

MASTITİSLİ İNEKLERDEN İZOLE EDİLEN
***Staphylococcus aureus* SUŞLARININ MOLEKÜLER**
TİPLENDİRMESİ

Glgn KANBER
Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı
Ocak-2014

**Bu tez alışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonu Başkalığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1109F149**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Gölgün Kanber'in "Mastitisli İneklerden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarının Moleküler Tiplendirmesi" başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 09 Ocak 2014 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) :	Prof. Dr. Kıymet GÜVEN	
Üye :	Yrd. Doç. Dr. Beytullah KENAR	
Üye :	Yrd. Doç. Dr. Aysel GÜLBANDILAR	

**Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.**

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MASTITİSLİ İNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *Staphylococcus aureus* SUŞLARININ MOLEKÜLER TİPLENDİRMESİ

Gülgün KANBER
Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Kıymet GÜVEN
2014, 72 sayfa

Bu çalışmada Afyonkarahisar bölgesinde bulunan 6 farklı yerleşim yerindeki 16 çiftlikten toplanan mastitisli süt örneklerinden izole edilmiş 104 adet bakteri ribotiplendirme yöntemi ile tanımlanmış ve *Staphylococcus aureus* olarak tanımlanan 77 izolat arasındaki genetik akrabalık ilişkisi moleküler tiplendirme yöntemleri ile araştırılmıştır.

Ribotiplendirme yönteminde *EcoRI* restriksiyon enzimi kullanılmış ve 8 ribogrup belirlenmiştir. Atılımı alan jel elektroforez (Pulsed Field Gel Electrophoresis=PFGE) yöntemi ile 77 izolatın makrorestriksiyon profili *SmaI* restriksiyon enzimi kullanılarak belirlenmiş ve 19 pulsotip tanımlanmıştır. Ribogruplar ve pulsotipler birbirleriyle çakışmasa da dominant pulsotip olan G11'de yer alan izolatların bir kısmının ribotiplendirmede birbirleriyle %98 benzerlik gösteren ribogrup 2, ribogrup 7 ve ribogrup 8'de yer alan izolatlarla aynı olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde ribogrup 7 ve 8'de yer alan izolatların bir kısmının da PFGE analizinde %98 ve %97 benzerlik oranı gösteren G5, G7 ve G8 pulsotiplerinde yer aldığı belirlenmiştir.

Türkiye'de sığırlarda mastitis etmeni *S. aureus* için ribotiplendirme yöntemi ilk kez bu çalışmada kullanılmış olup, Afyonkarahisar bölgesinde mastitisli sütlerden izole edilen *S. aureus* izolatlarının gerek ribotiplendirme gerekse de PFGE ile genotipik analizi de ilk kez uygulanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Staphylococcus aureus*, mastitis, ribotiplendirme, PFGE.

ABSTRACT

Master of Science Thesis

MOLECULAR TYPING OF *Staphylococcus aureus* STRAINS ISOLATED FROM BOVINE MASTITIS

Gülgün KANBER
Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Department

Supervisor: Prof. Dr. Kıymet GÜVEN
2014, 72 pages

In this study, 104 bacteria isolated from mastitis milk samples collected from 16 dairies located in 6 regions in Afyonkarahisar were identified by ribotyping method and the genetic relation was investigated between 77 isolates identified as *Staphylococcus aureus* by using molecular typing methods.

By using ribotyping method with *EcoRI* restriction enzyme eight ribogroups were determined. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) method with *SmaI* restriction enzyme determined 19 pulstotypes among 77 *S. aureus* isolates. Although there is no matching between ribogroups and pulstotypes, a dominant pulstotype, G11, contained some isolates of ribogroups 2, 7 and 8 which have 98% similarity. Similarly, ribogroups 7 and 8 included some isolates of pulstotypes G5, G7 and G8 which have 97% and 98% similarity.

In Turkey, ribotyping was first used for *S. aureus* causing mastitis in bovine and also both ribotyping and PFGE methods were first for genotyping of these isolates in Afyonkarahisar region.

Key words: *Staphylococcus aureus*, mastitis, ribotyping, PFGE.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca değerli bilgi ve deneyimleri ile bana öncülük eden, gerek teorik gerekse deneysel çalışmalarım ve tez yazım aşamalarımnda yapıcı yönlendirmeleriyle bana yol gösteren, ışığı ile her zaman yolumu aydınlatan Sayın hocam Prof. Dr. Kıymet GÜVEN'e sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Alet ekipman konusunda her türlü desteği sağlayan Uzm. Erdoğan Çakır'a, Mikrobiyoloji Bölümü'nün diğer öğretim görevlilerine ve laboratuvarıda birlikte çalıştığımız tüm arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Maddi manevi her türlü destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan ve her zaman sabırla bana destek olan, sıcaklıklarını hayatımın her alanında daima hissettiğim ve bana bugünüme kadar her türlü fedakarlığı sunmaktan kaçınmayan değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Gülgün KANBER

Ocak, 2014

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii

1. GİRİŞ	1
1.1. Mastitis Hastalığının Tanımı ve Genel Özellikleri	2
1.2. Mastitis Etmeni Olarak Stafilocoklar.....	5
1.2.1. Stafilocokların tarihçesi ve taksonomisi	5
1.2.2. Genel özellikleri	7
1.2.3. Antijenik özellikleri	8
1.2.4. Enzimler	9
1.2.5. Toksinler	10
1.2.5.1. Alfa toksin	10
1.2.5.2. Beta toksin.....	10
1.2.5.3. Gama toksin	10
1.2.5.4. Delta toksin	11
1.2.5.5. Lökosidin	11
1.2.5.6. Epidermolitik toksinler.....	11
1.2.5.7. TSST (Toksik şok sendromu toksini)	11
1.2.5.8. Enterotoksinler	12
1.2.6. <i>S. aureus</i> suşlarında tiplendirme çalışmaları.....	12
1.3. Mastitis Etmeni Olarak <i>S. aureus</i> ile İlgili Dünya Geneli ve Türkiye’de Yapılan Çalışmalar	14

2. MATERYAL VE METOT	18
2.1. Materyal	18
2.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> izolatları.....	18
2.1.2. Kullanılan besiyerleri	19
2.1.2.1. Nutrient agar (Merck 1.05450)	19
2.1.2.2. Brain-Heart infusion broth (Merck 1.10493)	19
2.1.3. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve çözeltiler.....	19
2.2. Metot	20
2.2.1. Bakterilerin canlandırılması	20
2.2.2. <i>S. aureus</i> strainlerinin moleküler yöntemler ile tiplendirilmesi.....	21
2.2.2.1. <i>S. aureus</i> strainlerinin ribotiplendirilmesi.....	21
2.2.2.2. <i>S. aureus</i> strainlerinin PFGE ile tiplendirilmesi	21
3. BULGULAR	25
3.1. <i>Staphylococcus aureus</i> İzolatları ve Ribotiplendirme.....	25
3.2. Kromozomal DNA'nın Pulsed Field Gel Elektroforez (PFGE) ile Analizi	30
4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER	38
KAYNAKLAR	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

3.1. Membran üzerine sabitlenmiş bant profilleri	26
3.2. Farklı çiftliklerdeki sığırların sütlerinden izole edilen <i>S. aureus</i> strainlerinin ribogrupları	27
3.3. Ribogrupların içerdikleri izolat sayısına göre dağılım grafiği	28
3.4. Ribogrupların içerdikleri izolat sayısına göre yüzde (%) dağılım grafiği.....	29
3.5. <i>S. aureus</i> izolatlarından <i>EcoRI</i> enzimi ile elde edilen ribotiplere ait benzerlik dendogramı.....	29
3.6. Test edilen <i>S. aureus</i> izolatlarının grup temsilcilerine ait PFGE profilleri. M: Marker 11: G1; 15: G2; 18: G3; 27: G4; 54: G5; 56: G6; 84: G7; 101: G8; 102: G9; 115: G10; 121: G11; 122: G12; 131: G13; 146: G14; 44: G15; 163: G16; 169: G17; 208: G18; 276: G19	31
3.7. Pulsotiplerin içerdikleri izolat sayısına göre dağılım grafiği	32
3.8. Pulsotiplerin içerdikleri izolat sayısına göre yüzde (%) dağılım grafiği	33
3.9. <i>S. aureus</i> izolatlarından <i>SmaI</i> enzimi ile elde edilen pulsotiplere ait benzerlik dendogramı.....	34
4.1. Moleküler ve fenotipik tiplendirme yöntemlerinin taksonomik ayırım güçleri (Kıran, 2011)	42
4.2. Farklı atılım aralıklarında ayrımları yapılmış (switch intervals) 50-1000 kb büyüklükleri arasındaki DNA'lar (Birren ve Lai, 1993).....	49

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. Çeşitli hayvanlardan izole edilen stafilokok türleri (Ünal, 2007)	6
2.1. Mastitisli süt örneklerinin toplandığı yerleşim birimleri ve bu yerleşim birimlerinde bulunan çiftlikler	18
3.1. 16 farklı çiftlikte bulunan ribogruplar ve toplam izolat sayıları	27
3.2. 16 farklı çiftlikte bulunan pulsotipler ve toplam izolat sayıları	32
3.3. Toplamda 104 adet izolata ait identifikasyon, kaynak, ribogrup ve pulsotipler.....	35
4.1. Türkiye geneli büyükbaş hayvan sayıları 2002-2012 verileri (Tarım Bakanlığı, HAYGEM 2013)	38
4.2. Türkiye geneli sağılan hayvan sayıları 2002-2012 verileri (Tarım Bakanlığı, HAYGEM 2013)	39
4.3. Türkiye geneli sağılan hayvanlardan elde edilen süt miktarları 2002-2012 verileri (Tarım Bakanlığı, HAYGEM 2013)	39
4.4. Afyonkarahisar ili 2007-2012 yılları arası sığır sayıları (Tarım Bakanlığı-Afyonkarahisar 2013).....	40
4.5. Afyonkarahisar ili 2007-2012 yılları arası süt üretim miktarları (Tarım Bakanlığı-Afyonkarahisar 2013).....	40
4.6. PFGE profillerini yorumlama kriterleri (Tenover ve ark., 1995).....	50

1. GİRİŞ

Mastitis ineklerin meme dokularında görülen bir iltihap reaksiyonu olup *Staphylococcus aureus*, süt üretimi yapılan hayvanlarda en önemli mastitis etmenidir. Öldürücü olabilen bu meme salgı bezi enfeksiyonu tüm dünyada süt üretimi yapılan ineklerde yaygın olarak görülür ve süt endüstrisinde önemli ekonomik kayba yol açar. Buna ilaveten, *S. aureus* tüm dünyada enterotoksin üretimi nedeniyle diğer gıdalarda da en önemli gıda kaynaklı patojen olarak kabul edilmektedir. Metilisin dirençli *S. aureus*'lar (MRSA) nedeniyle bu tür enfeksiyonların kontrolü zorlaşmaktadır. Etkili bir kontrol için sadece antibiyotik kullanımı yeterli değildir. Ayrıca enfeksiyon etmeni *S. aureus* alt tiplerinin özellikle genetik akrabalık ilişkisinin belirlenerek (genotiplendirme) kontaminasyon kaynağının ve bulaşma yollarının izlenmesi gereklidir.

S. aureus izolatları arasında klonal ilişkiyi göstermek için çeşitli moleküler subtipendirme yöntemleri (örneğin; multilokus dizi analizi (MLST)), mevcut olup, bunlar arasında özellikle toplam DNA makrorestriksiyon profil analizine dayalı atılımlı alan jel elektroforez (Pulsed Field Gel Electrophoresis) kısaca PFGE yöntemi “altın standart” olarak kabul edilmektedir. Ribotiplendirme yöntemi ise daha kısa bir DNA bölgesinin (16S rRNA'yı kodlayan DNA) restriksiyon profillerinin analizine dayalı olup, özellikle identifikasyon ayrıca da genetik akrabalık ilişkisinin ortaya çıkarılmasında kullanılmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, Afyonkarahisar ili ve bazı ilçelerinde süt üretimi amaçlı beslenen ve mastitis enfeksiyonu taşıdığı belirlenen ineklerin sütlerinden izole edilmiş *S. aureus* izolatlarının moleküler tiplendirmesini yaparak genetik akrabalık ilişkisini tespit etmek ve enfeksiyon kaynakları hakkında bilgi sağlamaktır. Bu nedenle çeşitli çiftliklerdeki mastitisli sığırlardan elde edilen sütlerden toplanmış şüpheli 104 bakteri izolatı Ribotiplendirme ile identifikasyona alınmış ve hem ribotiplendirme hem de PFGE yöntemleri ile *S. aureus* olarak tanımlanan 77 izolat arasındaki genetik varyasyon incelenmiştir.

1.1. Mastitis Hastalığının Tanımı ve Genel Özellikleri

Mastitis tüm dünyada özellikle süt sığırlarında sıklıkla görülen ve süt endüstrisinde büyük ekonomik kayıplara neden olan bir sığır meme içi enfeksiyondur (Jain, 1979). Yunanca meme anlamına gelen “mastos” ve yangı anlamına gelen “itis” sözcüklerinin birleşmesinden meydana gelen “mastitis” hastalığının ortaya çıkış tarihi tam olarak bilinmemekte fakat insanoğlunun ineği evcilleştirdiği tarih olarak bilinen M.Ö 9000 yılından başlayıp günümüze kadar ulaştığı tahmin edilmektedir. Mastitisin süt ineği yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara yol açan bir hastalık olduğunu söylemek mümkündür (Atasever ve Erdem, 2008).

Türkiye sığır varlığı ile AB ülkeleri içinde 3. sırada, dünyada ise 27. sırada yer almakta ve süt üretimi açısından bakıldığında sığırın payı her geçen yıl artış göstermektedir. Bugün Türkiye ve çoğu ülkede tarımsal ekonomide geniş bir yer kapladığı bilinen süt endüstrisinin ve süt sığırı yetiştiricilerinin karşılaştığı sorunların en başında mastitis gelmektedir. ABD’de geçtiğimiz yıllarda mastitis nedeniyle meydana gelen yıllık zararın 2 milyar dolar, İngiltere’de ise 300 milyon sterlin olduğu tahmin edilmektedir. Türkiye’de ise; mastitisten kaynaklanan yıllık ekonomik zararın 41,5 milyon TL dolayında olduğu fakat etkin bir mastitis kontrol programı için harcanacak her 1 TL’nin sonrasında 5 TL olarak üreticiye geri döneceği düşünülmektedir. Bu nedenle mastitise yol açan etmenlerin bilinmesi ve gerekli önlemlerin alınmasını, hastalıktan kaynaklı zararları azaltmada en önemli adımlar olarak değerlendirmek mümkündür (Atasever ve Erdem 2008; Memmedova 2012).

