreme yeteneğine sahiptirler. Patojen stafilocoklar kültür ortamında +4°C’de 2-3 ay, -20°C’de ise 3-6 ay canlı kalabilirler. Stafilocoklar, sporsuz olmalarına rağmen dış etkenlere ve dezenfektanlara karşı en çok dayanabilen bakterilerdir. 60°C’ye 30 dakika civarında dayanabilirler. Sodyum klorürün %9’luk

konsantrasyonlarına ve sakkarozaya toleranslıdırlar. %2'lik fenolde 15 dakikada inaktive olurlar. Buna karşın alkol ve iyot gibi antiseptiklere de oldukça duyarlıdırlar (Koneman ve ark., 2005).

Stafilokokların sınıflandırmasında koagülaz üretimi en önemli biyokimyasal özelliklerdendir. Stafilokoklar; koagülaz pozitif (CPS) ve koagülaz negatif (CNS) olarak ikiye ayrılır. *S. aureus*, koagülaz pozitifdir ve en önemli patojendir. Diğer koagülaz pozitif olanlar *S. aureus*, *S. schleiferi subsp. coagulans*, *S. aureus subsp. anaerobius*, *S. delphini*, *S. hyicus* ve *S. intermedius* 'tur. Koagülaz negatif stafilokoklar daha önceleri sadece normal flora bakterisi olarak görülürken günümüzde patojen etkenlerinin de olduğu bilinmektedir. Koagülaz-negatif stafilokoklar da sığır mastitisine neden olabilmektedirler (Taponen ve Pyorola, 2000). İnsanlarda ve hayvanlarda infeksiyonlarına neden olan en önemli tür *S. aureus* 'tur. *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* fırsatçı patojenlerdir ve genellikle infeksiyon oluşumuna sebep olurlar. *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. saccharolyticus*, *S. cohnii* ve *S. simulans* fırsatçı patojenlerdir ancak daha az infeksiyona neden olurlar. *S. aureus*, *S. auricularis*, *S. intermedius*, *S. hyicus* ve *S. caseolyticus* ise herhangi bir gruba dahil edilmemiştir (Uçan, 2014).

Stafilokokların genomları yaklaşık 2000-3000 kbp büyüklükte kromozom ile profajlar, plazmidler ve transpozonlardan oluşmaktadır. Stafilokokal DNA'da düşük oranda Guanin ve Sitozin (G+C) bulunur. G+C içeriği % 30-39 mol arasındadır. Bununla beraber *Micrococcus* üyelerinde G+C içeriği % 68-74 moldur. *S. aureus*'un genomu, 2500'e yakın geni kodladığı düşünülen 2800 kbp uzunluğunda tek bir kromozomdan oluşur ve ortalama % 32 mol G+C içerir. *S. epidermidis*'in genomu, 2500 kbp uzunluğundaki bir kromozom ve çeşitli sayıdaki plazmidlerden (*S. epidermidis* ATCC12228 altı plazmid ve RP62A suşu tek plazmid içerir) oluşmaktadır. Bu türler % 32'lik G+C içeriğine sahiptir ve 2400-2500 kodlanmış sekans içermektedir (Baba ve ark., 2002).

Mastitise neden olan *S. aureus* suşlarında virulenste rol oynayan bir çok faktör olduğu bildirilmiştir. Bu faktörler arasında ekzotoksinler, yüzey proteinleri (Takeuchi ve ark., 2001) ve ekstraselüler polisakkaritler (Aguilar ve ark, 2001) yer almaktadır. Ayrıca mastitise neden olan *S.aureus* suşlarında slime faktör üretiminin patogeneзде etkili olan önemli bir virulens faktör olduğu da belirlenmiştir (Takeuchi ve ark., 2001).

Mastitis patogenezindeki ilk aşamanın *S. aureus*'un meme bezi epiteline adhezyonunun olduğu düşünülmektedir (Cifrian ve ark., 1994). Meme bezi epiteline aderens ve kolonizasyonda slime faktörü rol oynamaktadır. Slime faktör üreten *S. aureus* suşlarının üretmeyen suşlara oranla dikkate değer oranda daha fazla kolonizasyon kapasitesinde oldukları belirlenmiştir (Baselga ve ark., 1993). Slime faktör üretimi ayrıca antibiyotiklere dirençte de rol oynamaktadır ve slime faktör üreten suşların üretmeyenlere oranla antibiyotiklere daha dirençli oldukları bildirilmiştir (Amorena ve ark., 1999).

Stafilokok virulansında etkili olan en önemli faktörler hücre duvarı, kapsül, yüzey proteinleri, toksinler ve enzimlerdir.

Stafilokokların hücre duvarının kuru ağırlığının yaklaşık %50'si peptidoglikan tabakadır. Bu tabaka insandaki Gram negatif bakterilerin endotoksinlerine benzerlik gösterir. Makrofajlardan sitokin salınımını uyararak, komplemanın aktivasyonuna yol açar ve trombosit agregasyonuna neden olur. Bunun dışında monositlerden interlökin-1 salınımını uyarır ve lökositlerin infeksiyon bölgesine toplanmasını sağlayarak apse oluşumuna sebep olur. Stafilokokların hücre duvarında yer alan teikoik asit sadece Gram pozitif bakterilerde bulunur. Teikoik asit stafilokokların konağa adherensini sağlar.

Çoğu *S. aureus*'un kökeninde bakteriyi fagositozdan koruyan ve konak hücrelere adherensini sağlayan ekzopolisakkarid yapıda bir mikrokapsül bulunmaktadır.

S. aureus'un kolonizasyon sürecini başlatan konakçı hücre yüzeyine tutunması bazı adhezinler aracılığıyla olur. *S. aureus* adhezinlerinin büyük bir sınıfı hücre peptidoglikanlarına tutunan ortak Protein A (spA) olarak isimlendirilen proteinleri içerir. Protein A IgG3 hariç diğer IgG'lerle, IgA2 ile bazı IgM'lerin Fc reseptörleri ile birleşebilmektedir. Bu nedenle protein A'nın antikomplemanter ve antifagositer etkinliği vardır.

Protein A spesifik bakteriyel antijenlere karşı Ig molekülüne bağlanması ve bakteriyi aglütine etmesi gibi özellikleri bakımından immunoloji ve diagnostik laboratuvar teknolojisinde önemli bir reaktif haline gelmiştir (Koneman, 2005).

Diğer stafilokokal yüzey proteinleri; fibronektin bağlayıcı proteinler A ve B (FnbpA ve FnbpB), kollojen bağlayıcı protein, elastin bağlayıcı protein ve kümeleştirici faktör (Clf) A ve B proteinleridir. Kimyasal yapıları ve hücre duvarı yerleşimleri

birbirlerine benzer olan bu proteinler; stafilocokların konak dokularında kolonize olmasında önemli rol oynamaktadır (Sareyyüpoğlu B, 2013).

Stafilokokların hücre zarına etkili olduğu bilinen 5 sitotoksini vardır. Bunlardan alfa, beta, delta ve gama toksinleri hemolizin özelliğindedir. Leukosidin adlı toksin lökositler üzerine etkilidir. Eksfoliatif toksin dermatitislere neden olur. Toksik şok sendrom toksin-1(TSST-1) insanlarda toksik şok sendromunun nedenidir.

Stafilokoklar enterotoksin de üretebilmektedirler. Bazı *S. aureus* ve *S. epidermidis* suşlarının enterotoksin üretme yeteneği olduğu saptanmıştır. Serolojik olarak A, B, C, D ve E harfleri ile ifade edilen 5 gruba ayrılabilirler (Çavuşoğlu, 2012).

Stafilokokların virülensinde rol oynayan birçok enzim bulunmaktadır. Koagülaz enzimi Coagulase-Reacting faktör ile birleşerek aktifleşir inaktif olan fibrinojeni fibrine dönüştürerek plazmayı pıhtılaştırır. Ekstrasellüler bir proenzimdir. *S. aureus* için, patojen olan-olmayan stafilokok ayrımı yapılır. Mikroorganizma fibrin ile kaplanma sonucu opsonizasyondan ve fagositozdan korunabilir ve bu da patojenliğine katkı sağlamış olur.

Katalaz enzimi, toksik olan hidrojen peroksidi toksik olmayan oksijen ve suya dönüştürür. Bakteriler, bu enzim sayesinde toksik oksijen radikalleri tarafından öldürülmeye karşı direnç kazanır.

Fibrinolizin (Stafilokinaz (SAK)) fibrin pıhtısının çözülmesine neden olur. Plazminojen aktivatörüdür. Fagositoz için önemli komponentler olan IgG ve C5 gibi opsoninlerin parçalanmasını sağlayarak antiopsonik bir etki gösterdiği ve bakteriyi fagositozdan korumaktadır.

Hiyalüronidaz, hücreler arası mukopolisakkaritleri parçalayarak konakçı dokularında stafilocokların yayılmasına ve gelişmesine katkıda bulunur.

Termonükleaz (Stafilokokal nükleaz), ısıya dirençli bir enzimdir. Endo ve ekzonükleolitik özellikleri olan fosfodiesteraz yapısındadır. Konak hücrelerin DNA ve RNA'sını hidrolize edebilir.

Lipaz ekstrasellüler bir enzimdir. Yağları hidrolize ederek vücudun yağ içeren bölgelerinde stafilokokların yaşamasını sağlar.

Deoksiribonükleaz (DNAse) nükleik asitleri fosfomononukleotidlere parçalayan endo ve ekzonükleaz aktivitesine sahip fosfodiesterazlardır.

Beta-laktamazlar (Penisilinaz), penisilini, penisiloata hidroliz eden ve stafilokoklarda penisilin direncine neden olan enzimdir.

Patojenin izolasyonu ve identifikasyonu ile antibiyotik dirençliliğinin belirlenmesi *S. aureus* mastitislerinin teşhisinde kullanılan klasik metotlardır (Quinn ve ark., 1994). Diğer konakçıların suşlarında olduğu gibi sığır *S. aureus* suşları da klasik olarak plazmayı koagule edip etmemesine göre tanımlanır. Hemoliz modelleri (alfa ve beta) de stafilokokları karakterize etmede kullanılan bir metottur. Ancak tüm *S. aureus* suşları hemolizin oluşturmadığı gibi koagulaz negatif bazı izolatlar hemolizin oluşturabilmektedir. Isıya dirençli nükleaz ve termonükleaz testleri de *S. aureus* identifikasyonundan kullanılan testlerdendir (Fox ve ark., 2001). Veteriner mikrobiyolojide sığır *S. aureus* suşlarının karakterizasyonu için bir çok teknik kullanılmaktadır. Fenotipik metotların yanı sıra genotipik olarak PCR ve multipleks PCR metotları da teşhis ve karakterizasyonda kullanılan önemli tekniklerdir (Nak, 1999).