Mastitis hastalığı memeli hayvanların hepsinde görülmekle beraber süt inekleri için ayrı bir önem taşımaktadır. Çünkü süt, özellikle insan beslenmesinde yer alan en önemli gıda kaynaklarından biri olarak bilinmektedir ve sütün başlıca kaynağı olarak ilk sırada süt ineklerinin yer alması sığır mastitisini diğer memelilerde görülen mastitislere oranla daha önemli kılmaktadır (Özpulat, 2011). Memeden sağlıklı bir şekilde sütün elde edilip, tüketime sunulması insan sağlığı açısından önemli bir konudur. Mastitisin bu kadar önemli olmasının diğer önemli

sebeplerinden biri; hastalığın subklinik şeklinin klinik haline oranla 20-30 kat daha fazla rastlanmasıdır. Subklinik mastitisler yetiştiriciler tarafından kolaylıkla belirlenememekte, bu nedenle de hastalık hayvandaki varlığını uzun bir süre devam ettirebilmektedir. Ayrıca gerek subklinik gerekse klinik mastitislerin tedavisi oldukça zordur. Tedavide inatçılık gösteren ve tekrarlayan vakalar oldukça fazladır. Hastalıktan dolayı memede meydana gelen tahribat da çoğunlukla geri dönüşümsüzdür. Bu nedenle geçmişten günümüze kadar mastitisin tedavisi, ortadan kaldırılması ve koruma-kontrolü ile ilgili bir çok araştırma yapılmıştır. Ancak, mastitisin etiyolojisinde çok sayıda faktörün rol oynamasından dolayı bu hastalığı yok etmek mümkün olmamıştır. Bu açıdan hastalıktan kaynaklı zararları en aza indirmek amaç edinilmiştir (Rişvanlı ve Kalkan, 2001).

Mastitis genellikle memenin süt yapan dokusunun, süt kanallarının ve sütü depolayan bölümlerinin tümünde görülebilen yangısal bozukluklar olarak tanımlanmıştır (Albayrak, 2007). Memenin hastalığa hangi şiddette reaksiyon verdiğine bağlı olarak yangının derecesi, yani mastitis hastalığının tipleri karşımıza çıkmaktadır (Memmedova, 2012). Mastitis enfeksiyonları genellikle 3 formda görülmektedir:

Latent enfeksiyon olarak bilinen enfeksiyon türünde hiçbir yangı belirtisi olmayıp, sütteki somatik hücre sayısı (SHS) normal düzeydedir. Patojen mikroorganizma bulunmasına rağmen memede patolojik bir değişiklik görülmez. Sütün özelliklerinde de belirgin bir farklılık yoktur (Atasever ve Erdem, 2008).

İkinci enfeksiyon şekli *subklinik mastitis* olarak bilinir. Tüm mastitis olgularının yaklaşık % 90- 95'lik bir kısmını oluşturur. Yüksek somatik hücre sayısına ek olarak patojen mikroorganizmalar da bulunur. Bu tür mastitis enfeksiyonları, klinik belirti göstermeksizin gelişir. Uzun süreli olan subklinik mastitis, klinik formdakine oranla 40 kat daha fazla görülür ve çoğunlukla klinik mastitise öncülük eder (Atasever ve Erdem, 2008). Meydana gelen değişikliklerin kolay fark edilememesi, özel yöntemler kullanılarak tanımlanabilmesi, süt veriminin ve kalitesinin azalması, klinik mastitislere kıyasla daha fazla oranda görülmesi nedeni ile süt sığırcılığı çiftliklerinde daha fazla öneme sahiptir (Dilsiz, 2010). Semptom göstermeyen hayvanlar sağlıklı kabul edilir ve bu nedenle

subklinik enfekte hayvanlar diğer sağlıklı hayvanlar için bir rezervuar görevi görür ve sağlıklı hayvanlar arasında enfeksiyonun yayılımına neden olurlar (Özpulat, 2011).

Üçüncü sırada yer alan *linik mastitis* ise sütte ve memede meydana gelen anormal değişiklikler ile teşhis edilebilir. Meme sert, kızarıklık ve ateşlidir. Sütteki pıhtı, ipliksi ve sulu oluşumlar “*strip cup*” testi ile gözlemlenebilir. İneğin enfeksiyona verdiği en önemli yanıt, beyaz kan hücrelerinin (lökositlerin) kandan enfeksiyon bölgesine kadar ulaşmasıdır. Süt sulu veya kendine özgü renginden uzak, genelde kahverengi veya kehribar rengi görünümünde olup, pıhtı ve flakonlar içerir. Şiddetli klinik olgularda enfekte olmuş loblar şişerek ateşli, sert ve dokunmaya karşı hassas bir hal alır. Ayrıca hassas inekler depresyon, sinirli davranışlar ve iştahtan düşme gibi hastalık belirtileri gösterirler (Atasever ve Erdem, 2008).

Süt sığırlarında yüksek süt verimi ile yüksek yağ/protein oranları, mastitis hastalığı açısından risk faktörüdür. Yüksek verimli oldukları bilinen Holstein Fresian ineklerinin sütleri; su (%87), yağ (%3,8), protein (%3,4), şeker (%4,5) ve mineral (%1,3) gibi maddelerden oluşup vücuttan yıpranarak kopan epitelyum hücre ve beyaz kan hücreleri gibi mikro bileşenleri de içerdiği bilinmektedir. Mastitis oluşturan patojenin neden olduğu enfeksiyon, salgı hücrelerinin zarar görmesine ve laktoz, yağ ve protein sentezinin azalmasına yol açmaktadır. Klinik ve subklinik enfeksiyonlar hücre zarlarının geçirgenliğini artırmakta ve kanın bileşenlerinin de süt içine sızmasına neden olarak süt ve süt mamüllerinin yapısını, kalitesini etkilemektedir. Enfeksiyon, süt veriminde azalmaya yol açarak mastitis ile süt verimi arasında negatif bir ilişki oluşturmaktadır (Atasever ve Erdem, 2008).

Mastitisin ortaya çıkmasını hazırlayan etmenler; ineğe bağlı olanlar, bakım ve çevre unsurları, sağım süreci olmak üzere üç ana başlıkta toplanabilirler. İneğe bağlı olanlar; ırk ve kalıtım, ineğin yaşı, laktasyon sayısı ve laktasyon dönemi, meme yapısı, süt verimi, immun sistem gücü, meme ve meme başındaki lezyonlar ile sağım kolaylığı olarak sıralanabilir (Atasever ve Erdem, 2008). Anatomik bozukluklara bağlı mastitis olgularında Se ve vitamin E eksiklikleri de süt ineklerini enfeksiyona duyarlı kılmaktadır (Özpulat, 2011). Bakım ve çevre

unsurları; mikroorganizmalar, sağım ve barınak koşulları (nem, ısı, ışık, havalandırma vs), zemin ve altlıklar, bağlanma şekli, beslenme, egzersiz ve mevsimin etkisi olarak sıralanabilir. Sağım süreci ise; sağım öncesi uyarma, sağım hijyeni, sağım tekniği, sağım makinesinden kaynaklı sorunlar ve sağımcının deneyimi gibi faktörlerden oluşmaktadır (Atasever ve Erdem 2008; Dilsiz 2010).

1.2. Mastitis Etmeni Olarak Stafilocoklar

Mastitise neden olan etmenler arasında bakteriler önemli bir yere sahiptir. Mastitis olgularından birçok etmen izole edilip, identifiye edilmiştir. Bu etmenlerin çoğunluğunu bakteriler oluşturmaktadır. İzole edilen etkenlerin içerisinde *S.aureus* tüm dünya çapında bulunan sütçülük çiftliklerindeki en sık görülen ve kontrolü en zor olan enfeksiyon etkeni olarak bildirilmiştir (Alaçam, 1986).

Sığırlarda görülen mastitis olgularının %95'inden *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* ve *Escherichia coli* izole edilmiş olup, bu bakteriler haricinde 130'dan fazla mikroorganizmanın mastitis oluşumunda etmen olduğu bildirilmiştir (Özpulat, 2011). Yine yapılan çalışmalarda kültür pozitif örneklerden izole edilen mikroorganizmaların %41'ini *Staphylococcus aureus*, %17,1'ini Koagülaz Negatif Stafilocok (KNS), %12'sini *Enterobacter aerogenes*, %9,4'ünü *Escherichia coli*, %8,5'ini *Streptococcus* spp., %6,8'ini *Klebsiella pneumoniae*, %5,1'ini *Citrobacter* spp. ve %2,6'sını *Bacillus* spp. oluşturduğu gözlemlenmiştir (Çokal ve Konuş, 2012). *Staphylococcus aureus* süt sığırı yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olan mastitislerden en sık izole edilen bakteridir (Zschöck 2005; Semacan 2012).

1.2.1. Stafilocokların tarihçesi ve taksonomisi

Stafilocoklar ilk kez 1878 yılında Robert Koch tarafından tanımlanmış, 1880 yılında Ogston ilk kez stafilocok (*Staphylococcus*) adı kullanmış ve patojen mikroorganizmalar olduğunu vurgulamıştır. Üremeleri sırasında birbirinden

ayrılmayan, üzüm salkımına benzeyen düzensiz kümeler oluşturmaları nedeniyle Yunanca’da “staphyle” üzüm salkımı, “coccus” tane, zerre anlamına gelen bu isimle adlandırılmışlardır. Daha sonraları 1884 yılında Rosenbach stafilokokları ilk kez saf kültür olarak üretmiş ve onların karakteristik özellikleri üzerinde ilk kez laboratuvar çalışmaları yürüterek taksonomik açıdan *Staphylococcus* türlerini tanımlamıştır (Gülbandılar 2006; Kılıç 2007; Dilsiz 2010; Sağlam 2011).

Çizelge 1.1. Çeşitli hayvanlardan izole edilen stafilokok türleri (Ünal, 2007)

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

Stafilokoklar, *Staphylococcaceae* familyasında yer alırlar ve morfolojik olarak benzer yapıda olan *Micrococcaceae* familyasından anaerobik olarak

üremeleri ve obligat aerobik mikrokoklardan farklı fermentasyon ve solunum mekanizmasına sahip olmaları nedeniyle ayrılırlar. Kimyasal ve biyokimyasal karakteristiklerinin yanı sıra, DNA Guanin ve Sitozin içeriklerikleri, hücre duvarı yapıları ile geniş oranda farklıdırlar (Götz ve ark. 2006; Kılıç 2007).

Stafilokok cinsi içinde çok sayıda tür bulunmasına rağmen, insanlardan ve diğer primatlardan izole edilen türler; *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. caprea*, *S. saccharolyticus*, *S. warneri*, *S. pasteurii*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. auricularis*, *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. xylosus* ve *S. simulans*'tır. Bu türlerin çoğunluğu insan doğal florasında bulunan bakterilerdir. Hayvanlardan izole edilen stafilokok türleri Çizelge 1.1 de sunulmuştur (Ünal, 2007).

1.2.2. Genel özellikleri

Stafilokoklar doğada yaygın olarak bulunurlar. Sporsuz bakterilerdir ve sporsuz bakteriler içerisinde doğa koşullarına en çok dayanan, kültürlerde 4°C'de 2-3 ay, -20°C'de 3-6 ay dayanma süresine sahip mikroorganizmalardır. İnsan ve hayvanlarda birçok hastalıkların etmeni olmalarının yanı sıra normal flora olarak da bulunabilirler. Antibiyotiklere karşı çok çabuk direnç oluşturmaları ve ürettikleri penisilinaz enzimi etkisiyle penisilinin etkisini ortadan kaldırmaları nedeniyle tedavi edilmeleri önemli organizmalardır.

Stafilokoklar yuvarlak 0,5–1,5 µm çapında koklardır. Genellikle düzensiz kümeler ve üzüm salkımı şeklinde görülürler. Gram pozitif, hareketsiz, fakültatif anaerob olup, genellikle aerob üremeyi seven, oksidaz negatif, katalaz pozitif, %10-15 NaCl içeren ortamda ve 18-40°C'ler arasında üreme özelliğine sahiptirler. Stafilokoklarda DNA G+C içeriği %30-39 oranında bulunmaktadır. Katı besiyerlerinde 1-2 mm çapında, altın sarısı, limon sarısı ve porselen beyazı renklerinde pigmentlerle düzgün koloniler oluştururlar (Gülbandılar 2006; Ünal 2007; Ekici ve ark. 2008).

Staphylococcus aureus, *Staphylococcus* cinsinin bir türüdür. 1µm çaplarında, diğer koklara göre yuvarlağa daha yakın bir şekildedir. Gram pozitif, hareketsiz, spor oluşturmeyen, genellikle kapsülsüz, fakültatif anaerob, 37°C' de ve pH 7-7.5 da optimal üreyebilen mikroorganizmalardır. Plaklarda düzgün, yuvarlak ve konveks yapıda koloni formu oluşturdıkları görülür. Katı besiyerlerinde altın rengi pigmentasyona sahip koloniler ile tanımlansalar da gıdalardan ve hayvanlardan elde edilen izolatların bazılarının bu özelliği göstermedikleri belirlenmiştir. Sıvı besiyerlerinde pigment görülmeyebilir veya bej renginde görülebilirler. Pigment üretimi 24-48 saat inkübasyon süresi ile arttırılabilir. Basit besiyerlerinde üreseler de kanlı agar besiyerinde kolonilerin çevresinde genellikle tam hemoliz bölgesi oluştururlar. Jelatini eritirler. Genellikle koagülaz enzimi üretir, mannitol ve değişik şekerleri fermente ederken gaz oluşturmada asit oluştururlar (Baird-Parker 1965; Götz ve ark. 2006, Gülbandılar 2006).

1.2.3. Antijenik özellikleri

S. aureus 30'dan fazla antijene sahiptir. En önemli antijenik yapıları hücre duvarlarıdır ve bu yapının kalınlığı 120 nm'nin üzerine çıkabilir. Hücre duvarı peptidoglikan, teikoik asit ve proteinlerden oluşmuştur. Yapının %50'sini oluşturan peptidoglikan, N-asetilmüramik asit ve N-asetilglukozamin'den oluşmuş polisakkaritlerdir. Monositlerden salınarak apse oluşumuna yol açacak interlöykin-1 salınımını sağlarlar. Hücre duvarının %40'ını oluşturan teikoik asit peptidoglikan tabakaya kovalent olarak bağlanmış fosfat içeren polimerlerdir. Tek başına zayıf antijenik özellik göstermesine rağmen peptidoglikan ile birlikte antikor sentezinin uyarımı gibi önemli biyolojik aktivitelere sahiptir. Diğer komponent olan proteinler ökaryotik hücrelere bağlanma ve adezyon için önemli olan fibronektin, fibrinojen, laminin ve kolagen içerirler. Adezyon proteinlerinin bağlanması ile dokulara bakteriyel tutunma gerçekleşmiş olur. Antijenik

proteinlerden en iyi çalışılmış olan Protein A, *S. aureus* suşlarının yaklaşık %90-98'inde mevcuttur (Harris 2002; Gülbandılar 2006; Kılıç 2007; Dilsiz 2010).

1.2.4. Enzimler

Katalaz, stafilokoklar için toksik etkisi olan hidrojen peroksidi (H_2O_2) oksijen ve suya parçalar. Toksik hidrojen peroksit ve serbest radikallerini inaktive etmesi sayesinde mikroorganizmayı konağın savunma mekanizmalarından korur.

Koagülaz, ekstraselüler olarak salgılanan bir enzimdir ve fibrinojeni fibrine çevirerek pıhtılaştırma işlevini görür. Enfeksiyon esnasında *in vivo* fibrin bir bariyer oluşturarak bakteriyi fagositozdan korur. Koagülaz üretimi *S. aureus* için belirleyici bir faktördür. *S. aureus* suşları serbest ve bağlı koagülaz (clumping factor) olmak üzere immünolojik ve etki mekanizmaları farklı olan iki ayrı tipte koagülaz enzimi üretirler. Protein yapıda olan serbest koagülaz, fibrinojenin fibrine dönüşmesi ile trombin benzeri bir faktör olan stafilotrombin oluşturarak stafilokokların kümeleşmesini sağlar. Bağlı koagülaz ise hücre duvarına bağlı halde olup direkt olarak fibrinojene doğrudan bağlanarak onu çözülemez fibrine dönüştürür. Bu sayede hücre yüzeyinde fibrin iplikçikleri meydana gelir ve stafilokokların gözle görünür kümeler oluşturmaya neden olur.

Hyaluronidaz, *S. aureus* suşlarının %90'ının ürettiği, antijen özelliği olan bir enzimdir. Bağ dokusunun yapısında bulunan hyaluronik asitin parçalanmasını ve böylece stafilokokların doku içerisinde kolayca yayılmalarını sağlar.

Fibrinolizin, dokularda bulunan fibrin kümelerini parçalayarak enfeksiyonun dokularda daha kolay yayılmasına yol açar.

Lipaz, deri ve deri altı dokulardaki lipitleri hidrolize ederek stafilokokların lipid bakımından zengin olan bölgelerde yaşamalarını sağlar.

Deoksiribonükleaz (DNaz), DNA omurgasındaki fosfodiester bağlarını hidrolize eder.

Beta laktamaz, antibiyotiklerin beta-laktam halkasını hidrolize eder ve özellikle penisilin ve sefalosporinler gibi beta laktam halkasına sahip

antibiyotiklere direnç gelişmesine neden olan enzimdir (Gülbandılar 2006; Barkar 2009; Dilsiz 2010).

1.2.5. Toksinler

S. aureus 5 sitolitik toksin (alfa, beta, gama, delta toksin ve lökosidin), epidermolitik toksin, toksik şok sendromu toksini ve 5 farklı enterotoksine sahiptir. Sitolitik toksinler hemolizinler olarak da bilinirler. İlk dört toksinin aktivitesi eritrositlerle sınırlı olmayıp, lökosidin eritrositler üzerine etki etmemektedir (Barkar, 2009).

1.2.5.1. Alfa toksin

S. aureus suşlarının membrana zarar veren en etkili nörotoksinidir. Hemolitik, dermonekrotik ve sitolitik özelliklere sahiptir. Eritrosit, lökosit, trombosit gibi çeşitli ökaryotik hücreler üzerinde bulunan reseptörlere bağlanarak hücre membranı üzerinde porlar oluştururlar (Ünal 2007; Barkar 2009; Dilsiz 2010).

1.2.5.2. Beta toksin

Sfingomiyelinaz C olarak da bilinen bu toksin, en iyi koyun daha az olarak da insan ve tavşan alyuvarlarını lize ederken lökosit, makrofaj ve fibroblastlar dahil birçok hücre için de toksik özellik gösterir. Sığır mastitislerinden izole edilen suşların çoğunda üretilmektedir ve bu nedenle de mastitisin patogenezisinde önemlidir (Ünal, 2007).

1.2.5.3. Gama toksin

İnsan, koyun, tavşan eritrositleri duyarlı iken, kanatlı ve at eritrositleri dirençlidir. Belirgin hemolitik aktivitesinden hariç etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir (Ünal 2007; Barkar 2009).

1.2.5.4. Delta toksin

Eritrosit, lökosit, makrofaj, lenfosit ve trombositler üzerinde lize edici etkisinin yanısıra dermonekrotik etkisi de saptanmıştır. Alfa ve beta toksinlerden farklı olarak immunolojik aktiviteye sahip değildir (Dinges ve ark., 2000).

1.2.5.5. Lökositin

Mastitis vakasından izole edilen *S. aureus* suşlarının bir kısmında lökotosik etki saptanmıştır. Bu toksinlerin sığır mastitislerinde virülens faktörlerden biri olabileceği ve hastalığın gelişiminde önemli bir role sahip olabileceği düşünülmüştür (Fournier ve ark., 2008). Tek başına litik etkiye sahip olmayan, birbiriyle sinerjik etki yapan S (slow) ve F (fast) olarak isimlendirilmiş iki komponentten meydana gelir. Granülosit ve makrofajlara üzerinde litik etkiye sahiptir ve stafilokokları fagositoza karşı korur (Rainard ve ark. 2003; Barkar 2009).

1.2.5.6. Epidermotolitik toksinler

Cildin epidermis tabakasında bulunan mukopolisakkaritlerini hidrolize ederler. Türkiye’de yapılan bir çalışmada, 92 *S. aureus* suşunda epidermolitik toksin genlerine rastlanmamıştır (Karahana 2009; Pehlivanoğlu 2011).

1.2.5.7. TSST (Toksik şok sendromu toksini)

İnsanlarda toksik şok sendromu hastalığına yol açan protein tabiatlı bir toksindir. Yüksek ateş, döküntü, kusma, ishal ve bazen ani çocuk ölümlerine neden olabilmektedir. Türkiye’de yaptıkları bir çalışmada 92 *S. aureus* suşundan 3 tanesinde (%3,3) TSST genine rastlanmıştır (Karahana 2009; Pehlivanoğlu 2011).

1.2.5.8. Enterotoksinler

S. aureus suşları tarafından oluşturulan toksinlerdir ve sindirim sisteminde etkilerini göstererek stafilokokal gıda zehirlenmelerine neden olurlar. Stafilokokal enterotoksinler (SE), önceleri SEA, SEB, SEC, SED, SEE olarak 5 enterotoksin tipi belirlenmişse de daha sonra SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEQ, SER ve SET olarak kodlanmış enterotoksin tipleri de tanımlanmıştır (Zschöck 2005; Fournier ve ark. 2008).

Türkiye’de sığır mastitisi vakalarıyla ilgili yapılan çalışmalarda izole edilen *S. aureus* suşlarında bu enterotoksinlerin değişik oranlarda varlıkları saptanmıştır. Boynukara ve ark. (2008) Van ili çevresinden izole ettikleri *S. aureus* suşlarının %25,5’ini enterotoksijenik bulup en yaygın tipin SEA olduğunu ve SEC- SED tiplerinde enterotoksine rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Karahan ve ark. (2009) ise çalışmalarında, izole edilen *S. aureus* suşlarının %29,3’ünün SEI en yaygın olmak üzere bir veya birden fazla enterotoksin geni taşıdığını ve SEA, SEE, SEH genlerine hiçbir izolatta rastlamadıklarını belirtmişlerdir.

1.2.6. *S. aureus* suşlarında tiplendirme çalışmaları

Enfeksiyon hastalıklarının kontrol ve tedavi süreci içerisinde etkili yöntemler geliştirebilmek için patojenlerin doğadaki kaynaklarının, yayılımlarının ve epidemiyolojilerinin araştırılması gerekmektedir. Bu nedenden dolayı insan ve hayvanlarda önemli enfeksiyonlar meydana getiren *S. aureus* izolatları tiplendirilmeli ve klonal yakınlıkları araştırılmalıdır. Tiplendirme çalışmaları için fenotipik ve genotipik karakterlere dayalı birçok yöntem kullanılmaktadır. Ancak genotipik yöntemler, fenotipik yöntemlere oranla tekrarlanabilirlik, ayırım gücü yüksekliği bakımlarından daha üstün olduğu belirtilmiştir (Kapur ve ark. 1995; Ünal 2007).

Vitek Sistem olarak isimlendirilen otomikrobik sistem, bakterileri otomatik bilgisayarlı sistemi ile hızlı bir şekilde tanımlamaktadır. Ruoff ve ark. (1982) gram pozitif bakterilerin otomatik tanımlanması için yaptıkları çalışmada; geleneksel tanımlama yöntemleriyle elde edilen sonuçları Vitek Sistem ile

elde ettikleri sonuçlar ile karşılaştırmışlar ve birbirleriyle uyumlu sonuçlar elde etmişlerdir. Cartwright ve ark. (2013) ise; Staph AST-P620 kart sistemli Vitek 2 (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France) otomatik antimikrobiyal duyarlılık test sistemini mecC-pozitif metisilin dirençli *S. aureus* izolatları için kullanarak oxacilin duyarlılık/cefotaxim dirençlilik profillerini test etmişlerdir.

Tenover ve ark. (1994) *S. aureus* izolatlarını tiplendirmek için kullanılan moleküler yöntemleri karşılaştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada; 59 adet *Staphylococcus aureus* ve kontrol amaçlı 1 adet de *Staphylococcus intermedius* izolatlarını antibiyogram, bakteriyofaj tiplendirmesi, biyotiplendirme, immüno-blotting, insertion sequence typing (IS), multilokus enzim elektroforezi (MLEE), plazmid DNA'nın restriksiyon analizi (REAP), pulsed-field ya da field inversion jel elektroforezi (PFGE-FIGE), amplifiye-PCR koagülaz gen sekansının restriksiyon analizi, restriction fragment length polymorphism (RFLP) ve ribotiplendirme metotlarına tabi tutmuşlardır. Bu amaçla kullanılan 12 tip tiplendirme yönteminin hiçbirinin tek başına diğerlerinden üstün olmadığını, biyotiplendirme yönteminin ise epidemik suşların belirlenmesinde etkisiz olduğunu belirtmişlerdir.

Ayrıca bu yöntemlerin yanısıra gaz kromatografisi kullanımıyla mikroorganizmaların hücrelerindeki yağ asitleri profilleri analiz edilerek aralarındaki genetik akrabalık belirlenmektedir. Stoakes ve ark. (1994) Gaz-Sıvı Kromatografisi'ni kullanarak Microbial Identification System (MIS) ile 470 adet *S. aureus* izolatlarını analiz etmişlerdir.

Bir başka çalışma ile Hartmann ve ark. (2005) peptid nükleik asit problemlerini (PNAs) kullanarak Fluorescence in situ hybridization (FISH) yöntemi ile insan kanından izole edilen *Staphylococcus aureus* örneklerini tanımlayarak PNA FISH kombinasyonunun kan örneklerinde kültür edilemeyen stafilocokların tanımlanması için alternatif bir yaklaşım olabileceğini göstermişlerdir. Wu ve ark. (2012), FISH ile PCR yöntemlerini kıyaslayarak yaptıkları çalışmada *Staphylococcus aureus*'ün tanımlanmasında hız kavramına değinmişlerdir. FISH metodunun PCR metoduna oranla 1 saat daha hızlı sonuç verdiğini belirtmişlerdir.

1.3. Mastitis Etmeni Olarak *S. aureus* ile İlgili Dünya Geneli ve Türkiye’de Yapılan Çalışmalar

Staphylococcus aureus bulaşıcı mastitis etmenleri arasında antibiyotiklere karşı direnç oluşturmaları nedeniyle tedavisi zor olan bir patojendir. Yapılan çalışmalar da mastitise neden olan olgular arasında en sık rastlanan patojenlerden birinin *S. aureus* olduğunu göstermektedir.

Sabour ve ark. (2004) yaptıkları çalışma ile Doğu Kanada’da 58 adet süt ineği sürüsünden 288 adet *S. aureus* izolatu toplamışlar ve pulsed field jel elektroforezi kullanarak izolatların *SmaI* kesimli kromozomal DNA’larını makrorestriksiyon analiz yapmışlardır. Buna ek olarak örneklerin faj tiplendirilmesi ve 10 antimikrobiyal bileşene duyarlılıkları değerlendirilmiştir. 29 farklı PFGE tipleri belirlenen izolatların genetik akrabalıkları değerlendirilerek elde edilen sonuçlarda, PFGE tiplendirmesinin faj tiplendirmesine oranla daha iyi bir ayırım gücüne sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Capurro ve ark. (2010) yaptıkları çalışmalarında; akut klinik mastitisli sığırlardan izole ettikleri 82 adet *S. aureus* izolatının, pulsed field jel elektroforezi kullanarak elde ettikleri pulstotip farklılıklarını İsviçre’nin coğrafik bölgelerine göre genetik çeşitliliğini yorumlamayı amaçlamışlardır. Aynı zamanda izolatlarda hemolizis tipleri, β -laktamase üretimi, *S. aureus* pulstotipleri ve cinsleri, meme ucu lezyonları arasındaki ilişki de çalışılmıştır. Toplamda 25 pulstotip elde edilmiş ve en sık görülen pulstotipler (%26) tüm bölgelerden toplanan izolatlarda bulunmuştur. Pulstotiplerin dağılımının ülkenin kuzeyinde, güneyinde ve orta bölgelerinde olduğu görülmüştür. Sonuçlar bazı pulstotiplerin ülkedeki sürüler arasında yaygın bir şekilde dağılmış olduğunu göstermiştir.