Bakteriler ve diğer patojen mikroorganizmalarla oluşan enfeksiyonların önlenmesi ve tedavisinde kullanılan etkili ajanların keşfi modern tıbbın en önemli gelişmelerinden biri olmakla birlikte, antienfektif potansiyele sahip maddeler aslında binlerce yıldır kullanıla gelmiştir. Günümüzden 2500 yıl önce Çinliler küflenmiş soya fasulyesinin çeşitli cilt enfeksiyonlarındaki tedavi edici etkisini biliyorlardı. Çok eski tarihlerden beri dünyanın değişik yerlerindeki pek çok uygarlıkları kurmuş olan insanlar bitkilerden yapılmış ilaçlarla yüzeysel ve sistemik enfeksiyonları tedavi etmeye çalışmışlardır. Modern kemoterapi çağı 1936 yılında sülfonamidlerin keşfi ve klinik kullanıma girmesiyle başladı. Penisilin klinikte kullanılmaya başlandığı 1944 yılına kadar değişik 6 sülfonamid preparatları antibakteriyel tedavinin seçkin ilaçları olmuştur. 1940'lı yıllarda penisilin tedavide kullanılmaya başlanmasıyla birlikte, stafilokokal enfeksiyonlara bağlı mortalite oranı hızla azalma göstermiştir. Ancak kısa bir süre sonra, *S. aureus* suşları penisilinaz enzimi üretmeye başlayarak penisiline direnç geliştirmiş ve bu dirençli suşlar hızla yayılmıştır. 1950'lerin sonlarında suşların yaklaşık %50'si penisiline dirençli hale gelmiştir. Aynı tarihlerde tetrasiklin, kloramfenikol ve eritromisine karşı çoklu direnç gösteren *S. aureus* suşları bildirilmiştir.

İlk semisentetik penisilinaza dirençli antimikrobiyal ajan olan metisilin 1959 yılında klinik kullanıma girmiştir. İki yıl sonra, 1961 yılında, ilk metisiline dirençli *S.*

aureus (MRSA) izolatları İngiltere'den bildirilmiş (Jevons, 1961) ve sonradan 1960'lı yıllarda Avrupa'da ve 1970'li yıllarda ABD'de bir problem haline gelmiştir (Hartstein ve Mulligan, 1986). Antibiyotiklere çoklu direnç gösteren MRSA suşları 1980'lerin sonlarında ve 1990'lı yıllarda tüm dünyaya yayılmıştır (Schmitz ve Jones, 1997). ABD'de MRSA izolatlarının oranı 1975'te %2 iken, 1996'da %35'e yükselmiştir. Japonya'da 1992-1993 yıllarında çeşitli coğrafik bölgelerdeki hastalardan izole edilen yaklaşık 7000 suşun analizi, *S. aureus* izolatlarının %60'ının metisiline dirençli olduğunu göstermiştir (Hashimoto ve ark., 1994). MRSA halen tüm dünyada çeşitli büyüklüklerdeki hastanelerde en sık rastlanan nozokomiyal patojenler arasındadır.

Çoklu direnç gösteren MRSA suşlarına bağlı enfeksiyonların artması nedeniyle, son 25 senedir vankomisin, stafilokokal nozokomiyal enfeksiyonların tedavisinde kullanılır hale gelmiştir. Koagülaz negatif stafilokokların klinik izolatlarında vankomisin direnci 1987'de bildirilmiştir (Schwalbe ve ark., 1987). 1990 yılında *S.aureus* enfeksiyonlarının teikoplanin ile tedavisi sonrası, teikoplanine dirençli izolatların seleksiyonuna bağlı klinik başarısızlıklar bildirilmiştir (Kaatz ve ark., 1990). 1997 yılında Japonya, ABD ve Fransa vankomisine azalmış duyarlılık gösteren MRSA izolatlarının ortaya çıkması çok endişe vericidir (CDCP, 1997; Hiramatsu ve ark., 1997). Bu suşlar diğer antimikrobiyal ajanların da çoğuna dirençli olup, vankomisin tedavisine cevap vermeyen hastalardan izole edilmiştir. GISA suşlarının glikopeptidlere azalmış hassasiyeti terapötik alternatifleri sınırlamaktadır.

Vankomisin ilk kez 1956 yılında Borneo Adası'nda bulunan *Streptomyces orientalis*'ten izole edilen dar spektrumlu bakterisidal bir antibiyotiktir. İzolasyonundan çok kısa bir süre sonra 1956 yılında pürifiye edilerek klinik kullanıma girmiştir. İlk yıllarda kullanılan preparatların saf olmaması ve yan etkilerin sıklığı nedeniyle metisilin kullanıma girdikten sonra önemini yitirmiş, ancak ilk kez 1961'de metisiline dirençli bir *Staphylococcus aureus* izolatının bildirilmesi ve 1982 yılından beri giderek artan MRSA enfeksiyonlarının ortaya çıkmasıyla birlikte yeniden önem kazanmıştır.

Bu bilgiler doğrultusunda bu tez çalışmasında, Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonunda bulunan mastitis izolatı stafilokok suşlarında vankomisin dirençliliğinin fenotipik olarak disk difüzyon ve broth dilüsyon yöntemleri; genotipik olarak ise PCR ile belirlenmesi ile beraber antibiyotik

dirençliliğinin ve bazı virülens faktörlerinin fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Bakteri izolatları

Çalışma kapsamında 2009-2014 yılları arasında mastitisli sütlerden izole edilmiş olan ve Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan 100 adet stafilocok izolatı incelendi.

3.2. İdentifikasyon

Çalışmada kullanılan izolatlar %5 koyun kanlı agarda 37°C'de 24 saat inkübasyona tabi tutularak, canlandırıldı. İzolatların fenotipik olarak identifikasyonları için Gram boyama, katalaz ve koagülaz testleri gerçekleştirildi.

Katalaz testi için saf olarak alınan bir koloni %10'luk H₂O₂ ile lam üzerinde süspanse edildi. Süspanسیون sonrası kabarcık şeklinde kendisini gösteren gaz oluşumu katalaz testi pozitif olarak değerlendirildi.

Lamda koagülaz testi için temiz bir lam üzerinde, bir damla sulandırılmış tavşan plazması ile test edilecek izolatlardan alınan bir iki koloni süspanse edildi. Süspanسیونu takip eden 5-10 dakika içerisinde parçacık ve kümeleşme görülmesi koagülaz testi pozitif olarak değerlendirildi.

İzolatların *Staphylococcus* spp. ve *Staphylococcus aureus* olmaları yönünden identifikasyonları amacıyla PCR yapıldı. Bu amaçla *S.aureus* spesifik *nuc* geni (279 bp) ve *Staphylococcus* spp. spesifik 16S rRNA gen (756 bp) varlığı araştırıldı.

PCR çalışmalarında kullanılmak üzere tüm izolatların DNA eldesi için kaynatma yöntemi uygulandı. Bu amaçla stafilocok izolatlarının Trypticase Soy Agar (TSA)'a ekimi yapıp ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İzolatlar üretildikten sonra bir öze dolusu saf koloni alınarak 500 mikrolitrelik DNase-RNase ari ependorf tüplerinde deiyonize su ile süspanse edildi. Süspanسیون 100 derecede 10 dk kaynatıldı ve daha sonra 10 000 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Üstte kalan sıvı alınarak PCR amplifikasyonlarında hedef DNA olarak kullanıldı (Çiftci ve ark., 2009). DNA'ların konsantrasyonları spektrofotometrik olarak ölçüldü ve tüm DNA'lar 50 ng/mikrolitre olacak şekilde eşitlendi. Elde edilen DNA'lar kullanılmaya kadar -20°C'de saklandı.

Staphylococcus spp. ve *S. aureus* spesifik PCR amplifikasyonu için PCR gerçekleştirildi. Bu amaçla her iki PCR için ayrı ayrı olmak üzere 25 µl'lik bir PCR

karışımı oluşturuldu. *Staphylococcus* spp. spesifik PCR için oluşturulan karışım DEPC-treated water, 1X PCR solüsyonu, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM her bir dNTP, 1.0 U Taq DNA polimeraz, 0.12 mikromolar primer ve 5 µl template DNA içerecek şekilde oluşturuldu. *S. aureus* spesifik PCR için oluşturulan karışım DEPC-treated water, 1X PCR solüsyonu, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM her bir dNTP, 1.0 U Taq DNA polimeraz, 0.04 mikromolar primer ve 5 µl template DNA içerecek şekilde oluşturuldu.

PCR karışımları 94°C’de 5 dk ön denatürasyonu takiben 94°C’de 1 dk denatürasyon, 50°C’de 1 dk primer bağlanma, 72°C’de 2 dk uzama olmak üzere 30 siklus ve 72°C’de 10 dk final uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu (Çiftçi ve ark., 2009). Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2µg/ml) içeren %1.5’lik agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi.

Görüntüleme sonrasında 16S rRNA için 756 bp’lik bantın görülmesi *Staphylococcus* spp. ve *nuc* geni için 279 bp’lik bantın görülmesi *S. aureus*’un göstergesi olarak kabul edildi.

Tablo 1. Çalışmada identifikasyon amacıyla kullanılan oligonükleotid primer dizileri

	Oligonükleotid dizisi (5’-3’)	Bant boyutu (bp)
Staph756F	AAC TCT GTT ATT AGG GAA GAA CA	756
Staph756R	CCA CCT TCC TCC GGT TTG TCA CC	
nuc 1	GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT	279
nuc 2	AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC	

3.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Çalışma kapsamında incelenen tüm izolatların antibiyotik duyarlılık testleri Kirby Bauer disk difüzyon tekniği ile Clinical and Laboratory Standards Institute (2013) tarafından önerilen koşullarda gerçekleştirildi. Bu amaçla standart antibiyotik disklere duyarlılığı belirlenecek bakteri kültüründen birkaç koloni alındı ve tryptic soy broth içerisinde 18 saat 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu takiben kültürün bulanıklığı, McFarland 0.5 standartına göre ayarlandı. Taze sıvı kültürlerden 100 µl alınarak Mueller Hinton agar besi yerinin tüm yüzeyini kaplayacak şekilde yayma tekniği ile ekim yapıldı. Standart antibiyotik diskler [okzasilin (10 µg) , vankomisin (30 µg), teikoplanin (30 µg), trimetophrim-sulfometaksazol (25 µg), tetrasiklin (30 µg),

penisilin G (10 µg), sefaperazon (75 µg), amoksisilin-klavulonik asit (20/10 µg)] besi yerlerinin üzerine yerleştirildi. Besi yerleri 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda oluşan zon çapları ölçülerek, standart değerlerle karşılaştırıldı (Tablo 2). Sonuçlar duyarlı (S), orta derecede duyarlı (I) ve dirençli (R) olarak değerlendirildi (CLSI, 2013).

Tablo 2. Antibiyotik duyarlılık testlerinin değerlendirilmesi için kullanılan standart değerler

Antibiyotik	R	I	S
Vankomisin	≤14	15-16	≥17
Teikoplanin	≤10	11-13	≥14
Okzasilin	≤10	11-12	≥13
Trimetoprim-sulfometaksazol	≤10	11-15	≥16
Tetrasiklin	≤14	15-18	≥19
Penisilin G	≤28	-	≥29
Sefaperazon	≤15	16-20	≥21
Amoksisilin klavulonik asit	≤19	-	≥20

3.4. Vankomisin Direnç Seviyesinin Belirlenmesi

Stafilokok suşlarında vankomisin direncinin minimal inhibisyon konsantrasyon (MIC) değerinin belirlenmesi için Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013) tarafından önerilen broth mikrodilüsyon tekniği kullanıldı. Bu amaçla disk difüzyon tekniği ile vankomisine dirençli olduğu belirlenen izolatlar TS broth içerisinde 18 saat 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu takiben kültür, McFarland 0.5 standartına göre ayarlandı. Vankomisin antibiyotiği TS broth içerisinde 256 µg/ml olacak şekilde hazırlanarak, yine TS broth içerisinde 2 katlı sulandırmaları yapıldı. Bu sulandırmalardan 96'lık mikropleyt içerisine her izolat için 8'lik bir sıra kullanılarak 100'er µl aktarıldı. Sulandırmaların üzerine 100'er µl olmak üzere taze sıvı kültür içerisindeki izolatlar eklendi. Sekizlik bir sıranın son kuyucuğuna antibiyotik konulmadı ve kontrol olarak tasarlandı. Böylece 2-128 µg/ml antibiyotik ve izolat içeren kültürler hazırlandı. Kültürler 18 saat 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda bulanıklık görülmesi izolatın dirençli olduğunu gösterdi ve üremenin görülmediği ilk kuyucuktaki değerler MIC değeri olarak değerlendirildi. Stafilokoklar için için vankomisin MIC değerleri ≤4 µg/ml duyarlı, 8-16 µg/ml orta duyarlı (VISA), ≥32 µg/ml dirençli (VRSA) olarak kabul edildi ve bu değerlere göre değerlendirme yapıldı. Testte pozitif kontrol olarak Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji

Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan ve vankomisin dirençli olduğu daha önce belirlenmiş olan *S. aureus* suşu kullanıldı.

3.5. Vankomisin Direncinin Genotipik Olarak Belirlenmesi

Difüzyon yöntemi ile vankomisin'e dirençli olduğu belirlenen izolatların vankomisin direnç genleri PCR yöntemi ile belirlendi. İzolatların DNA'ları yukarıda açıklandığı şekilde kaynatma yöntemi ile elde edildi ve konsantrasyonları 50 ng/mikrolitre olacak şekilde eşitlendi.

Stafilokok izolatlarının *vanA* gen kümesinde yer alan *vanA*, *vanH*, *vanR*, *vanS*, *vanZ*, *vanY* ve *vanX* genleri için spesifik oligonükleotidler kullanılarak, bu genler için PCR gerçekleştirildi (Dezfulian ve ark., 2012). PCR için pozitif kontrol olarak Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan, vankomisin dirençli olduğu ve *vanA* direnç genine sahip olduğu belirlenmiş olan suş kullanıldı. PCR'da kullanılan oligonükleotid primer dizileri Tablo 3'te gösterildi. Her gen için ayrı ayrı olmak üzere aynı koşullarda 25'er µl'lik PCR karışımları hazırlandı. Karışım 1X PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mmol her bir dNTP, 40 pmol primer çifti, 2U Taq polimeraz ve 5 µl hedef DNA içerecek şekilde hazırlandı.

PCR karışımları 94°C'de 5 dk ön denatürasyonu takiben 94°C'de 1 dk denatürasyon, Tablo 3'te her bir gen için gösterilmiş olan derecelerde 1 dk primer bağlanma, 72°C'de 2 dk uzama olmak üzere 35 siklus ve 72°C'de 10 dk final uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu (Dezfulian ve ark., 2012). Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2µg/ml) içeren %1.5'lik agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi. Her gen için Tablo 3'te gösterilmiş olan büyüklüklerde bant görülmesi pozitiflik göstergesi olarak değerlendirildi.

Tablo 3. Vankomisin direnç genlerinin belirlenmesi amacıyla kullanılan oligonükleotid primer dizileri

Primer	Oligonükleotid dizisi (5'-3')	Bant boyutu	Bağlanma ısı dereceleri (°C)
<i>vanR1</i> F	AGCGATAAAATACTTATGTGGA	645	53
<i>vanR2</i> R	CGGATTATCAATGGTGTCTGTT		
<i>vanS1</i> F	TTGGTTATAAAATTGAAAAATAA	1155	47
<i>vanS2</i> R	TTAGGACCTCCTTTTATC		
<i>vanH</i> F	ATCGGCATTACTGTTTATGGAT	943	55
<i>vanH</i> R	TCCTTTCAAAATCCAAACAGTTT		
<i>vanA1</i> F	ATGAATAGAATAAAAGTTGCAATA	1029	52
<i>vanA2</i> R	CCCCTTTAACGCTAATACGAT		
<i>vanX1</i> F	ATGGAAATAGGATTTACTTT	609	46
<i>vanX2</i> R	TTATTTAACGGGGAAATC		
<i>vanY1</i> F	ATGAAGAAGTTGTTTTTTTTTA	912	47
<i>vanY2</i> R	TTACCTCCTTGAATTAGTAT		
<i>vanZ1</i> F	TTATCTAGAGGATTGCTAGC	454	51
<i>vanZ2</i> R	AATGGGTACGGTAAACGAGC		

3.6. Virülens Genlerinin Belirlenmesi

Çalışmaya dâhil edilen tüm izolatların koagulaz (*coa*) ve protein A (*spa*) virülens genleri PCR yöntemi ile belirlendi.

coa gen varlığı ve polimorfizmi Çiftci ve ark. (2009)'nın bildirdiği yöntem ile gerçekleştirildi. Buna göre forward oligonükleotit olarak COAG2 (5'-CGA GAC CAA GAT TCA ACA AG-3') ve reverse primer olarak ta COAG3 (5'- AAA GAA AAC CAC TCA CAT CA-3') kullanıldı. Bildirilen yönteme göre 25 ml'lik PCR karışımı 5 µl hedef DNA, 1X PCR buffer, 2,5 mM MgCl₂, 50 pmol primer çifti, 200 µM her bir dNTP ve 1 U Taq polimeraz içerecek şekilde hazırlandı. DNA amplifikasyonu 95°C'de 2 dk ön denaturasyon; 35 siklus olmak üzere 95°C'de 30 sn, 60°C'de 2 dk ve 72°C'de 4 dk; ve son uzamada 72°C'de 7 dk tutulmak suretiyle gerçekleştirildi. Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2µg/ml) içeren %2'lik agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi. Görüntüleme sonrasında çeşitli büyüklüklerde bant görülmesi pozitiflik göstergesi olarak kabul edildi. Görüntülenen bant büyüklüklerine göre izolatlar tiplendirildi.

spa gen varlığı ve polimorfizmi Çiftci ve ark. (2009)'nın bildirdiği yöntem ile gerçekleştirildi. Buna göre forward oligonükleotit olarak SPA1 (5'-TCA AGC ACC AAA AGA GGA AGA-3') ve reverse primer olarak da SPA2 (5'-GTT TAA CGA CAT GTA CTC CGT TG-3') kullanıldı. Bildirilen yönteme göre 25 ml'lik PCR karışımı 1X PCR buffer, 2 mM MgCl₂, 25 pmol primer çifti, 200 µM her bir dNTP, 1.5

U Taq polimeraz ve 5 µl hedef DNA, içerecek şekilde hazırlandı. DNA amplifikasyonu 95°C'de 3 dk ön denaturasyon; 30 siklus olmak üzere 94°C'de 1 dk, 58°C'de 1 dk ve 72°C'de 1 dk; ve son uzamada 72°C'de 10 dk tutulmak suretiyle gerçekleştirildi. Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2µg/ml) içeren %3'lik agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi. Görüntüleme sonrasında çeşitli büyüklüklerde bant görülmesi pozitiflik göstergesi olarak kabul edildi. Görüntülenen bant büyüklüklerine göre izolatlar tiplendirildi.

3.7. Genotiplendirme ve Filogenetik Analiz

Vankomisin dirençli izolatların genotiplendirmesi amacıyla M13 (5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3') primeri kullanılarak RAPD-PCR gerçekleştirildi (Fındık ve ark., 2011).

PCR için 1X PCR buffer, 2.5 mM MgCl₂, 25 pmol primer çifti, 200 µM her bir dNTP, 1.5 U Taq polimeraz ve 5 µl hedef DNA içerecek şekilde 25 µl'lik PCR karışımı hazırlandı. DNA amplifikasyonu 95°C'de 5 dk ön denaturasyon; 30 siklus olmak üzere 94°C'de 1 dk, 36°C'de 1 dk ve 72°C'de 3 dk; ve son uzamada 72°C'de 5 dk tutulmak suretiyle gerçekleştirildi. Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2µg/ml) içeren %3'lük agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi. Görüntüleme sonrasında oluşan bantların sayısı ve büyüklüklerine göre değerlendirme yapıldı.

RAPD-PCR sonucu elde edilen bant profillerine göre genotiplendirme yapıldı. Genotiplendirme amacıyla UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) metodu ile Quantity One yazılımı dendogram ve görüntü analiz programı (Bio Rad) kullanılarak dendogram çizildi.

4. BULGULAR

4.1. Bakteri İzolatları

Çalışma kapsamında 2009-2014 yılları arasında mastitisli sütlerden izole edilmiş olan ve Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan 100 adet stafilocok izolatı incelendi.