Febler ve ark. (2010) Almanya’da yaptıkları çalışmada 17 süt çiftliğinden, 25 adet metisiline dirençli *S. aureus* ST398 klinik mastitis kaynaklı izolat ile çiftlik personelinden 2 adet izolat toplayarak genetik ilişkilerini, antimikrobiyal dirençlerini ve virulens özelliklerini araştırmışlardır. *SmaI* PFGE ile tiplendiremedikleri 27 izolatı 9 farklı major *ApaI* patternleri ile 3 subpaternerle ayırmışlardır. Uygulanan diğer yöntemler sonucunda izolatların *ApaI* PFGE profilleri ile diğer genotipik ve fenotipik karakterlerinin yüksek derecede

değişkenlik gösterdikleri görülse de virülens gen patternlerinin korunduğu görülmüştür.

Paterson ve ark. (2013) İngiltere’de *mecC* metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* bakterisinin süt çiftliklerindeki yaygınlığını araştırmak amacıyla çalışma yapmışlardır. Örnekler rastgele seçilmiş ve *mecC* ve *mecA* için çoğaltılan DNA kısımları PCR’da görüntülenmiş ve *mecC* MRSA izolatlarını daha ileri seviyede tiplendirme testlerine (multilokus sekans tiplendirmesi, *spa* tiplendirmesi ve antimikrobiyal duyarlılık testleri) tabi tutarak karakterize etmişlerdir. *mecC* MRSA patojenlerinin İngiltere’deki süt çiftlikleri arasında yaygın bir şekilde dağılım gösterdiğini fakat bu yayılımın bütün ülke üzerinde tek tip olmadığını belirtmişlerdir.

Abd-Elrahman (2013) Mısır’da 500 evcil süt sığırından topladığı örnekleri antimikrobiyal duyarlılıklarına göre test etmiştir. Evcil süt sığırlarında subklinik mastitisin klinik mastitise oranla daha yaygın olduğunu belirten araştırmacı, örneklerden en yüksek oranlarla *S. aureus* ve *E. coli* bakterisini izole etmiştir.

Karahan ve Çetinkaya (2006), Türkiye’nin doğu ve güneydoğu bölgelerinden rastgele seçilen 32 yerleşim biriminden mastitis hastalığı klinik olarak kanıtlanmamış 700 California Mastitis Test (CMT)-pozitif süt örneği toplamışlar ve PCR ve RFLP analizlerine tabi tutmuşlardır. 700 CMT-pozitif süt örneği arasından 200 izolat spesifik PCR ile *S. aureus* türü olarak tayin edilmiş ve bu izolatlardan 161 tanesi 3’ sonlu *coa* geni pozitif olduğu PCR ile belirlenmiştir. İzolatların çoğu *coa* PCR’da 500-1400bp molekül ağırlığında tekli bir bant oluşturmuş ama izolatların küçük bir kısmı 2 amplifikasyon ürünü vermişlerdir. *AluI* ve *Hin6I* kullanılan *coa* RFLP analizi sırasıyla 23 ve 22 band patterni ortaya çıkarmıştır. *Coa* PCR yöntemi ile ortaya çıkarılan çift bantların öncelikli olarak insan izolatlarında bulunması, süt sağım personellerinin *S. aureus* yayılımında bir rol oynayabileceğini desteklemiştir.

Boynukara ve ark. (2008), Van il merkezine komşu köylerde bulunan subklinik mastitisli ineklerden topladıkları 480 adet süt örneğinden 106 adet *S. aureus* strainini izole ederek, bu izole strainlerin klasik enterotoksijenik özelliklerini araştırmayı amaçlamışlardır. 27 izolat RPLA (Reverse Passive Latex Agglutination) ile enterotoksijenik bulunmuştur. Bunlardan 25 adeti stafilokokkal

enterotoksin A (SEA), diğer 2 adeti de stafilokokkal enterotoksin B (SEB) pozitif bulunmuşlardır. SEC ve SED pozitif olan hiçbir izolata rastlanmamıştır. Böylece subklinik mastitisli sığırlardan izole edilen çoğu *S. aureus* straininin diğer stafilokokkal enterotoksinlere oranla en çok SEA ürettikleri ortaya konmuştur.

Aras ve ark. (2011), mastitis enfeksiyonlu keçilerden izole edilmiş metilisin-dirençli *S. aureus* izolasyonu ile ilgili herhangi bir bildiri bulunmadığını belirterek, merkez Anadolu'dan 2008-2009 yılları arasında mastitisli keçilerden toplanan 42 *Staphylococcus aureus* straini incelemişlerdir. 2 adeti dışında 42 *S. aureus* straini MRSA gibi Kirby-Bauer disk difüzyonu ve *mecA* polymerase chain reaction (PCR) metodları ile identifiye edilmişlerdir. *Coa* gen polimorfizmine dayalı, keçi strainleri 6 tipte gruplandırılmışlardır. RAPD yöntemi kullanılarak, 42 *S. aureus* straininden 10 farklı pattern elde edilmiş ve strainler 6 alt gruba yerleştirilmişlerdir. Strainlerin toplamda %71'i RAPD yöntemi ile bir ana gruba ve 4 alt gruba kümelendirilmişlerdir. 2 MRSA straini RAPD metodu kullanılarak identical pattern olarak üretilmiş ve diğer *S. aureus* strainlerinden ayrılmıştır. Araştırmacılar yaptıkları çalışmanın, klinik mastitisli keçilerde MRSA izolasyonunun ilk bildirisi olduğunu belirtmişlerdir.

Günaydın ve ark. (2011), Hatay ilinde bulunan subklinik mastitisli sığırlardan izole ettikleri *Staphylococcus aureus* strainlerinde bulunan toksik şok sendrom toksin-1 ve kodlanmış enterotoksin genlerini polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile saptamayı amaçlamışlardır. 61 izolattın bir ya da daha fazla toksin geni içerdiği saptanmıştır. En çok rastlanan enterotoksin genlerinin sırasıyla *seg* (%16,2) ve *sei* (%16,2), takiben *sec* (%15,4), *sed* (%10,8) ve *sej* (%10,8) olduğu bulunmuştur. *Tst* geni 7 (%5,4) izolatta tespit edilmiştir. Hiçbir *S. aureus* straini *sea*, *seb*, *see* ve *seh* genlerini barındırmamıştır. Bu toksinler stafilokokkal gıda zehirlenmeleri maddeleri olarak tanımlandığından beri, bu toksinlerin tüketilen çiğ süt ve süt ürünlerinde toksijenik *S. aureus*' un halk sağlığı için yüksek bir yaygınlık rolü oynadığı ve risk teşkil ettiği bu çalışma ile bulunmuştur.

Çokal ve Konuş (2012), 4 adet damızlık süt sığırı çiftliğinden laktasyon dönemindeki 125 adet inekten örnekler toplayarak California mastitis testi (CMT), somatik hücre sayısı (SHS) ve konvansiyonel yöntemlere göre bakteriyolojik analizlerini gerçekleştirmişlerdir. İnceleme sonrasında klinik mastitis bulgusuna

rastlanmamış olup, kültür pozitif örneklerden %41 *S. aureus*, %17,1 Koagülaz Negatif Stafilokok (KNS), %12,0 *Enterobacter aerogenes*, %9,4 *Escherichia coli*, %8,5 *Streptococcus* spp., %6,8 *Klebsiella pneumoniae*, %5,1 *Citrobacter* spp. ve %2,6 *Bacillus* spp. olmak üzere toplamda 120 adet aerobik bakteri identifiye etmişlerdir. Sonuç olarak subklinik mastitisli sığır sütlerinden en yüksek oranda *S. aureus* izole edilmiştir.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. *Staphylococcus aureus* izolatları

Afyonkarahisar ili merkez ve çevresine ait 6 farklı yerleşim biriminde (Emirdağ, Çobanlar, Afyon Merkez, Çay, Dinar, Salar) 16 adet farklı tarım çiftliğinde (Çizelge 2.1) bulunan 186 adet mastitisli sağmal sığırdan California Mastitis Test (CMT) ile pozitif çıkan süt örnekleri toplanmış, bakteri izolasyonları yapılmıştır. Mastitis taraması, süt örneklerinin toplanması, bakteri izolasyonu ve klasik biyokimyasal identifikasyon işlemleri Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı üyesi Yrd. Doç. Dr. Beytullah Kenar tarafından gerçekleştirilmiştir. Özetle; toplanan süt örnekleri %7'lik Koyun Kanlı Agar, McConkey Agar besiyerlerine ekimleri yapılarak 24-48 saat süre ile inkübe edilmiş ve saf kültürlerle oksidaz, katalaz, koagülaz (lamda ve tüpte), furazolidona duyarlılık, hemoliz, pigment oluşumu, O/F, Baird Parker Agar (BP), Egg yolk tellurit, Mannitol Salt Agar (MSA), DNase Agar da üreme ve API Staph (Bio Merieux, France) testleri uygulanmıştır.

Çizelge 2.1. Mastitisli süt örneklerinin toplandığı yerleşim birimleri ve bu yerleşim birimlerinde bulunan çiftlikler

ÇİFTLİK KODU	ÇİFTLİK ADI	ÇİFTLİK KODU	ÇİFTLİK ADI
E1	Emirdağ 1. çiftlik	B1	Çay 1. çiftlik
E2	Emirdağ 2. çiftlik	B2	Çay 2. çiftlik
E3	Emirdağ 3. çiftlik	B3	Çay 3. çiftlik
C1	Çobanlar 1. çiftlik	D1	Dinar 1. çiftlik
C2	Çobanlar 2. çiftlik	D2	Dinar 2. çiftlik
A1	Afyon Merkez 1. çiftlik	D3	Dinar 3. çiftlik
A2	Afyon Merkez 2. çiftlik	S1	Salar 1. çiftlik
A3	Afyon Merkez 3. çiftlik	S2	Salar 2. çiftlik

Bu aşamadan sonra, *S. aureus* olarak tanımlanan 104 adet bakteri izolatu tarafımıza gönderilerek ribotiplendirme ve PFGE teknikleri ile genotiplendirme çalışmalarına alınmıştır.

2.1.2. Kullanılan besiyerleri

2.1.2.1. Nutrient agar (Merck 1.05450)

20 gram Nutrient Agar tartılmış ve hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. 121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilen besiyeri 45-50 °C' ye soğutulurak steril petrilere bölüştürülmüştür.

2.1.2.2. Brain-Heart infusion broth (Merck 1.10493)

37 gram Brain-Heart Infusion Broth tartılarak distile su ile hacim 1000 ml' ye tamamlanmıştır. Hazırlanan besiyeri cam tüplere her biri 5 ml olacak şekilde dağıtılıp tüpler 121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

2.1.3. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve çözeltiler

- Gliserol, %15 oranında distile su ile seyreltilerek kullanılmıştır.
- Trizma Hidroklorid (Tris-HCl) (Sigma T1503)
- Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) (Sigma E5513)
- N-Lauroysarcosine sodium (Sarkozyl) (Sigma L9150)
- Brij 58 (Sigma P5884)
- Sodium deoxycholate (Sigma D6750)
- NaCl (Riedel-De Haen 13423)
- Boric Acid (Sigma B7901)
- Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma L3771)
- Proteinase K (Sigma P6556)
- Lysostaphin (Sigma L7386)

- Low melting point agarose (Sea plaque 50111)
- Agarose (Bio-Rad 162-0138)
- 5X TBE (Tris-Boric Acid-EDTA, pH 8,0): Öncelikle 0,5 M EDTA solüsyonu hazırlamak için 93,05 gram EDTA tartılarak distile su ile 500 ml hacime tamamlanmıştır. 54 gram trizma base ve 27,5 gram borik asit tartılarak 900 ml distile su içerisinde çözündürülmüştür. 20 ml 0,5 M EDTA ve distile su eklenerek son hacim 1 litreye tamamlanmıştır.
- TEN Tamponu (pH 7,5) : 100 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA ve 150 mM NaCl 100 ml distile suda çözündürülmüştür.
- Lysis Tamponu: 6 mM Tris-HCl (pH 7,6) , 100 mM EDTA, 1 M NaCl, %0,5 Brij 58, %0,2 Sodium deoxycholate, %0,5 Sodium lauryl sarcosine hesaplanarak 100 ml distile su içerisinde çözündürülmüştür.
- ESP Tamponu: Öncelikle stok EDTA çözeltisi (pH 8,0) hazırlamak için 0,778 gram Tris-HCl ve 0,186 gram EDTA tartılarak 480 ml distile su ile çözündürülmüş, konsantre NaOH ile pH ayarlanmıştır. Kullanım esnasında 100 ml stok solüsyon üzerine 1 gram SDS eklenmiştir. Proteinaz K kullanımdan hemen önce 20 ml solüsyona 20 miligram olacak şekilde eklenmiştir.
- TE Tamponu: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) ve 1 mM EDTA (pH 8,0) 1 litre distile su ile çözülmüştür.

2.2. Metot

2.2.1. Bakterilerin canlandırılması

CMT pozitif sütlerden izolasyonu gerçekleştirilen ve -80°C' de %15'lik gliserol içerisinde muhafaza edilen 104 izolat aktif edilmek amacıyla Nutrient Agar (NA) besiyerine ekilmiştir. Petriler 37°C'de 24 saat aerobik koşullarda inkübe edilmiştir.