4.2. İdentifikasyon

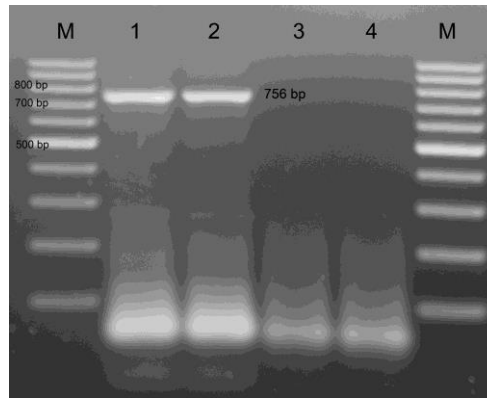
Çalışmada kullanılan izolatlar %5 koyun kanlı agarda 37°C'de 24 saat inkübasyona tabi tutularak canlandırıldı. İzolatların fenotipik olarak identifikasyonları için Gram boyama, katalaz ve koagülaz testleri gerçekleştirildi.

Gram boyama sonucunda tüm izolatlar Gram pozitif kok şeklinde görüldü.

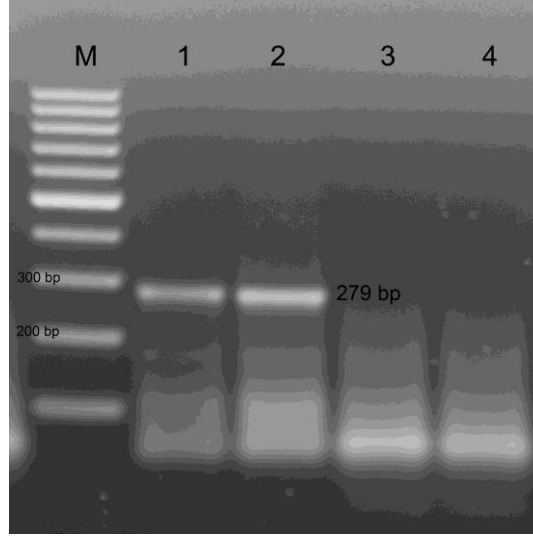
Katalaz testi sonucunda tüm izolatların katalaz pozitif olduğu belirlendi.

Koagülaz testi sonucunda 69 izolat koagülaz pozitif olarak değerlendirildi.

İzolatların *Staphylococcus* spp. ve *Staphylococcus aureus* olmaları yönünden identifikasyonlarının doğrulanması amacıyla PCR yapıldı. Bu amaçla *S.aureus* spesifik *nuc* geni (279 bp) ve *Staphylococcus* spp. spesifik 16S rRNA gen (756 bp) varlığı araştırıldı. İzolatların tümü *Staphylococcus* spp. spesifik 16S rRNA genini içerdiği belirlendi ve *Staphylococcus* spp. olduğu doğrulandı. *S.aureus* izolatlarının belirlenmesi için yapılan *nuc* geni spesifik PCR sonucunda 73 adet izolatın *nuc* geni içerdiği belirlendi ve *S.aureus* olarak identifiye edildi. Sonuç olarak çalışmanın diğer aşamalarında spesifik *nuc* geni yönünden pozitif sonuç veren 73 adet *S.aureus* ve 27 adet te *Staphylococcus* spp. izolatı kullanıldı.



Şekil 1. İncelenen suşların cins düzeyinde değerlendirilmesi için gerçekleştirilen PCR sonucu. M: marker (100-1000 bp); 1,2: *Staphylococcus* spp.; 3: *Escherichia coli*; 4: *Streptococcus* spp.



Şekil 2. İncelenen suşların *S.aureus* yönünden tür düzeyinde değerlendirilmesi için gerçekleştirilen PCR sonucu. M: marker (100-1000 bp); 1,2: *S. aureus*; 3: *Escherichia coli*; 4: *Staphylococcus* spp.

4.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Çalışma kapsamında incelenen tüm izolatların oksasilin (10 µg) , vankomisin (30 µg), teikoplanin (30 µg), trimetoprim-sulfometaksazol (25 µg), tetrasiklin (30 µg), penisilin G (10 µg), sefaperazon (75 µg), amoksisilin-klavulonik asit (20/10 µg)'e karşı antibiyotik duyarlılık profilleri Kirby Bauer disk difüzyon tekniği ile Clinical and Laboratory Standards Institute (2013) tarafından önerilen koşullarda gerçekleştirildi. Sonuçlar duyarlı (S), orta derecede duyarlı (I) ve dirençli (R) olarak değerlendirildi (CLSI, 2013).

Antibiyotik duyarlılık test sonuçları Tablo 4 ve Tablo 5'te gösterildi.

İzolatların direnç profilleri Tablo 6-8'de gösterildi.

Tablo 4. *S.aureus* izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları

İzolat no	VA	TEC	OX	SXT	TE	PEN-G	CEP	AMC
1	R	R	R	R	R	R	R	R
2	R	R	R	R	I	R	R	R
3	R	R	R	I	R	R	R	R
4	R	R	R	I	R	R	R	R
5	R	R	R	I	R	R	R	R
6	R	R	R	I	I	R	R	R
7	R	R	R	I	I	R	R	R
8	R	R	R	I	I	R	I	R
9	R	R	R	I	I	R	I	R
10	S	R	R	I	S	R	R	R
11	S	R	R	I	S	R	R	R
12	S	R	R	I	S	R	R	R
13	S	R	R	S	R	R	R	R
14	S	R	R	S	I	R	R	R
15	S	R	R	S	I	R	I	R
16	S	R	R	S	S	R	R	R
17	S	R	R	S	S	R	R	R
18	S	R	R	R	S	R	R	R
19	S	S	S	S	S	R	S	R
20	S	R	S	S	S	S	S	S
21	S	I	R	R	I	R	I	R
22	S	I	R	S	S	R	R	S
23	S	I	R	S	S	R	I	R
24	S	I	S	S	R	R	I	R
25	S	I	S	S	S	S	S	S
26	S	S	R	R	S	R	I	S
27	S	S	R	S	R	R	I	R
28	S	S	R	S	R	R	I	R
29	S	S	R	S	R	R	I	R
30	S	S	R	S	R	S	S	S
31	S	S	R	S	S	S	I	S
32	S	S	R	S	S	S	S	S
33	S	S	R	S	S	S	S	S

Tablo 4'ün devamı

İzolat no	VA	TEC	OX	SXT	TE	PEN-G	CEP	AMC
34	S	S	R	S	S	S	S	S
35	S	S	I	S	R	R	I	R
36	S	S	I	S	R	R	I	R
37	S	S	I	S	S	R	S	S
38	S	S	S	R	S	S	S	S
39	S	S	S	R	I	S	S	S
40	S	S	S	S	R	R	I	R
41	S	S	S	S	R	R	S	R
42	S	S	S	S	R	R	S	R
43	S	S	S	S	R	R	I	R
44	S	S	S	S	R	R	I	R
45	S	S	S	S	R	R	I	S
46	S	S	S	S	R	S	S	S
47	S	S	S	S	R	S	S	S
48	S	S	S	S	I	R	R	R
49	S	S	S	S	I	R	S	S
50	S	S	S	S	I	S	R	S
51	S	S	S	S	S	R	S	R
52	S	S	S	S	S	R	S	S
53	S	S	S	S	S	R	S	S
54	S	S	S	S	S	R	S	S
55	S	S	S	S	S	R	I	S
56	S	S	S	S	S	S	R	S
57	S	S	S	S	S	S	S	R
58	S	S	S	S	S	S	S	S
59	S	S	S	S	S	S	S	S
60	S	S	S	S	S	S	S	S
61	S	S	S	S	S	S	S	S
62	S	S	S	S	S	S	S	S
63	S	S	S	S	S	S	S	S
64	S	S	S	S	S	S	S	S
65	S	S	S	S	S	S	S	S
66	S	S	S	S	S	S	S	S

Tablo 4'ün devamı

İzolot no	VA	TEC	OX	SXT	TE	PEN-G	CEP	AMC
67	S	S	S	S	S	S	S	S
68	S	S	S	S	S	S	S	S
69	S	S	S	S	S	S	S	S
70	S	S	S	S	S	S	S	S
71	S	S	S	S	S	S	S	S
72	S	S	S	S	S	S	S	S
73	S	S	S	I	S	S	S	S

S: duyarlı; I: orta derecede duyarlı; R: dirençli. VA: vankomisin; TEC: teikoplanin; OX: okzasilin; SXT: trimetoprim-sulfometaksazol; TE: tetrasiklin; PEN-G: penisilin G; CEP: sefaperazon; AMC: amoksisilin/klavulanik asit

Tablo 5. *Staphylococcus* spp. izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları

İzolot no	VA	TEC	OX	SXT	TE	PEN-G	CEP	AMC
74	S	R	S	S	S	R	S	S
75	S	S	S	S	I	R	S	S
76	S	S	S	S	I	S	R	S
77	S	S	S	S	I	S	S	S
78	S	S	S	S	S	R	S	S
79	S	S	S	S	S	R	S	S
80	S	S	S	S	S	S	S	S
81	S	S	S	S	S	S	S	S
82	S	S	S	S	S	S	S	S
83	S	S	S	S	S	S	S	S
84	S	S	S	S	S	S	S	S
85	S	S	S	S	S	S	S	S
86	S	S	S	S	S	S	S	S
87	S	S	S	S	S	S	S	S
88	S	S	S	S	S	S	S	S
89	S	S	S	S	S	S	S	S
90	S	S	S	S	S	S	S	S
91	S	S	S	S	S	S	S	S
92	S	S	S	S	S	S	S	S
93	S	S	S	S	S	S	S	S
94	S	S	S	S	S	S	S	S
95	S	S	S	S	S	S	S	S

Tablo 5'in devamı

İzolot no	VA	TEC	OX	SXT	TE	PEN-G	CEP	AMC
96	S	S	S	S	S	S	S	S
97	S	S	S	S	S	S	S	S
98	S	S	S	S	S	S	S	S
99	S	S	S	S	S	S	S	S
100	S	S	S	S	S	S	S	S

S: duyarlı; I: orta derecede duyarlı; R: dirençli. VA: vankomisin; TEC: teikoplanin; OX: okzasilin; SXT: trimetoprim-sulfometaksazol; TE: tetrasiklin; PEN-G: penisilin G; CEP: sefaperazon; AMC: amoksisilin/klavulanik asit

Tablo 6. *S.aureus* izolatlarının antibiyotik duyarlılık profilleri.

	VA	TEC	OX	SXT	TE	PEN-G	CEP	AMC
R	9	16	30	7	20	43	19	35
I	0	8	3	11	12	0	18	0
S	64	49	40	55	41	30	36	38

S: duyarlı; I: orta derecede duyarlı; R: dirençli. VA: vankomisin; TEC: teikoplanin; OX: okzasilin; SXT: trimetoprim-sulfometaksazol; TE: tetrasiklin; PEN-G: penisilin G; CEP: sefaperazon; AMC: amoksisilin/klavulanik asit

Tablo 7. *Staphylococcus* spp. izolatlarının antibiyotik duyarlılık profilleri

	VA	TEC	OX	SXT	TE	PEN-G	CEP	AMC
R	0	1	0	0	0	4	1	0
I	0	0	0	0	3	0	0	0
S	27	26	27	27	24	23	26	27

S: duyarlı; I: orta derecede duyarlı; R: dirençli. VA: vankomisin; TEC: teikoplanin; OX: okzasilin; SXT: trimetoprim-sulfometaksazol; TE: tetrasiklin; PEN-G: penisilin G; CEP: sefaperazon; AMC: amoksisilin/klavulanik asit

Tablo 8. İzolatların çoklu antibiyotik direnç profilleri

Direnç saptanan antibiyotik sayısı	<i>S.aureus</i> (n)	<i>Staphylococcus</i> spp. (n)
8	9	0
7	5	0
6	5	0
5	7	0
4	6	0
3	4	0
2	8	3
1	14	3
0	15	21

4.4. Vankomisin Direnç Seviyesinin Belirlenmesi

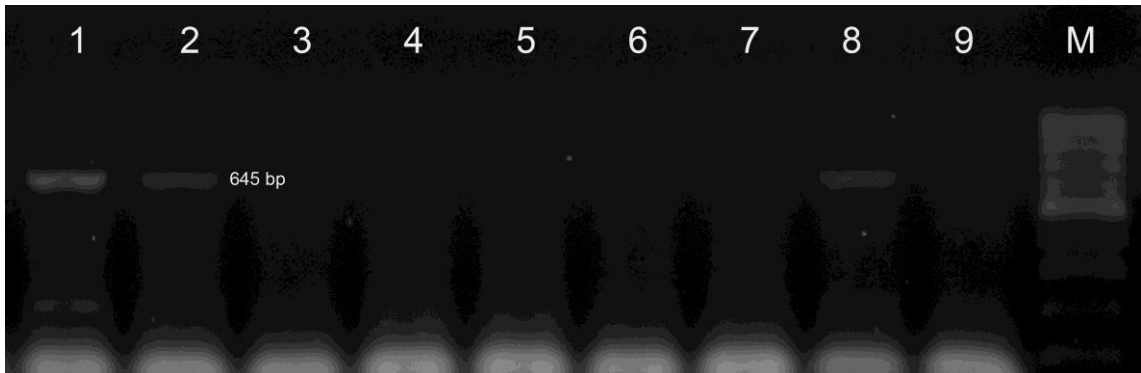
Stafilokok suşlarında vankomisin direncinin minimal inhibitory concentration (MIC) değerinin belirlenmesi için Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013) tarafından önerilen broth mikro dilüsyon tekniği kullanıldı. Disk Difüzyon tekniği ile vankomisin dirençli olduğu belirlenen 9 adet izolat için MIC değerleri belirlendi. Vankomisin MIC değerleri ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$ duyarlı, 8-16 $\mu\text{g/ml}$ orta duyarlı (VISA), ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$ dirençli (VRSA) olarak kabul edildi ve bu değerlere göre değerlendirme yapıldı. Değerlendirme sonucunda 7 adet izolat 32 $\mu\text{g/ml}$ ve 2 izolat ta 64 $\mu\text{g/ml}$ vankomisine dirençli bulundu.

4.5. Vankomisin Direncinin Genotipik Olarak Belirlenmesi

Disk difüzyon yöntemi ile vankomisin'e dirençli olduğu belirlenen 9 adet izolatın vankomisin direnç genleri PCR yöntemi ile belirlendi. Stafilokok izolatlarının *vanA* gen kümesinde yer alan *vanA*, *vanH*, *vanR*, *vanS*, *vanZ*, *vanY* ve *vanX* genleri için spesifik oligonükleotidler kullanılarak, bu genler için PCR gerçekleştirildi. PCR sonucunda 2 adet izolatın *vanA* (1029 bp) ve 3 adet izolatın da *vanR* (645 bp) geni için pozitif bant verdiği belirlendi (Şekil 3 ve 4). Vankomisine direnç gösteren 4 adet izolatta ise incelenen genler belirlenemedi.



Şekil 3. İncelenen suşların *vanA* geni spesifik PCR sonucu

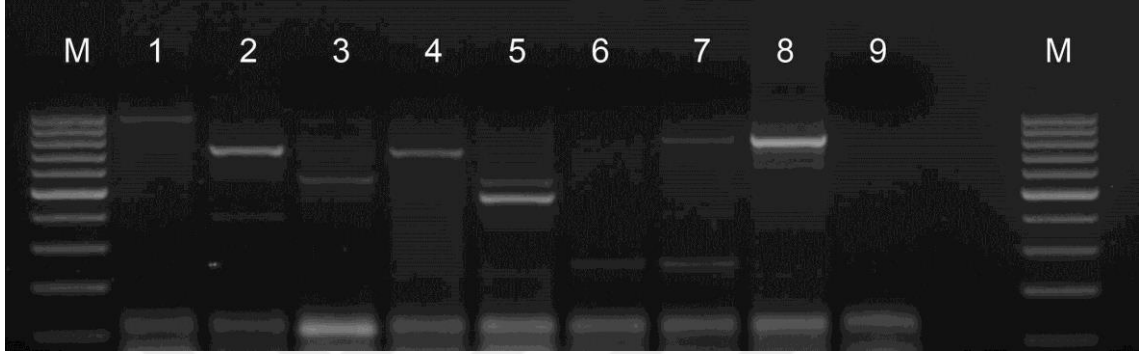


Şekil 4. İncelenen suşların *vanR* geni spesifik PCR sonucu

4.6. Virülens Genlerinin Belirlenmesi

Çalışmaya dâhil edilen tüm *S. aureus* izolatların (n=73) koagülaz (*coa*) ve protein A (*spa*) virülens genleri PCR yöntemi ile belirlendi.

coa gen varlığı ve polimorfizminin saptanması için yapılan PCR sonucunda 48 adet izolat *coa* geni yönünden pozitif bulunmuştur. *coa* pozitif bulunan izolatların göstermiş oldukları bant profilleri Şekil 5 ve Tablo 9’da gösterildi.

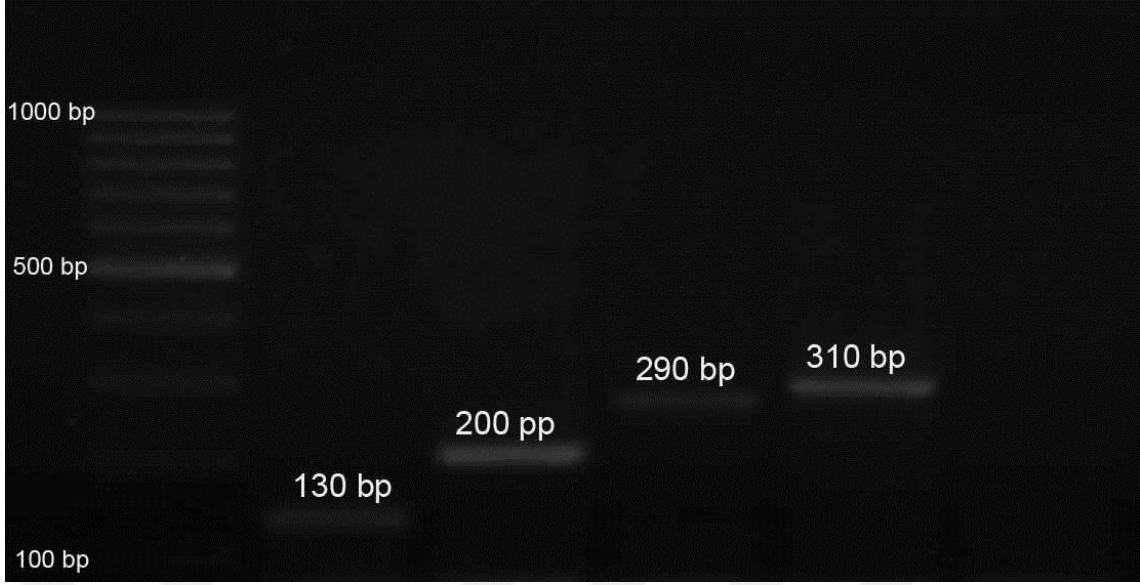


Şekil 5. İncelenen *S. aureus* izolatlarının *coa* polimorfizm profilleri

Tablo 9. *S. aureus* izolatların *coa* polimorfizm profilleri

<i>coa</i> grup	Bant büyüklüğü (bp)	İzolat sayısı
1	950	1
2	800 ve 400	2
3	550	6
4	800	3
5	550 ve 500	5
6	820 ve 250	2
7	250	2
8	820, 620 ve 580	1
9	120	26
10	negatif	25

spa gen varlığı ve polimorfizmi yapılan PCR sonucunda 73 adet izolat *spa* geni yönünden pozitif bulundu. *spa* pozitif bulunan izolatların göstermiş oldukları bant profilleri Şekil 6 ve Tablo 10’da gösterildi.