2.2.2. *S.aureus* strainlerinin moleküler yöntemler ile tiplendirilmesi

2.2.2.1. *S.aureus* strainlerinin ribotiplendirilmesi

1. İzolatlar üretici firmanın Riboprinter (Mikrobial Characterisation System, DuPont Qualicon, Wilmington; De) tavsiye ettiği şekilde analize hazırlanmıştır.
2. Analize alınan örnekler nutrient agara ekilmiş ve 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir.
3. Firmanın tavsiyesi doğrultusunda 40 µl örnek solüsyonu bulunan tüplere nutrient agarda gelişen kültürlerden alınarak 5 saniye vortekslenmiştir. Bu işlem iki kez tekrarlanmıştır.
4. Hazırlanan bu süspansiyondan 30 µl cihazın kendi tüplerine aktarılmış ve 80°C’de 25 dakika ısıyla muamele edilmiştir.
5. Bu işlemden sonra her bir tüpe 5 µl lysing agent A ve 5 µl lysing agent B solüsyonlarından ilave edilmiş ve örnekler cihaza yüklenmiştir.
6. 24-30 saat sonunda sonuçlar değerlendirilmiştir.
7. Genetik parmak izi yöntemi kullanılarak *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesilen kromozomal DNA fragmentleri boyutlarına göre ayrılmış, işaretli rRNA operon problemleri ile hibridize olmuşlardır. İzolatlardan elde edilen fragmentler ile bilgisayar kütüphanesi ortamında kayıtlı *S. aureus* marker fragmentleri karşılaştırılarak ribogruplar belirlenmiştir.

2.2.2.2. *S.aureus* strainlerinin PFGE ile tiplendirilmesi

DNA’nın saflaştırılması ve izolasyonu

İzolatlardan DNA izolasyonu, kesilmesi ve elektroforezi için Hennekine ve ark. (2003) ve Bannerman ve ark. (1995) tavsiye ettikleri yöntem kullanılmıştır:

1. Saf *Staphylococcus aureus* izolatları 5 ml Brain-Heart Infusion Broth içinde 37°C çalkalamalı etüvde 1 gece (over night) inkübe edilmiştir.

2. 1ml sıvı kültür eppendorf tüplere aktarılıp 3500 g, 4°C'de 20 dakika santrifüj edilmiştir.
3. Bu işlemten sonra eppendorf tüpündeki sıvı kısmı uzaklaştırıp peletin üzerine 1 ml TEN buffer eklenmiştir.
4. Birkaç dakika vortekslenmiştir.
5. Pelet ile TEN buffer iyice karıştıktan sonra 3500 g'de, 20 dakika, 4°C'de santrifüj edilmiştir.
6. Sıvı kısım uzaklaştırılıp, kalan pelet üzerine 0,5 ml Lysis buffer eklenmiştir.
7. Tekrar santrifüj edilmiştir (3500 g, 20 dk, 4°C).
8. Bu arada Low-melting Point (LMP) agaroz hazırlanmıştır (10 ml distile suya 0,2 g LMP agaroz).
9. Lysostaphin hazırlanmıştır (0,5 mg lysostaphin + 0,5 ml distile su).
10. Lysis buffer'li hücre süspansiyonundan 0,5 ml, LMP agaroz 'dan 0,5 ml ve Lysostaphin 'den 15 µl eklenip karıştırılmıştır.
11. Bu karışımdan 1 ml alınıp jel plaklarına yüklenmiş ve 4°C'de (soğuk odada) yarım saat bekletilmiştir.
12. Bu işlem bittikten sonra plaktaki jeller tek tek 2 ml lysis buffer içeren tüplere aktarılmıştır.
13. Tüpler hareket ettirilmeden 35°C'de etüvde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.
14. İnkübasyonun ardından Lysis buffer uzaklaştırılıp ve yerine 1 ml ESP buffer eklenmiştir (ESP buffer kullanılmadan hemen önce içine 10 mg Proteinase K ilave edilmiştir).
15. Tüpler hareket ettirilmeden 55°C'lik su banyosunda 1 gece bekletilmiştir.
16. Agaroz plaklar 3 kez TE buffer ile yıkanmıştır. İlk yıkama 10 ml TE buffer ile, 2. ve 3. yıkamalar 5 ml TE buffer ile gerçekleştirilmiştir. Her yıkama arasında 1 saat beklenmiştir.
17. En son yıkamadan sonra plaklar 3-4 ml TE buffer içinde 4°C'de elektroforeze kadar saklanmıştır.

***SmaI* enzimi ile kesim**

1. Restriksiyon buffer (RB) hazırlanıp, buz üzerinde muhafaza edilmiştir.

Hazırlanışı: 300 µl NE Buffer (BioLabs B70045)

30 µl BSA Buffer (BioLabs B9001S)

2,670 ml TE BUFFER

Toplam: 3 ml

2. Kültürden her bir örnek için ependorflara 100 µl RB konulmuştur (Buz üzerinde).
3. Önceden hazırlanan agaroz plaklardan 2 mm kalınlığında kesilerek RB içeren ependorflara aktarılmıştır.
4. 30 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra, RB uzaklaştırılıp yerine taze 100 µl RB eklenmiştir.
5. Her bir tüpe 1 µl *SmaI* (BioLabs R0141S) enzimi eklenmiştir.
6. 37°C’de 1 gece veya 2 saat bekletilmiştir.

***SmaI* – tanıma bölgesi:** 5’...CCC↓GGG...3’

3’...GGG↓CCC...5’

Elektroforez jelinin hazırlanması ve yüklenmesi

1. Enzim içeren ependorflardan RB uzaklaştırılmıştır.
2. Yerine Proteinase-K içermeyen ESP buffer ‘dan 500µl eklenmiş ve oda sıcaklığında 2 saat bekletilmiştir.
3. Marker DNA (Bio-Rad 170-3635/Lambda Ladder) jele yüklenmeden önce, 45°C’ye ısıtılmış su banyosunun içinde 30 dakika bekletilmiştir.
4. Elektroforez esnasında plakları sabitleyici jel olarak; 10 ml %1’lik LMP agaroz eritilip 55°C’de su banyosunda bekletilmiştir.
5. Yürütme tamponu olarak 2 litre 0,5X TBE hazırlanmıştır (5X TBE’den 200 ml alınıp üzerine 1,8 lt distile su eklenmiştir). Yürütme jeli için; 0,8

gram agaroz tartılıp üzerine 80 ml 0,5X TBE'den eklenmiş ve mikrodalgada eritilmiştir.

6. DNA bantlarının UV'de görüntülenmesini sağlamak için GelRed (Biotium 41003) boyasından 4µl eritilen jele pipetlenerek homojen bir şekilde karışımları sağlanmıştır.
7. Jelin soğuması beklenilirken kalan 1,8 lt 0,5X TBE tamponu elektroforez tankına transfer edilip 14°C' ye soğutulmuştur.
8. Kalıptaki tarak çekilmiş, çukurlara örnekler sıra ile yerleştirilmiştir.
9. Her bir çukurun üzerine önceden eritilen %1' lik LMP agarozdan yaklaşık 0,5 ml pipetlenerek elektroforez esnasında yüzmeleri önlenmiştir.
10. Agaroz katılaştıktan sonra jel, elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Elektroforez, CHEF Mapper XA (Bio-Rad) sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her elektroforez için atılım açısı (pulse angle) 120°, akım hızı 6 volt/cm (200V) , başlangıç atılım zamanı (initial pulse time) 5sn, bitiş atılım zamanı (final pulse time) 40sn olarak ayarlanmıştır. Parametreler girildikten sonra 19 saatlik yürütme işlemi başlatılmıştır.
11. Yürütme işleminin bitiminin ardından jel UV'de (BioLab) görüntülenerek fotoğrafı çekilmiştir.

Jel görüntülerinin istatistiksel analizi ve dendogram oluşturulması

Her bir izolatın oluşturduğu bant profili incelenmiş ve aynı profile sahip izolatlar ribotip ve pulstotip olarak gruplandırılmıştır. Daha sonra ribotip ve pulstotiplerin bant profilleri karşılaştırılarak benzerlik oranları SPSS V21.0 istatistiksel yazılım programı ile hesaplanmış ve dendogramlar oluşturulmuştur.

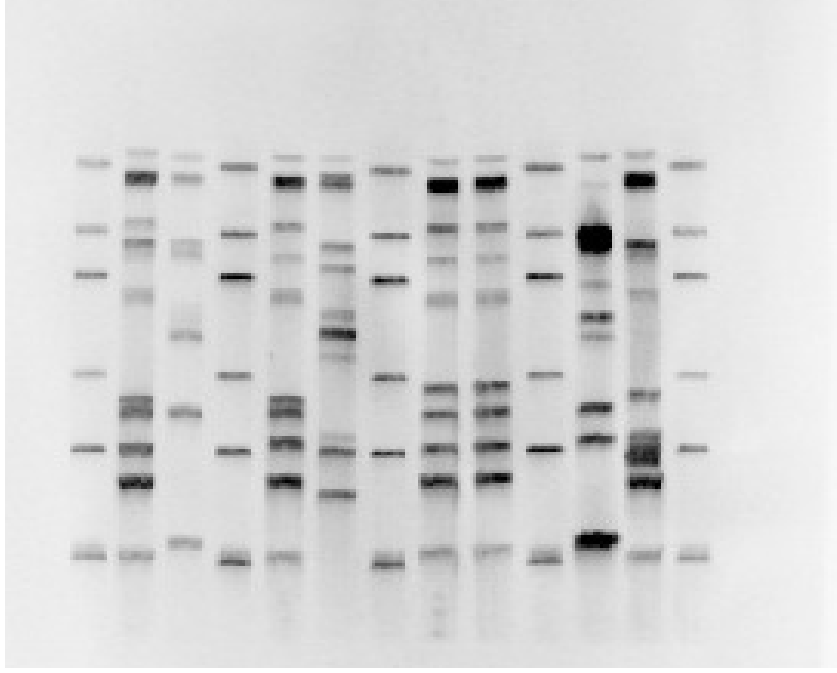
3. BULGULAR

3.1. *Staphylococcus aureus* İzolatları ve Ribotiplendirme

Bu çalışmada Afyon bölgesindeki 6 farklı yerleşim birimine ait 16 farklı çiftlikten toplanan süt örneklerinden izole edilmiş ve biyokimyasal testlerle *S. aureus* olduğu düşünülen 104 bakteri izolatu özellikle identifikasyon için öncelikli olarak ribotiplendirme testine tabi tutulmuştur. Ribotiplendirme ile 104 izolatu sadece 77 tanesi *S. aureus* olarak tanımlanmış ve sonraki aşamada PFGE analizine alınmıştır.

Analize alınan 104 izolatu 77'si *S. aureus*, bunun dışında kalan 27 izolatu ise 9 tanesi *Staphylococcus haemolyticus*, 3 tanesi *Staphylococcus pasteurii*, 3 tanesi *Enterococcus faecalis*, 3 tanesi *Hydrogenophaga flava*, 1 tanesi *Staphylococcus chromogenes*, 1 tanesi *Streptococcus pneumoniae*, 1 tanesi *Staphylococcus warneri*, 2 tanesi *Staphylococcus epidermidis*, 1 tanesi *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus*, 1 tanesi *Pseudomonas bathycetes* ve 1 tanesi de *Pseudomonas fluorescens* olarak tanımlanmıştır (Çizelge 3.3).

Otomatik ribotiplendirme sadece identifikasyon değil aynı zamanda test edilen izolatların ribogruplarını da belirlemiştir. *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesilmiş 1-50 kb büyüklüğünde, sayısı 7-12 arasında değişen fragmentlerden oluşan ribotip profilleri elde edilmiştir (Şekil 3.1). Ribogrup numaralandırmaları otomatik ribotiplendirme sistemi tarafından verilmiştir.

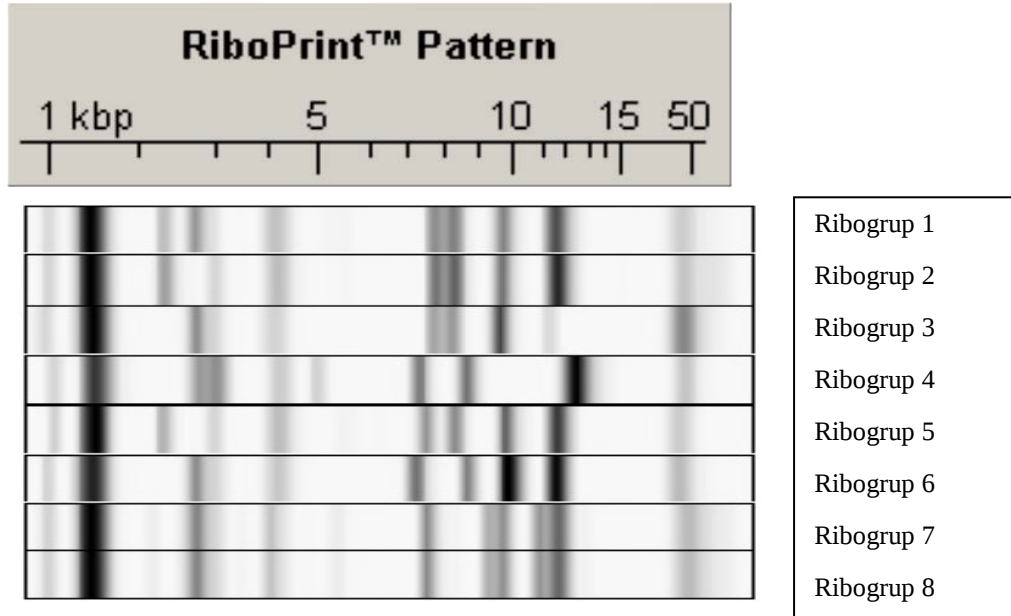


Şekil 3.1. Membran üzerine sabitlenmiş bant profilleri

Bu profiller sonucu 8 farklı ribogrup tespit edilmiştir (Şekil 3.2). A1 çiftliğinde ribogruplar 1-2-3-6-7-8; A2 çiftliğinde ribogrup 3; A3 çiftliğinde ribogruplar 1-2-3-7; B1 çiftliğinde ribogruplar 2-3-7; B2 çiftliğinde ribogrup 3; B3 çiftliğinde ribogruplar 6-8; C1 çiftliğinde ribogruplar 3-4-5-7; C2 çiftliğinde ribogruplar 3-7-8; D1 çiftliğinde ribogruplar 2-3-4-5-7; D2 çiftliğinde ribogruplar 1-7; D3 çiftliğinde ribogruplar 1-7; E1 çiftliğinde ribogruplar 1-2-3-5-7; E2 çiftliğinde ribogruplar 3-4-7; E3 çiftliğinde ribogrup 5; S1 çiftliğinde ribogrup 1-3; S2 çiftliğinde ribogruplar 1-3-7 tespit edilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. 16 farklı çiftlikte bulunan ribogruplar ve toplam izolat sayıları

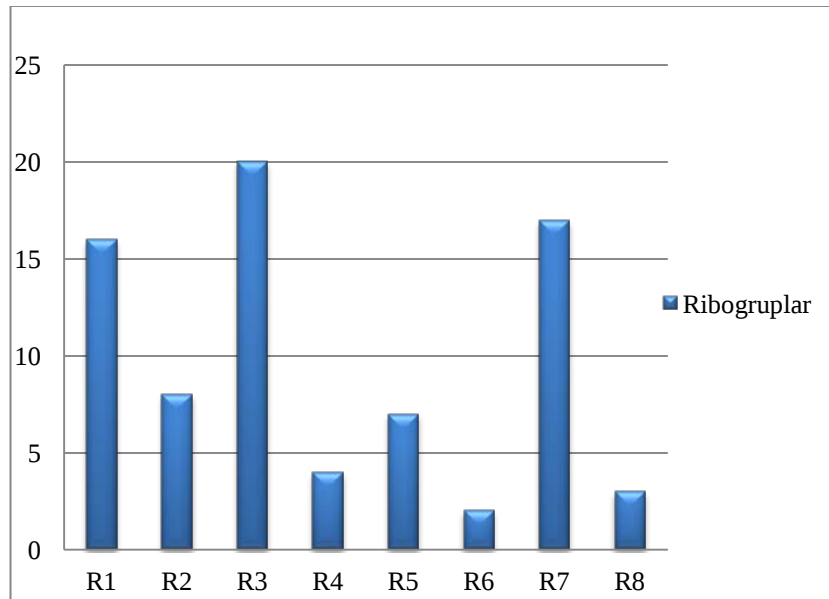
ÇİFTLİK	RİBOGRUPLAR	TOPLAM İZOLAT SAYISI
E1 (EMİRDAĞ 1)	R1, R2, R3, R5, R7	10
E2 (EMİRDAĞ 2)	R3, R4, R7	6
E3 (EMİRDAĞ 3)	R5	1
B1 (ÇAY 1)	R2, R3, R7	4
B2 (ÇAY 2)	R3	1
B3 (ÇAY 3)	R6, R8	2
C1 (ÇOBANLAR 1)	R3, R4, R5, R7	5
C2 (ÇOBANLAR 2)	R3, R7, R8	4
A1 (AFYON-MERKEZ 1)	R1, R2, R3, R6, R7, R8	9
A2 (AFYON-MERKEZ 2)	R3	4
A3 (AFYON-MERKEZ 3)	R1, R2, R3, R7	7
D1 (DİNAR 1)	R2, R3, R4, R5, R7	9
D2 (DİNAR 2)	R1, R7	3
D3 (DİNAR 3)	R1, R7	4
S1 (SALAR 1)	R1, R3	3
S2 (SALAR 2)	R1, R3, R7	5



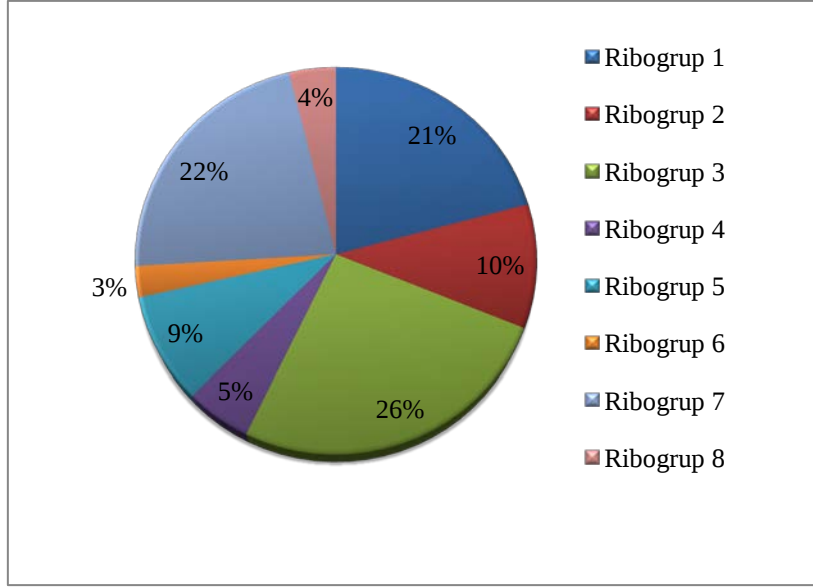
Şekil 3.2. Farklı çiftliklerdeki sığırların sütlerinden izole edilen *S. aureus* strainlerinin ribogrupları

Sonuç olarak 77 adet *S. aureus* strainlerinden 20'si ribogrup 3 (%26); 17'si ribogrup 7 (%22); 16'sı ribogrup 1 (%21); 8'i ribogrup 2 (%10); 7'si ribogrup 5 (%9); 4'ü ribogrup 4 (%5); 3'ü ribogrup 8 (%4); 2'si de ribogrup 6 (%3) olarak belirlenmiştir (Şekil 3.3, 3.4).

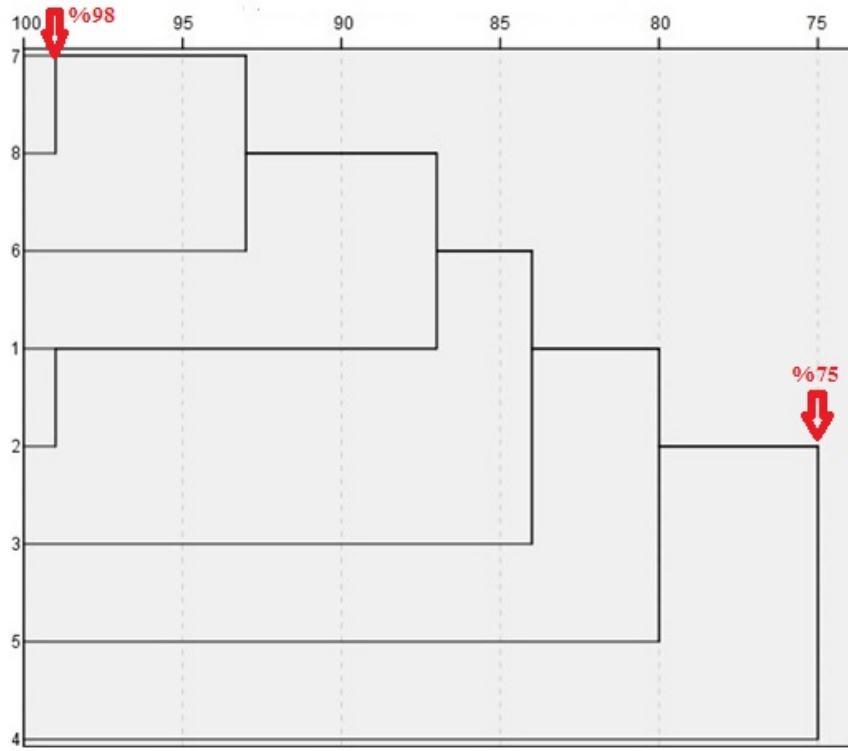
Otomatize ribotiplendirme sistemi Afyonkarahisar ilindeki çeşitli çiftliklerden gelen sığır sütü örneklerinde bulunan mastitis etmeni *S. aureus* izolatlarına ilk kez uygulanarak E3, B2 ve A2 çiftlikleri haricindeki tüm çiftliklerde mastitis etmeni bakterinin farklı ribogruplar içerdiği bulunmuştur. D2 ve D3 çiftliklerinde ise aynı ribogruba dahil izolatların bulunduğu belirlenmiştir. E3 çiftliğinde, B2 çiftliğinde ve A2 çiftliğinde tek tip ribogrup bulunması bu çiftlikteki mastitis olgularının aynı bakteri straini, D2 ve D3 çiftliklerinde aynı ribogrupların bulunması ise bu çiftliklerdeki mastitis olgularının ise aynı bakteri straini tarafından oluşturulduğuna işaret etmektedir (Çizelge 3.1).



Şekil 3.3. Ribogrupların içerdikleri izolat sayısına göre dağılım grafiği



Şekil 3.4. Ribogrupların içerdiği izolat sayısına göre yüzde (%) dağılım grafiği



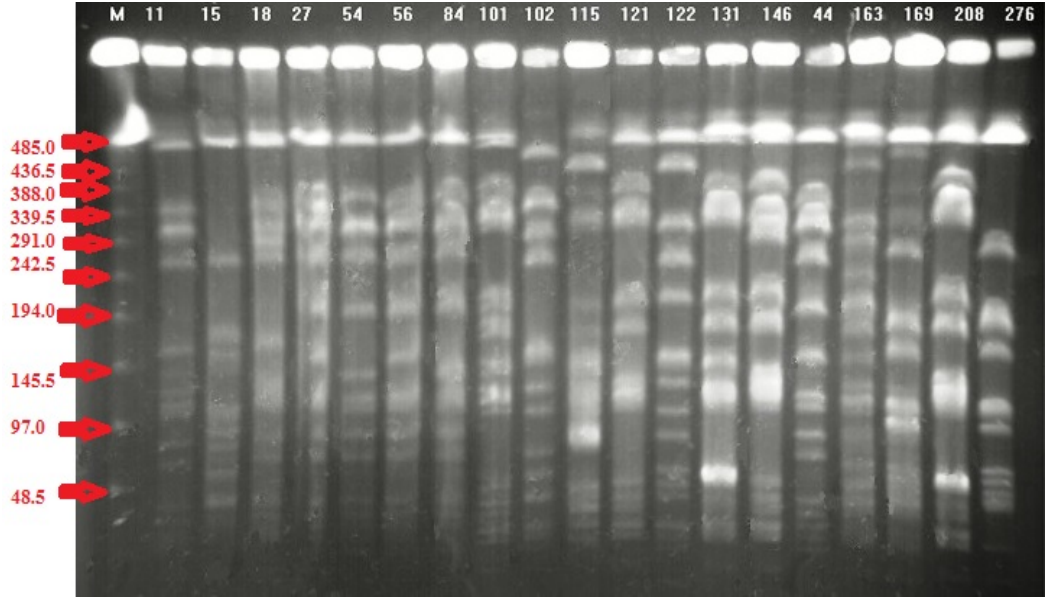
Şekil 3.5. *S. aureus* izolatlarından *EcoRI* enzimi ile elde edilen ribotiplere ait benzerlik dendogramı

Oluşan dendograma göre 7. ve 8. grup ile 1. ve 2. grubun birbirlerine yaklaşık %98 oranında benzer oldukları ve diğer tüm grupların birbirleriyle %75'in üzerinde benzer oldukları belirlenmiştir. Gruplar arası benzerlik yüzdesi Şekil 3.5'te görüldüğü gibidir.

3.2. Kromozomal DNA'nın Pulsed Field Jel Elektroforez (PFGE) ile Analizi

Ribotiplendirme ile *S. aureus* olarak tanımlanan 77 izolatın genotipik benzerlikleri PFGE analiz yöntemi ile *Sma*I enzimi kullanılarak araştırılmış ve elektroforez sonucunda kromozomal DNA'nın *Sma*I enzimi kesimi ile 48,5 ile 485 kb boyutları arasında, sayıları 17 ile 23 arasında değişen makrorestriksiyon fragmentleri elde edilmiştir (Şekil 3.8). Aynı profile sahip izolatlar aynı pulsotip olarak değerlendirilmiş ve 19 farklı pulsotip belirlenmiştir (G1- G19).

E1 çiftliğinde pulsotip G1, G2, G3, G4, G5, G7, G15, G19; E2 çiftliğinde pulsotip G5, G6, G7, G11, G19; E3 çiftliğinde pulsotip G11; C1 çiftliğinde pulsotip G10, G11, G12; C2 çiftliğinde pulsotip G11, G13; B1 çiftliğinde pulsotip G11; B2 çiftliğinde pulsotip G11; B3 çiftliğinde pulsotip G8, G9; A1 çiftliğinde pulsotip G11, G14, G16, G17, G19; A2 çiftliğinde pulsotip G11; D1 çiftliğinde pulsotip G11, D2 çiftliğinde pulsotip G11, G19; S1 çiftliğinde pulsotip G11, G19; S2 çiftliğinde pulsotip G11, G19 görülmüştür. En fazla pulsotip dağılımının E1 çiftliğinde olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.2).