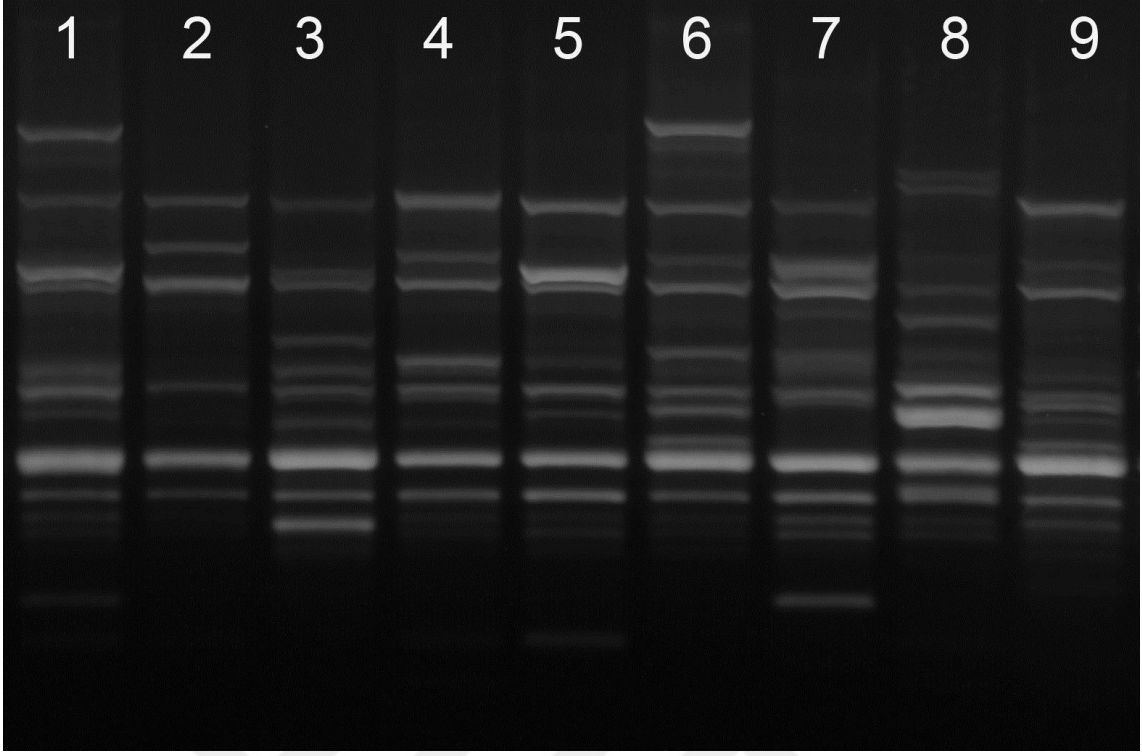
Şekil 6. İncelenen *S. aureus* izolatlarının *spa* polimorfizm profilleri

Tablo 10. *S. aureus* izolatların *spa* polimorfizm profilleri

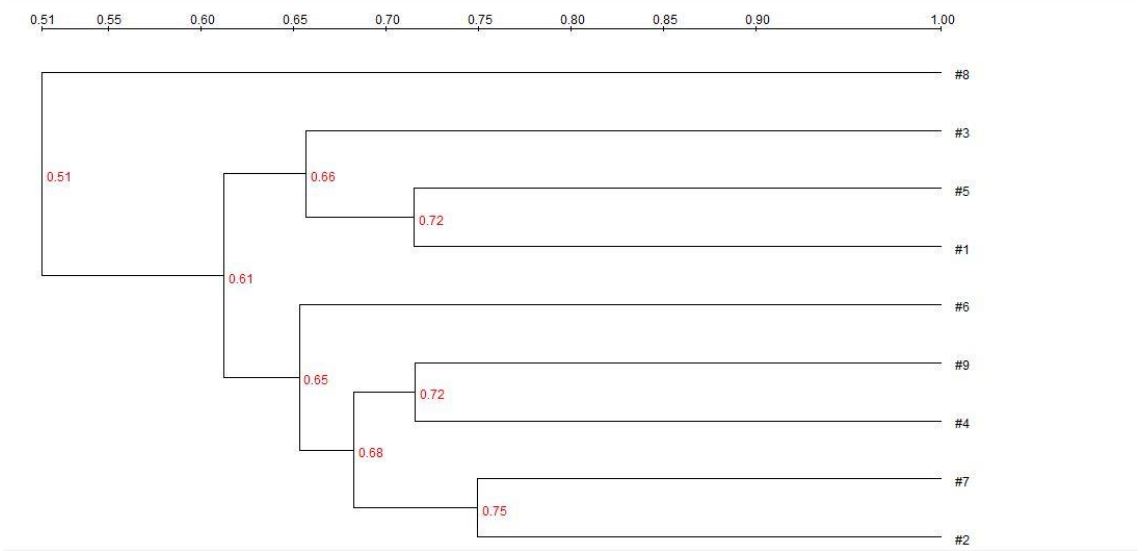
<i>spa</i> grup	Bant büyüklüğü (bp)	İzolat sayısı
1	130	24
2	200	27
3	290	13
4	310	9

4.7. Genotiplendirme ve Filogenetik Analiz

Vankomisin dirençli 9 adet izolatın genotiplendirmesi amacıyla M13 primeri kullanılarak gerçekleştirilen RAPD-PCR sonucunda %51-75 arasında benzerlik gösteren 9 farklı genotip tespit edildi (Şekil 7). Çizilen dendogramda %75 eşik değeri belirlenmiş ve değerlendirme sonucunda 9 adet tekli genotip belirlendi (Şekil 8).



Şekil 7. İncelenen *S. aureus* izolatlarının RAPD profilleri



Şekil 8. İncelenen *S. aureus* izolatlarının filogenetik yakınlık analizi

5. TARTIŞMA

Sığır mastitisleri süt işletmelerinde azalan süt üretimi, artan tedavi masrafları, itlaf ve ölüm oranları nedeniyle işletmeler ve üreticiler için maliyetli ve multifaktöriyel bir hastalıktır. Mastitis, fiziksel ve kimyasal ajanlarla birlikte çoğunlukla çeşitli enfeksiyöz ajanlar (genellikle bakteriler) tarafından oluşturulmaktadır. Mastitisli inek sütlerinde bakteriyel, viral ve fungal olmak üzere 130'dan fazla farklı mikroorganizma türü izole edilmiştir. En yaygın bakteriyel mastitis nedenleri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* ve *Enterococcus faecalis* gibi patojenlerdir (Bray ve Shearer, 1994). *S. aureus* enfekte sığırlarda kontagiyöz enfeksiyona neden olan meme patojenlerinden bir tanesidir. Bu tez çalışmasında, Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonunda bulunan mastitis izolatu stafilokok suşlarının fenotipik ve moleküler yöntemlerle karakterizasyonu amaçlandı. Çalışma kapsamında 2009-2014 yılları arasında mastitisli sütlerden izole edilmiş olan ve Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan 100 adet stafilokok izolatu incelendi ve bu izolatlardan 73 adedi *S.aureus* ve 27 adedi ise *S.aureus* haricindeki diğer *Staphylococcus* spp. olduğu PCR ile belirlendi.

Stafilokokların virülensinde rol oynayan birçok enzim bulunmaktadır. Koagulaz enzimi fibrinojeni fibrine dönüştürerek plazmayı pıhtılaştıran ekstrasellüler bir proenzimdir. *S. aureus* için patojenite kriteri olarak kabul edilen bu enzimin tespiti, patojen olan stafilokokların ayırımı amacıyla rutin olarak kullanılmaktadır. Çalışmada incelenen 100 adet izolattan 69 adetinin koagulaz pozitif olduğu ve pozitif olarak belirlenen izolatların tümünün *S. aureus* olduğu saptandı. İncelenen 4 adet *S. aureus*'un ise koagulaz enzimi sentezlemediği görüldü.

Koagulaz enziminin sentezlenmesi *coa* geninin varlığına bağlıdır ve çalışmada bu amaçla *S. aureus* izolatlarında *coa* gen varlığı ile beraber gendeki polimorfizm araştırıldı. *coa* gen varlığı ve polimorfizminin saptanması için yapılan PCR sonucunda 48 adet izolat *coa* geni yönünden pozitif, geri kalan 25 adet izolat ise negatif bulundu. *coa* pozitif bulunan izolatlar gende meydana gelen polimorfizm sonucunda göstermiş oldukları bant profillerine göre gruplandırıldı. PCR sonucunda 10 adet profil belirlendi. İzolatların 25 tanesi *coa* geni içermemekte iken, 1 izolat 950 bp büyüklüğünde bant meydana getirdi. İki adet izolat 800 ve 400 bp olmak üzere 2 bant, 6 adet izolat 550

bp'lik tek bant, 3 izolat 800 bp'lik tek bant, 5 adet izolat 550 ve 500 bp'lik 2 bant, 2 adet izolat 820 ve 250 bp'lik 2 bant, 2 adet izolat 250 bp'lik tek bant, 26 adet izolat 120 bp'lik tek bant ve 1 adet izolat ta 820,620 ve 580 bp büyüklüğünde 3 bant oluşturdukları belirlendi. Bu sonuçlar mastitis izolatu bakterilerde *coa* geni yönünden polimorfizmlerin olduğunu ve bunun da mastitis izolatu *S. aureus*'lardaki çeşitliliği gösterdi.

S. aureus'un kolonizasyon süreci konakçı hücre yüzeyine tutunması ile başlamakta ve bu da bakterinin içerdiği adhezinler aracılığı ile gerçekleşmektedir. *S. aureus*'un içerdiği adhezinlerinin büyük bir bölümü hücre peptidoglikanlarında bulunan ve Protein A (*spa*) olarak adlandırılan proteinlerdir. Protein A spesifik bakteriyel antijenlere karşı Ig molekülüne bağlanması ve bakteriyi aglutine etmesi gibi özellikleri bakımından immunoloji ve diagnostik laboratuvar teknolojisinde önemli bir reaktif olarak kullanılmaktadır. Protein A'nın sentezinden sorumlu gen *spa* genidir. Çalışma kapsamında *S. aureus* olarak identifiye edilen izolatların *spa* gen varlığı ve polimorfizmi yapılan PCR sonucunda 73 adet izolat *spa* geni yönünden pozitif bulundu. *spa* genini taşıdığı tespit edilen izolatların farklı büyüklüklerde bant oluşturduğu ve dolayısıyla 4 farklı grupta olmak üzere polimorfizm gösterdikleri belirlendi. İzolatların 24 adetinin 130 bp, 27 adetinin 200 bp, 13 adetinin 290 bp ve 9 adetinin ise 310 bp büyüklüğünde bant oluşturdukları görüldü. Sonuç olarak da mastitis izolatu *S. aureus*'ların tümünün *spa* genini taşıdığı ancak gen yönünden polimorfizmlerin olduğu belirlendi.

Patojen bakteriler nedeni ile oluşan enfeksiyonların tedavisinde kullanılan etkili ajanların keşfi modern tıbbın en önemli gelişmelerinden birisi olarak kabul edilmektedir. Günümüzden 2500 yıl önce Çinliler küflenmiş soya fasulyesinin çeşitli cilt enfeksiyonlarındaki tedavi edici etkisini kullanmışlar ve çok eski tarihlerden beri bitkilerden yapılmış ilaçlarla yüzeysel ve sistemik enfeksiyonları tedavi etmeye çalışmışlardır. Modern kimyasal terapi çağı sülfonamidlerin keşfi ve klinik kullanıma girmesiyle başlamıştır. Penisilinin keşfi ve tedavi amaçlı kullanılmaya başlanmasıyla birlikte, stafilokokal enfeksiyonlara bağlı mortalite oranı hızla azalma göstermiştir. Ancak kısa bir süre sonra, *S. aureus* suşları penisilinaz enzimi üretmeye başlayarak penisiline direnç geliştirmiş ve bu dirençli suşlar hızla yayılmıştır. 1950'lerin sonlarında suşların yaklaşık %50'si penisiline dirençli hale gelmiştir. Aynı tarihlerde tetrasiklin, kloramfenikol ve eritromisine karşı çoklu direnç gösteren *S. aureus* suşları bildirilmiştir.