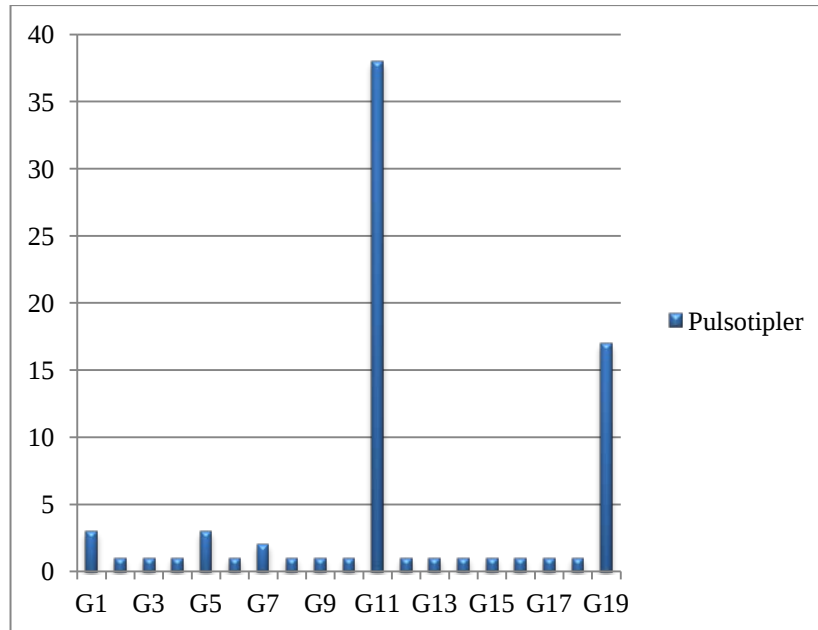


Şekil 3.6. Test edilen *S. aureus* izolatlarının grup temsilcilerine ait PFGE profilleri. M: Marker
11: G1; 15: G2; 18: G3; 27: G4; 54: G5; 56: G6; 84: G7; 101: G8; 102: G9; 115: G10;
121: G11; 122: G12; 131: G13; 146: G14; 44: G15; 163: G16; 169: G17; 208: G18;
276: G19

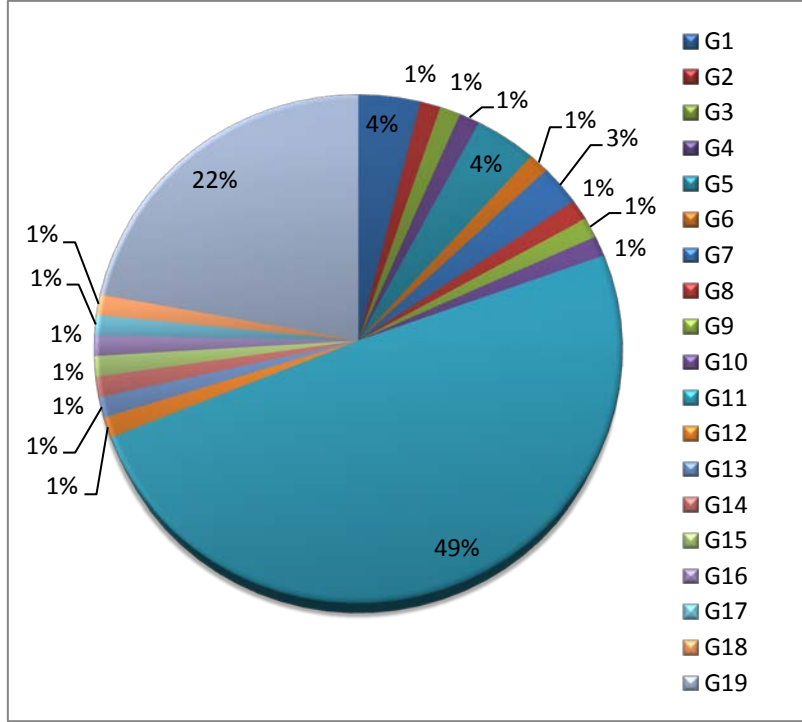
77 *S. aureus* izolatının 38'i pulsotip G11 (%49); 17'si pulsotip G19 (%22); 3'ü pulsotip G1 (%4); 3'ü pulsotip G5 (%4); 2'si pulsotip G7 (%3); 1'i pulsotip G2 (%1); 1'i pulsotip G3 (%1); 1'i pulsotip G4 (%1); 1'i pulsotip G6 (%1); 1'i pulsotip G8 (%1); 1'i pulsotip G9 (%1); 1'i pulsotip G10 (%1); 1'i pulsotip G12 (%1); 1'i pulsotip G13 (%1); 1'i pulsotip G14 (%1); 1'i pulsotip G15 (%1); 1'i pulsotip G16 (%1); 1'i pulsotip G17 (%1); 1'i pulsotip G18 (%1) olarak belirlenmiştir (Şekil 3.6, 3.7).

Çizelge 3.2. 16 farklı çiftlikte bulunan pulsotipler ve toplam izolat sayıları

ÇİFTLİK	PULSOTİPLER	TOPLAM İZOLAT SAYISI
E1 (EMİRDAĞ 1)	G1, G2, G3, G4, G5, G7, G15, G19	10
E2 (EMİRDAĞ 2)	G5, G6, G7, G11, G19	6
E3 (EMİRDAĞ 3)	G11	1
B1 (ÇAY 1)	G11	4
B2 (ÇAY 2)	G19	1
B3 (ÇAY 3)	G8, G9	2
C1 (ÇOBANLAR 1)	G10, G11, G12	5
C2 (ÇOBANLAR 2)	G11, G13	4
A1 (AFYON-MERKEZ 1)	G11, G14, G16, G17, G19	9
A2 (AFYON-MERKEZ 2)	G11	4
A3 (AFYON-MERKEZ 3)	G11, G18, G19	7
D1 (DİNAR 1)	G11	9
D2 (DİNAR 2)	G11, G19	3
D3 (DİNAR 3)	G11, G19	4
S1 (SALAR 1)	G11, G19	3
S2 (SALAR 2)	G11, G19	5



Şekil 3.7. Pulsotiplerin içerdikleri izolat sayısına göre dağılım grafiği



Şekil 3.8. Pulsotiplerin içerdikleri izolat sayısına göre yüzde (%) dağılım grafiği

Pulsotipler arasındaki farklı fragment sayıları Tenover ve ark. (1995) kriterlerine göre değerlendirildiğinde; G5 ve G6 grupları arasında 2 bant farkı görülerek birbirleriyle en yakın genetik ilişkide oldukları saptanmıştır. G4 ve G7 grupları ile G14 ve G18 grupları arasında 3 bant farkı, G8 ve G11 grupları arasında 4 bant farkı, G3 ve G5 grupları arasında 5 bant farkı, G4-G5-G6-G7 grupları arasında 6 bant farkı, G4 ve G5 grupları arasında ise 7 bant farkı gözlenmiştir. Buna göre; G5-G6; G4-G7 ve G14-G18 gruplarında yer alan izolatlar birbirleriyle yakın ilişkilidir. G8-G11; G3-G5 ve G4-G5-G6-G7 grupları birbirleriyle olası ilişkili; G4-G5 ve geriye kalan diğer tüm grupların ise birbirleriyle ilişkisiz oldukları söylenebilir.



Şekil 3.9. *S. aureus* izolatlarından *SmaI* enzimi ile elde edilen pulsotiplere ait benzerlik dendogramı

Pulsotiplerin benzerlik oranı cluster analizi ile bir dendogramda gösterilmiştir (Şekil 3.9). Dendogramdan elde edilen verilere göre 5. ve 6. pulsotipler ile 4. ve 7. pulsotipler birbirleriyle yaklaşık %98 oranında benzer, 14. ve 18. pulsotipler ile 8. ve 11. pulsotipler birbirleriyle yaklaşık %97 oranında, diğer tüm grupların birbirleriyle %75 oranında benzer oldukları bulunmuş ve bu veriler doğrultusunda Tenover ve ark. (1995) kriterleri yorumları desteklenmiştir.

Afyonkarahisar ili merkez ve çevre ilçelerinden 6 farklı yerleşim biriminde bulunan 16 farklı süt çiftliğinden toplanan sütlerden izole edilen toplamda 104 izolatın ribotiplendirme ve PFGE ile belirlenen özellikleri Çizelge 3.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. Toplamda 104 adet izolata ait identifikasyon, kaynak, ribogrup ve pulsotipler

İzolat No	Ribotiplendirme Id	Benzerlik	Çiftlik	Ribogrup	Pulsotip
6	<i>S.aureus</i>	0.80	E1	1	G1
9	<i>S.aureus</i>	0.94	E1	1	G19
11	<i>S.aureus</i>	0.88	E1	2	G1
15	<i>S.aureus</i>	0.71	E1	3	G2
16	<i>S.haemolyticus</i>	0.88		6	
18	<i>S.aureus</i>	0.94	E1	2	G3
22	<i>S.aureus</i>	0.77	E1	1	G1
26	<i>S.pasteuri</i>	0.91		4	
27	<i>S.aureus</i>	0.89	E1	5	G4
29	<i>Enterococcus faecalis</i>	0.64		4	
30	<i>S.pasteuri</i>	0.86		5	
34	<i>S.pasteuri</i>	0.90		1	
42	<i>S.haemolyticus</i>	0.90		6	
44	<i>S.aureus</i>	0.90	E1	5	G15
45	<i>S.haemolyticus</i>	0.93		2	
46	<i>S.chromogenes</i>	0.89		7	
48	<i>S.haemolyticus</i>	0.79		1	
49	<i>S.aureus</i>	0.89	E1	7	G7
50	<i>S.aureus</i>	0.82	E1	1	G5
51	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0.57		2	
53	<i>S.haemolyticus</i>	0.88		6	
54	<i>S.aureus</i>	0.84	E2	7	G5
55	<i>S.aureus</i>	0.77	E2	3	G5
56	<i>S.aureus</i>	0.78	E2	4	G6
58	<i>S.aureus</i>	0.91	E2	3	G11
60	<i>S.aureus</i>	0.93	E2	4	G19
67	<i>S.warneri</i>	0.92		8	
84	<i>S.aureus</i>	0.85	E2	7	G7
85	<i>S.aureus</i>	0.90	E3	5	G11
92	<i>S.aureus</i>	0.96	B1	7	G11
94	<i>S.aureus</i>	0.93	B1	7	G11
96	<i>S.aureus</i>	0.86	B1	3	G11
97	<i>S.aureus</i>	0.77	B1	2	G11
98	<i>S.aureus</i>	0.89	B2	3	G19
101	<i>S.aureus</i>	0.79	B3	8	G8
102	<i>S.aureus</i>	0.94	B3	6	G9
107	<i>S.haemolyticus</i>	0.94		5	

Çizelge 3.3. (Devam) Toplamda 104 adet izolata ait identifikasyon, kaynak, ribogrup ve pulsotipler

İzolot No	Ribotiplendirme Id	Benzerlik	Çiftlik	Ribogrup	Pulsotip
108	<i>S.haemolyticus</i>	0.81		2	
109	<i>S.haemolyticus</i>	0.95		5	
110	<i>S.epidermidis</i>	0.67		4	
113	<i>S.haemolyticus</i>	0.87		6	
114	<i>S.epidermidis</i>	0.66		4	
115	<i>S.aureus</i>	0.64	C1	4	G10
118	<i>S.aureus</i>	0.94	C1	7	G11
120	<i>S.aureus</i>	0.87	C1	3	G11
121	<i>S.aureus</i>	0.95	C1	7	G11
122	<i>S.aureus</i>	0.84	C1	5	G12
128	<i>S.aureus</i>	0.92	C2	7	G11
131	<i>S.aureus</i>	0.87	C2	3	G13
132	<i>S.aureus</i>	0.93	C2	7	G11
138	<i>S.aureus</i>	0.83	C2	8	G11
142	<i>S.aureus</i>	0.92	A1	7	G11
143	<i>S.aureus</i>	0.74	A1	2	G11
144	<i>S.aureus</i>	0.97	A1	6	G11
146	<i>S.aureus</i>	0.84	A1	8	G14
156	<i>S.aureus</i>	0.90	A1	3	G11
163	<i>S.aureus</i>	0.61	A1	2	G16
169	<i>S.aureus</i>	0.87	A1	1	G17
173	<i>Enterococcus faecalis</i>	0.67		2	
178	<i>Enterococcus faecalis</i>	0.63		5	
181	<i>S.aureus</i>	0.86	A1	1	G19
185	<i>S.aureus</i>	0.79	A1	3	G11
190	<i>S.aureus</i>	0.83	A2	3	G11
191	<i>S.aureus</i>	0.88	A2	3	G11
193	<i>S.aureus</i>	0.82	A2	3	G11
194	<i>S.aureus</i>	0.88	A2	3	G11
195	<i>S.aureus</i>	0.84	A3	3	G11
197	<i>Hydrogenopha flava</i>	0.60		2	
205	<i>S.aureus</i>	0.93	A3	1	G19
208	<i>S.aureus</i>	0.74	A3	2	G18
210	<i>S.aureus</i>	0.96	A3	1	G19
211	<i>S.aureus</i>	0.80	A3	2	G11
212	<i>Hydrogenopha flava</i>	0.77		4	
218	<i>Hydrogenopha flava</i>	0.62		5	
220	<i>S.aureus</i>	0.88	A3	3	G11

Çizelge 3.3. (Devam) Toplamda 104 adet izolata ait identifikasyon, kaynak, ribogrup ve pulstotipler

İzolot No	Ribotiplendirme Id	Benzerlik	Çiftlik	Ribogrup	Pulstotip
224	<i>S.aureus</i>	0.90	A3	7	G19
225	<i>S.aureus</i>	0.85	D1	3	G11
228	<i>S.aureus</i>	0.87	D1	4	G11
231	<i>S.aureus</i>	0.91	D1	7	G11
232	<i>S.aureus</i>	0.86	D1	5	G11
233	<i>S.aureus</i>	0.89	D1	3	G11
234	<i>S.aureus</i>	0.88	D1	5	G11
235	<i>S.hominis</i> <i>subsp.novobiosepticus</i>	0.66		2	
240	<i>S.aureus</i>	0.79	D1	2	G11
243	<i>S.aureus</i>	0.94	D1	7	G11
244	<i>S.aureus</i>	0.86	D1	5	G11
246	<i>Pseudomonas</i> <i>bathycetes</i>	0.55		7	
249	<i>S.aureus</i>	0.96	D2	1	G19
253	<i>S.aureus</i>	0.95	D2	7	G11
254	<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i>	0.44		8	
262	<i>S.aureus</i>	0.94	D2	1	G19
264	<i>S.aureus</i>	0.97	D3	1	G19
272	<i>S.aureus</i>	0.95	D3	7	G11
273	<i>S.aureus</i>	0.93	D3	1	G19
274	<i>S.aureus</i>	0.94	D3	7	G11
276	<i>S.aureus</i>	0.95	S1	1	G19
279	<i>s.aureus</i>	0.93	S1	3	G19
283	<i>S.aureus</i>	0.90	S1	3	G19
287	<i>S.aureus</i>	0.83	S2	7	G11
288	<i>S.aureus</i>	0.96	S2	1	G19
289	<i>S.aureus</i>	0.94	S2	1	G19
292	<i>S.aureus</i>	0.96	S2	1	G19
299	<i>S.aureus</i>	0.91	S2	3	G19

4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Mastitis, süt endüstrisi için süt üretimini azaltması, ürünün maliyetini arttırması ve sütün kalitesini düşürmesi nedeniyle üreticinin kazancında önemli bir gider, ana bir kaygıdır (Dendani ve ark. 2010; Yıldız 2003). Mastitisin erken tespiti süt üretiminde kalitenin artırılması, sütçülük çiftliklerinde ekonomik kayıpların giderilmesini ve hayvan refahının korunmasını sağlamak amacıyla büyük önem arz etmektedir (Memmedova, 2012).

Türkiye, süt sığırları üretimi açısından dünyanın önde gelen ülkelerinden olup, 2012 verileri Çizelge 4.1, Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3'te görüldüğü gibidir (Tarım Bakanlığı, HAYGEM 2013).