İlk semisentetik penisilinaza dirençli antimikrobiyal ajan olan metisilin klinik kullanıma girmesinden 2 yıl sonra metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) izolatları İngiltere'den bildirilmiş (Jevons, 1961) ve sonradan 1960'lı yıllarda Avrupa'da ve 1970'li yıllarda ABD'de bir problem haline gelmiştir (Hartstein ve ark., 1986). Antibiyotiklere çoklu direnç gösteren MRSA suşları 1980'lerin sonlarında ve 1990'lı yıllarda tüm dünyaya yayılmıştır (Schmitz ve ark., 1997). ABD'de MRSA izolatlarının oranı 1975'te %2 iken, 1996'da %35'e yükselmiştir. Japonya'da 1992-1993 yıllarında çeşitli coğrafik bölgelerdeki hastalardan izole edilen yaklaşık 7000 suşun analizi, *S. aureus* izolatlarının %60'ının metisiline dirençli olduğunu göstermiştir (Hashimoto ve ark., 1994). MRSA halen tüm dünyada çeşitli büyüklüklerdeki hastanelerde en sık rastlanan nozokomiyal patojenler arasındadır. Çalışmada 100 adet stafilocok izolatının 8 farklı antibiyotiğe [okzasilin (10 µg) , vankomisin (30 µg), teikoplanin (30 µg), trimetoprim-sulfometaksazole (25 µg), tetrasiklin (30 µg), penisilin G (10 µg), sefaperazon (75 µg), amoksisilin-klavulonik asit (20/10 µg)] karşı direnç durumları belirlendi. İncelenen 73 adet *S.aureus* izolatının %12.33, %32.88, %45.20, %24.66, %43.84, %58.90, %50.68 ve %47.95'inin sırasıyla okzasilin, vankomisin, teikoplanin, trimetoprim-sulfometaksazol, tetrasiklin, penisilin G, sefaperazon ve amoksisilin-klavulonik asite dirençli olduğu belirlendi. Diğer stafilocok izolatlarının ise %3.70'inin teikoplanin, %11.11'inin tetrasiklin, %14.81'inin penisilin G ve %3.70'inin sefaperazona dirençli oldukları saptandı. İzolatların %9, %5, %5, %7, %6, %4, %11 ve %17 oranında sırasıyla 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ve 1 antibiyotiğe karşı dirençli olduğu belirlendi. Otuzaltı adet izolatın da test edilen antibiyotiklere duyarlı olduğu saptandı. Sadece *S. aureus* haricindeki stafilocoklarda ise %11.11 oranında 2 antibiyotiğe ve %11.11 oranında 1 antibiyotiğe direnç belirlendi. Çoklu antibiyotik direncinin *S. aureus*'ta diğer stafilocoklara oranla daha fazla olduğu görüldü. Sonuç olarak da çoklu antibiyotik direnci nedeniyle mastitis kökenli *S. aureus*'ların hem hayvanın tedavisinde hem de halk sağlığı açısından bir risk teşkil ettiği kanısına varıldı.

Çoklu direnç gösteren stafilocok suşlarına bağlı enfeksiyonların artması nedeniyle, son yıllarda stafilocokal nozokomiyal enfeksiyonların tedavisinde vankomisin kullanılmaya başlanmıştır. Vankomisin ilk kez 1956 yılında Borneo adasında bulunan *Streptomyces orientalis*'ten izole edilen dar spektrumlu bakterisidal bir antibiyotiktir. İzolasyonundan çok kısa bir süre sonra 1956 yılında pürifiye edilerek

linik kullanıma girmiştir. İlk yıllarda kullanılan preparatların saf olmaması ve yan etkilerin sıklığı nedeniyle metisilin kullanıma girdikten sonra önemini yitirmiş, ancak ilk kez 1961’de metisiline dirençli bir *Staphylococcus aureus* izolatının bildirilmesi ve 1982 yılından beri giderek artan MRSA enfeksiyonlarının ortaya çıkmasıyla birlikte yeniden önem kazanmıştır. Bu çalışmada stafilocok suşlarında vankomisin direncinin minimal inhibitory concentration (MIC) değerinin belirlenmesi için disk difüzyon tekniği ile vankomisin dirençli olduğu belirlenen 9 adet izolat için MIC değerleri belirlendi. Değerlendirme sonucunda 7 adet izolat 32 µg/ml (VISA) ve 2 izolat ta 64 µg/ml vankomisine dirençli (VRSA) bulundu. Bu 9 adet izolatın *vanA* gen kümesinde yer alan *vanA*, *vanH*, *vanR*, *vanS*, *vanZ*, *vanY* ve *vanX* vankomisin direnç genleri PCR yöntemi ile belirlendi. PCR sonucunda 2 adet izolatın *vanA* (1029 bp) ve 3 adet izolatın da *vanR* (645 bp) geni için pozitif bant verdiği belirlendi. Vankomisine direnç gösteren 4 adet izolatta ise incelenen genler belirlenemedi. Koagülaz negatif stafilocokların klinik izolatlarında vankomisin direnci 1987’de bildirilmiştir (Schwalbe ve ark., 1987). 1990 yılında *S. aureus* enfeksiyonlarının teikoplanin ile tedavisi sonrası, teikoplanine dirençli izolatların seleksiyonuna bağlı klinik başarısızlıklar bildirilmiştir (Kaatz ve ark., 1990). 1997 yılında Japonya, ABD ve Fransa vankomisine azalmış duyarlılık gösteren MRSA izolatlarının ortaya çıkması çok endişe vericidir (CDCP, 1997; Hiramatsu ve ark., 1997). Bu suşlar diğer antimikrobiyal ajanların da çoğuna dirençli olup, vankomisin tedavisine cevap vermeyen hastalardan izole edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar mastitis kökenli *S.aureus*’ların hem hayvanın tedavisinde hem de halk sağlığı açısından bir risk teşkil ettiğini göstermektedir.

Bakterieriyel izolatların moleküler olarak tiplendirilmesi kromozomal DNA yapısındaki varyasyonlara bağlı olarak yapılmaktadır (Goh ve ark., 1992; Carter ve ark., 2003). Diğer bakteri türlerinde olduğu gibi stafilocok suşlarının da bir çok alt tipi bulunmaktadır. Virülensi yüksek olan veya epidemiyolojik olarak yayılım gösteren klonların doğru olarak belirlenmesi önemli olarak kabul edilmektedir (Frenay ve ark., 1994; Frenay ve ark., 1996). Moleküler tiplendirme sistemlerinin konvansiyonel metotlara göre yüksek performans göstermesi ve kolay uygulanabilirliği gibi bir çok avantajı bildirilmiştir (Frenay ve ark., 1996). Moleküler tiplendirme yöntemlerinden Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) “altın standart” olarak kabul görmesine rağmen, PCR tabanlı yöntemler daha çabuk sonuç vermesi, kolaylığı ve ekonomik

olması nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır (Sabat ve ark., 2006). PCR tabanlı metotlardan bir tanesi de RAPD-PCR'dir. RAPD tiplendirmesi rastlantısal olarak DNA'ya bağlanan primerler ve değişken reaksiyon koşullarında DNA'yı kısa bölümler halinde çoğaltma esasına dayanan bir tiplendirme metodudur. Bu metot izolatlar arasında genetik yakınlıkları belirlemek için sıklıkla kullanılmaktadır. Oluşan amplikonların primerin bağlandığı bölgelere bağlı olarak bakteri türlerinin karşılaştırmasının yapılmasını sağlamaktadır (Wassenaar ve Newell, 2000; Boxall 2005).

Stafilokokların doğru ve hızlı olarak tiplendirilmesi infeksiyonun kontrol altına alınması açısından önemlidir (Hookey ve ark., 1998). Başta *S.aureus* olmak üzere stafilokokların virülens genlerine bağlı olarak değişkenlik gösteren bir çok alt tipi bulunmaktadır (DaSilva ve ark., 2006). Bu bakterilerdeki genetik varyasyon ve heterojenitelerin belirlenmesi mastitise neden olan stafilokoklar için rasyonel ve etkili stratejilerin belirlenmesi açısından önemlidir (Kapur ve ark., 1995). Bu çalışmada vankomisin dirençli 9 adet izolatın genotiplendirmesi amacıyla M13 primeri kullanılarak gerçekleştirilen RAPD-PCR sonucunda %51-75 arasında benzerlik gösteren 9 farklı genotip tespit edildi. Saptanan bu çeşitlilik mastitis kökenli *S.aureus* suşlarında çeşitlilik olduğu ve infeksiyona neden olan klonların yakın ilişkili olmadığını gösterdi.

6. SONUÇ

Mastitis süt veriminde azalmaya yol açan, süt sığırı yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olan meme dokusu hastalığıdır. Sığır mastitislerinden en sık izole edilen etkenlerin başında *Staphylococcus* spp. gelmektedir. *Staphylococcus aureus*'da hem subklinik hem de klinik mastitis vakalarında oldukça fazla bulunmakta olup en çok karşılaşılan kronik mastitis etkenlerinden biridir. Vakalar genellikle subklinik olup sütte bir anormallik ya da memede belirlenebilir bir değişiklik yoktur. Bazı sığırlarda özellikle buzağılamadan sonra klinik mastitis olayları patlak verir. Subklinik mastitis vakaları diğer sığırlar için bir enfeksiyon kaynağı oluşturabilmekte olup klinik olanlara kıyasla 40-50 kez daha fazla şekillenmesi hastalığın ekonomik önemini artırmaktadır. Günümüzde *S. aureus* nedenli sığır mastitis vakalarının elimine edilmesine yönelik yapılan çalışmalar yetiştiricilerin birden fazla ve belki de bilinmeyen bazı rezervuarları belirlemedeki yetersizliklerine bağlı olarak tüm enfeksiyonları ortaya koyamamaları ve birçok antibiyotik tedavi girişimleri sonucunda ortaya çıkan antibiyotik dirençliliği yüzünden başarılı olamamaktadır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, mastitis kökenli stafilokok suşlarında vankomisin direncinin belirlenmesi nedeniyle, bu etkenleri içeren süt ve süt ürünlerinin halk sağlığı yönünden bir risk teşkil ettiğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Aguilar B, Amorena B, Iturralde M. Effect of slime on adherence of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine and ovine mastitis. *Vet Microbiol* 2001; 78: 183–191.
- Amorena B, Gracia E, Monzon M, Leiva J, Oteiza C, Perez M, Alabart JL, Hernandez-Yago J. Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44: 43–55.
- Anonim. Türkiye İstatistik Kurumu. Hayvancılık İstatistikleri. 2007; http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?tb_id=46&ust_id=13. [Erişim Tarihi: 28.03.2015].
- Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki K, Oguchi A, Nagai Y, Iwama N, Asano K, Naimi T, Kuroda H, Cui L, Yamamoto K, Hiramatsu K. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet* 2002; 359:1819–1827.
- Baselga R, Albizu I, De La Cruz M, Del Cacho E, Barberan M, Amorena B. Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implications in colonization and virulence. *Infect Immun* 1993; 61: 4857–4862.
- Baştan A, Akan M, Öncel T. İneklerde klinik mastitisin tedavisinde amoxycillin klavulanik asit kombinasyonunun etkinliğinin araştırılması. *Vet Hek Mikrobiyol Derg* 2001; 1: 63–69.
- Baştan A, Fındık M, Kaymaz M, Duru Ö. İnek sütlerinde somatik hücre sayısı, serum proteinleri, laktoz ve elektriksel iletkenlik arasındaki ilişkinin araştırılması. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 1997a; 44: 1–5.
- Baştan A, Fındık M, Kaymaz M, Duru Ö. İneklerde subklinik mastitislerin elektriksel iletkenlik, somatik hücre sayısı ve California Mastitis Test ile saptanması. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 1997b; 44: 6–10.
- Boxall N. The epidemiology of *Campylobacter jejuni* in commercial broiler flocks in New Zealand. PhD Thesis at Massey University, Palmerston North, New Zealand, 2005.
- Bray DR, Shearer JK. Milking machine and mastitis control handbook. University of Florida, Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences. Circular. 1994; p:1136.
- Carter PE, Begbie K, Thomson FM. Coagulase gene variants associated with distinct populations of *Staphylococcus aureus*. *Epidemiol Infect* 2003;130: 207–219.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDCP). *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin-United States 1997. *MMWR* 1997; 46: 765–766.

- Cifrian E, Guidry AJ, O'Brien CN, Nickerson SC, Marquardt WW. Adherence of *Staphylococcus aureus* to cultured bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Sci* 1994; 77: 970–983.
- Clinical Laboratory Standards Institute Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-first edition: Informational Supplement. CLSI document M100-S21. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA. 2013.
- Çavuşoğlu ZB. Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarından elde edilen bakteriyofajlarda bulunan SCIN, CHIPS, SEI, SEK toksin genlerinin varlığının pcr ve southern blot yöntemi ile kıyaslanması. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, Türkiye, 2012.
- Çiftci A, Fındık A, Onuk EE, Savasan S. Detection of methicillin resistance and slime factor production of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. *Braz J Microbiol* 2009; 40: 254–261.
- Çokal Y, Konuş R. Subklinik mastitisli ineklerin sütlerinden aerobik bakterilerin izolasyonu. *Balikesir Saglik Bil Derg* 2012;1(2): 65–69.
- DaSilva ER, Boechat JUD, DaSilva N. Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolated from goat mastitis in Brazilian dairy herds. *Lett Appl Microbiol* 2006; 42: 30–34.
- Dezfulian A, Aslani MM, Oskoui M, Farrokh P, Azimirad M, Dabiri H, Salehian MT, Zali MR. Identification and characterization of a high vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* harboring *vanA* gene cluster isolated from diabetic foot ulcer. *Iran J Basic Med Sci* 2012; 15(2): 803–806.
- Dinç DA. Evcil hayvanlarda memenin deri hastalıkları, dolaşım bozuklukları ve operasyonları, Konya, 1995.
- Findik A, Ica T, Onuk EE, Percin D, Kevenk TO, Ciftci A. Molecular typing and *cdt* genes prevalence of *Campylobacter jejuni* isolates from various sources. *Trop Anim Health Prod* 2011; 43: 711–719.
- Fox LK, Bayles KW, Bohach GA. *Staphylococcus aureus* Mastitis. In: *Staphylococcus aureus* Infection and Disease, ed. Honeyman, A.L., Friedman, H. And Bendinelli, M., Kluwer Academic /Plenum Publishers, New York, 2001; pp. 271–293.
- Frenay HME, Theelen JPG, Schouls LM. Discrimination of epidemic and nonepidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains on the basis of protein A gene polymorphism. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 846–847.

- Frenay HME, Bunschoten AE, Schouls LM. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of *protein A* gene polymorphism. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15: 60–64.
- Goh SH, Byrne SK, Zhang JL, Chow AW. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of *coagulase* gene polymorphisms. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1642–1645.
- Gülcü HB, Ertaş HB. Elazığ yöresi mezbahada kesilen ineklerde mastitisli meme loblarının Bakteriyolojik İncelenmesi. *Tr J Vet Anim Sci* 2002; 28: 91–94.
- Hartstein AI, Mulligan ME. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In: Glen Mayhall C, ed. *Hospital epidemiology and infection control*. Maryland: Williams and Wilkins, 1986; 290–306.
- Hashimoto H, Inoue M, Hayashi I. A survey of *Staphylococcus aureus* for typing and drugresistance in various areas of Japan during 1992 and 1993 [Japanese]. *Japan J Antibiotics* 1994; 47: 618–626.
- Hillerton JE, Berry EA. A Review Treating mastitis in the cow – a tradition or an archaism. *J Appl Microbiol* 2005; 98: 1250–1255.
- Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40: 135–136.
- Hookey JV, Richardson JF, Cookson BD. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR Restriction Fragment Length Polymorphism and DNA sequence analysis of the *coagulase* gene. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1083–1089.
- Jevons MP. Celbenin-resistant staphylococci. *Br Med J* 1961; 1: 124–125.
- Kaatz G, Seo SM, Dorman NJ, Lerner SA. Emergence of teicoplanin resistance during therapy of *Staphylococcus aureus* endocarditis. *J Infect Dis* 1990; 162: 103–108.
- Kapur V, Sisco WM, Greer RS. Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 376–380.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, Procop G, Woods G. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Sixth edition. Philadelphia: Lippincott Co 2005; 700–711.
- Köker A, Salmanoğlu R. Sütçü ineklerde subklinik mastitislerin şekillenmesinde sağım makinesine ilişkin sorunların incelenmesi. *YYÜ Vet Fak Derg* 2000; 11: 106–112.

- Küplülü Ş, Vural R, İzgür H, Kılıçoğlu Ç, Baştan A, Kaymaz M, Erdeğer J. Subklinik mastitislerin tanısında Milk Checker'in kullanılması. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1995; 42: 281–284.
- Nak D. Subklinik mastitislerin teşhis yöntemleri üzerine çalışmalar. UÜ Vet Fak Derg 1999; 3(18): 15–27.
- Özdemir M. Mastitisli inek sütlerinden *Staphylococcus* türlerinin izolasyonu ve identifikasyonu. Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü. İstanbul, 2005.
- Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. Mastitis. In: Clinical Veterinary Microbiology, Mosby-Yaer Book Europe Limited, England. (1994) pp: 327–344.
- Rişvanlı A, Kalkan C. Sütçü ineklerde yaş ve ırkın subklinik mastitisli memelerin sütlerindeki somatik hücre sayıları ile mikrobiyolojik izolasyon oranlarına etkisi. YYÜ Vet Fak Derg 2002; 13: 84–87.
- Sabat A, Malachowa N, Miedzobrodzki J, Hryniewicz W. Comparison of PCR-based methods for typing *Staphylococcus aureus* isolates. J Clin Microbiol 2006; 44: 3804–3807.
- Sareyyüpoğlu B, Müştak HK, Cantekin Z, Diker KS. Molecular detection of exfoliative toxin in *Staphylococcus intermedius* isolates from dogs with pyoderma. Ankara Üniv Vet Fak Derg 2013; 60:15–19.
- Schmitz FJ, Jones ME. Antibiotics for treatment of infections caused by MRSA and elimination of MRSA carriage. What are the choices? Int J Antimicrob Agents 1997; 9: 1–19.
- Schroeder JW. Mastitis control programs: Bovine mastitis and milking management. North Dakota State University Extension Service. April 1997; AS–1129.
- Schwalbe R, Stapleton JT, Gilligan PH. Emergence of vancomycin resistance in coagulase negative staphylococci. N Engl J Med 1987; 316: 927–931.
- Sugimoto M, Fujikawa A, Womack JE, Sugimoto Y. Evidence that bovine forebrain embryonic zinc finger-like gene influences immune response associated with mastitis resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences Online. 2006; 103 (17): 6454–6459.
- Takeuchi S, Maeda T, Hashimoto N, Imaizum IK, Kaidoh T, Hayakawa Y. Variation of the *agr* locus in *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis. Vet Microbiol 2001; 79: 267–274.
- Tarıbuyurdu E. Sığır mastitislerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında biofilm oluşumu ve antibiyotiklere dirençliliğinin belirlenmesi. Yüksek Lisans

Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Aydın, Türkiye. 2014.

Taponen S, Pyorala S. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis not so different from *Staphylococcus aureus*. *Vet Microbiol* 2009; 134: 29–36.

Tekeli T. Mastitis. AB Sürecinde Kaliteli Süt. Üretimi ve Somatik Hücre Sayısı. Güzeliş Matbaası, Konya, 2005.

Uçan N. Subklinik Mastitisli keçilerdeki koagulaz negatif stafilokokların saptanması ve antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın, Türkiye, 2014.

Wassenaar TM, Newell DG. Genotyping of *Campylobacter* spp. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66(1): 1–9.

Yeşilmen S, Özyurtlu N, Bademkiran S. Diyarbakır yöresinde subklinik mastitisli ineklerde etken izolasyonu ve duyarlı antibiyotiklerin belirlenmesi. *Dicle Üniv Vet Fak Derg* 2012; 1(4): 24–29.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Mehmet Onur GÖKDAĞ

Doğum Yeri: Safranbolu/Karabük

Doğum Tarihi: 04.02.1988

Medeni Hali: Evli

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Ünsal Tülbentçi İlköğretim Okulu (1994-2002)

Safranbolu Lisesi (2002-2005)

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi (2007-2012)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

Sinop Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü (2013-2016)

Karabük Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü (2016-devam ediyor)

E-posta: gokdagmehmetonur@gmail.com