Çizelge 4.1. Türkiye geneli büyükbaş hayvan sayıları 2002-2012 verileri (Tarım Bakanlığı, HAYGEM 2013)

BÜYÜKBAŞ HAYVAN SAYILARI			
YIL	SIĞIR	MANDA	BÜYÜKBAŞ TOPLAM
2002	9.803.498	121.077	9.924.575
2003	9.788.102	113.356	9.901.458
2004	10.069.346	103.900	10.173.246
2005	10.526.440	104.965	10.631.405
2006	10.871.364	100.516	10.971.880
2007	11.036.753	84.705	11.121.458
2008	10.859.942	86.297	10.946.239
2009	10.723.958	87.207	10.811.165
2010	11.369.800	84.726	11.454.526
2011	12.386.337	97.632	12.483.969
2012	13.914.912	107.435	14.022.347

Çizelge 4.2. Türkiye geneli sağılan hayvan sayıları 2002-2012 verileri (Tarım Bakanlığı, HAYGEM 2013)

SAĞILAN HAYVAN SAYISI (Baş)					
YIL	SIĞIR	KOYUN	KEÇİ	MANDA	TOPLAM
2002	4.392.568	13.637.193	3.553.438	51.626	21.634.825
2003	5.040.362	12.477.217	3.126.656	57.378	20.701.613
2004	3.875.722	9.919.191	2.476.574	39.362	16.310.848
2005	3.998.097	10.166.091	2.426.993	38.205	16.629.386
2006	4.187.931	10.245.894	2.420.642	36.353	16.890.820
2007	4.229.440	10.109.987	2.263.630	30.460	16.633.517
2008	4.080.243	9.642.170	1.997.689	32.610	15.751.542
2009	4.133.148	9.407.866	1.830.814	32.361	15.404.189
2010	4.384.130	10.583.608	2.582.539	35.726	17.563.350
2011	4.761.142	11.561.144	3.033.111	40.218	19.395.615
2012	5.431.400	13.068.428	3.502.272	38.205	5.431.400

Çizelge 4.3. Türkiye geneli sağılan hayvanlardan elde edilen süt miktarları 2002-2012 verileri (Tarım Bakanlığı, HAYGEM 2013)

SÜT ÜRETİMİ (Ton)					
YIL	SIĞIR	KOYUN	KEÇİ	MANDA	TOPLAM
2002	7.490.634	657.388	209.621	50.921	8.408.568
2003	9.514.138	769.959	278.136	48.778	10.611.011
2004	9.609.326	771.715	259.087	39.279	10.679.407
2005	10.026.202	789.878	253.759	38.058	11.107.897
2006	10.867.302	794.681	253.759	36.358	11.952.100
2007	11.279.340	782.587	237.487	30.375	12.329.789
2008	11.255.176	746.872	209.570	31.422	12.243.040
2009	11.583.313	734.219	192.210	32.443	12.542.186
2010	12.418.544	816.832	272.811	35.487	13.543.674
2011	13.802.428	892.822	320.588	40.372	15.056.211
2012	15.977.838	1.007.007	369.426	46.989	17.401.262

Tablolardaki verilere göre Türkiye’de her geçen yıl sığır sayısında, sığır sağım sayısında ve üretilen süt miktarında artış gözlemlenmektedir.

Çalışmamızdaki izolatların toplandığı bölge olan Afyonkarahisar ili ise 2007-2012 yılları arasındaki verilere göre sığır sayısı ve süt üretim miktarı ile önemli bir ilimizdir (Tarım Bakanlığı-Afyonkarahisar, 2013). Bu veriler doğrultusunda Türkiye genelinde ve süt-kaymak endüstrisinin yoğun olduğu Afyonkarahisar ilinde sığırlarda görülen mastitis vakaları teşhis ve tedavisi önem kazanmaktadır.

Çizelge 4.4. Afyonkarahisar ili 2007-2012 yılları arası sığır sayıları (Tarım Bakanlığı-Afyonkarahisar, 2013)

Hayvan Cinsi	YILLAR					
	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Sığır	283,42	275,359	285,681	270,703	288,003	299,103

Çizelge 4.5. Afyonkarahisar ili 2007-2012 yılları arası süt üretim miktarları (Tarım Bakanlığı-Afyonkarahisar, 2013)

Ürün Cinsi	YILLAR					
	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Süt (Ton)	357,109	346,952	363,273	390,566	415,983	552,609

Mastitis, hazırlayıcı birçok etkenin yanısıra bakteriler, mantarlar, algler ve virüsler gibi birçok mikroorganizmalar tarafından oluşturulmaktadır fakat çoğunlukla bakteri kaynaklıdır (Hillerton, 2000). Polimikrobiyal etiolojiye sahip olan mastitise yol açan 100'ün üzerinde mikroorganizma olduğu bilinmekte ve bunlar çevrede, ineğin kıllarında, derisinde ve meme kanallarında bulunmaktadır. Enfeksiyona yol açan mikroorganizmaların yaklaşık %95'ini *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* ve *Escherichia coli*, %5'ini ise diğer mikroorganizmalar oluşturmaktadır (Atasever ve ark., 2008).

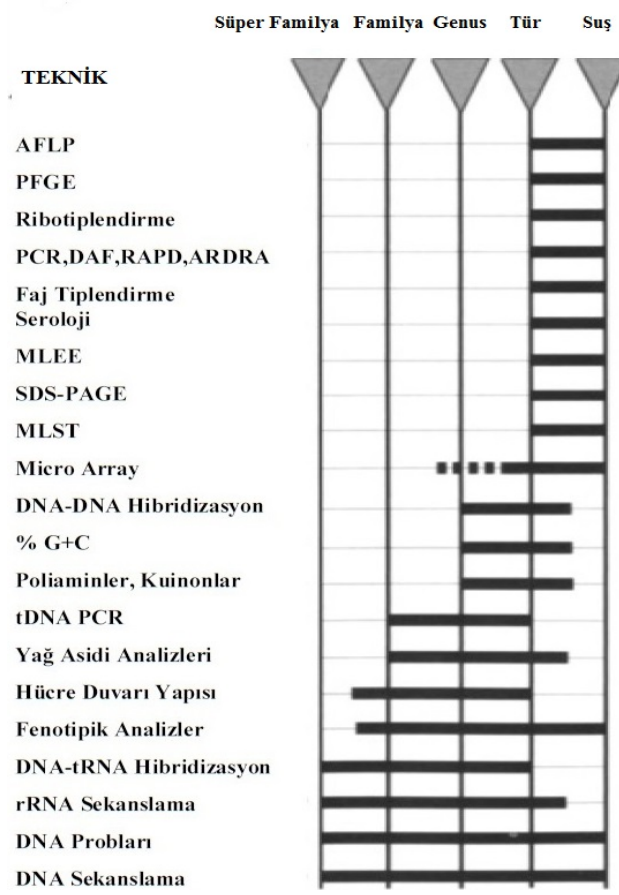
Bir çalışmada Yıldız (2003); subklinik mastitislerde 43 adet (%39.45) *S. aureus*, 25 adet (%22.94) *S. epidermidis*, 18 adet (%16.51) identifikasyonu yapılamayan *Staphylococcus* türleri, 6 adet (%5.50) *Corynebacterium pyogenes*, 5 adet (%4.59) *Str. agalactiae* ve 12 adet (%11.01) bakteri izole edilmeyen meme lobu belirlenirken, klinik mastitisli süt örneklerinde, 6 adet (%31.58) *S. aureus*, 5

adet (%26.32) *S. epidermidis*, 3 adet (%15.78) identifikasyonu yapılamayan *Staphylococcus* türleri, 2 adet (%10.53) *E. coli*, 1 adet (%5.26) *Str. agalactiae* ve 2 adet (%10.53) bakteri izole edilemeyen meme lobu belirlemiştir. Tedaviye yanıt ve iyileşme oranlarında stafilokok türlerinin diğerlerine göre daha düşük kaldığını gözlemlemiştir.

Staphylococcus aureus en yaygın görülen kronik mastitis tiplerine neden olan bakteridir. Bazı sığırlar buzağılamadan sonra klinik mastitise yakalansa da enfeksiyon genelde subklinik ve süte ya da memede fark edilebilir değişiklikler olmadan somatik hücre sayısında artışlara neden olur. Bakteri, enfekte olmuş sığırın meme bezlerine, süt kanallarına ve memelerdeki lezyonlarına yerleşir ve bulaşıcıdır. Enfeksiyon, kontamine olmuş *S. aureus* bakterisinin enfekte olmuş bir salgı meme bezinden süt sağım zamanı enfekte olmamış bir başka salgı meme bezine bulaşır ve bakteri süt kanalına penetre olur. Bir kere yerleşmiş olan *S. aureus* enfeksiyonu antibiyotik tedavisine cevap vermez ve enfekte sığırlar sürüden uzaklaştırılmak zorundadır (Petersson-Wolfe, 2010).

En önemli *S. aureus* rezervlerinden biri meme yapıları olsa da sığırın meme dışı bölgelerinde de bakteriye rastlanmıştır (Mork ve ark., 2012). Bu nedenlerle geçmişten günümüze kadar mastitisin tedavisi, ortadan kaldırılması ve koruma-kontrolü ile ilgili bir çok araştırma yapılmıştır. Ancak, mastitisin etiyolojisinde çok sayıda faktörün rol oynamasından dolayı bu hastalığı yok etmek mümkün olmamıştır. Bu açıdan hastalıktan kaynaklı zararları en aza indirmek amaç edinilmiştir (Rişvanlı, 2001).

S. aureus strainlerinin epidemiyolojik olarak tanımlanması ile kaynağı belirlenmiş olan mastitis hastalığının tedavisi gerçekleştirilebilir ve kalitesi yüksek, insan sağlığına elverişli sütler elde edilebilir. Kullanılabilecek ideal tiplendirme yöntemlerinin; ayırım gücü yüksek, tekrarlanabilir, kolay uygulanabilir, sonuçları kolay yorumlanabilir, bilgisayara bağlı analiz ve veri tabanları ile uyumlu ve çok kompleks yapıda olmaması gibi özelliklere sahip olmaları gerekmektedir (Kıran 2011; Dijkshoorn ve ark. 2000). Tiplendirmede kullanılan bazı yöntemlerin karşılaştırılması Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Moleküler ve fenotipik tiplendirme yöntemlerinin taksonomik ayırım güçleri (Kıran, 2011)

Ribotiplendirme bakterileri rRNA'daki farklılıklarına dayalı olarak, tür kategorisinin ötesinde direkt cins seviyesinde tanımlamaya ve sınıflandırmaya dayanan bir metottur. Hassas bir yöntem olan 16S rRNA'ya dayalı otomatize ribotiplendirme yöntemi kullanımı yaygınlaştırılarak cins ve tür seviyesinde kesin parmak izlerinin (fingerprint) elde edilmesi sağlanabilir. Bu teknik diğerler tekniklerin eksik yönleri kısmen de olsa gidermeyi amaçlamaktadır. Değişken fenotipik karakterlerin güvenilir sonuç vermemesi, RFLP analizlerinde çok fazla sayıda oluşan bant sayısı nedeniyle yorumlamada karşılaşılan güçlükler, hibridizasyon tekniklerinde kullanılan spesifik ve işaretli problemlerin sadece belli ve çok küçük bir sekansa yönelik olması böylece sınırlayıcı rolde kalması gibi nedenler zayıf yönleri oluşturmaktadır.

Bakterilerde bulunan rRNA dizilişlerinin pek çoğu evrimsel süreçte çok az değişikliğe uğramışlardır ve bütün bakterilerde çok fazla miktarda bulunmaktadır. Ribotiplendirme, rRNA için hazırlanan işaretli ve spesifik problemlerin hibridizasyon sırasında rRNA genleri ile kolayca birleşmesi ve bunların otoradyografi veya diğer tekniklerle ortaya konduğu bir tekniktir. Bu sebeple rRNA dizilişleri için spesifik problemler benzer rRNA dizilişine sahip çeşitli bakterileri tayin edebilir. *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesilen kromozomal DNA fragmentleri boyutlarına göre ayrılıp, işaretli rRNA problemleri ile hibridize olmaktadır. Bilgisayar ortamında *S. aureus* bakterisine ait kayıtlı referans marker fragmenti ile izolattan elde edilen fragment karşılaştırılarak izolatin ribotipi belirlenebilmektedir (Sarıkaya 2004; Çakır 2007; Gülbandılar 2006).

Türkiye’de mastitis hastalığına yakalanmış sığırların sütlerinden izole edilen *S. aureus* bakterisinin genotipik analizleri için yapılan çalışmalarda PFGE yöntemi kullanılmıştır (Ünal ve İstanbulluoğlu 2009; Aydın ve ark. 2011). Ribotiplendirme metodu ile ve Ribotiplendirme-PFGE kombinasyonu bir çalışma ile ilk olarak bu araştırmada yapılmıştır. Pulsed field jel elektroforezi ile mastitisli sütlerden izole edilen *S. aureus* için Türkiye genelinde yapılan tiplendirme çalışmaları bulunmasına karşın Afyonkarahisar ili ve çevre ilçelerinde PFGE metodu ile yapılan herhangi bir epidemiyolojik çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada Afyonkarahisar bölgesinde altı farklı yerleşim birimindeki bulunan 16 farklı çiftlikten CMT-pozitif bulunan mastitisli sığır sütlerinden izole edilen ve geleneksel identifikasyon testleri yapılarak tarafımıza ulaştırılmış bakteriler ribotiplendirme ve PFGE teknikleri ile genotiplendirme çalışmalarına alınmışlardır.

Çalışmamızda izolatlarımızı temin ettiğimiz Kenar ve ark. (2012) Orta Batı Anadolu’da bulunan 18 özel çiftlikte 423 süt veren inekten toplamda 572 California Mastitis Testi (CMT) pozitif süt örneklerini toplamışlardır. Koagülaz negatif stafilokoklar ve CNS türlerinin identifikasyonunu konvensiyonel biyokimyasal tekniklerle ve API Staph testi ile gerçekleştirmişlerdir. Slime oluşumunu Kongo Red Agar (CRA) metodu ile saptamışlardır. Antibiyotik duyarlılığını National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) kılavuzuna göre belirlemişlerdir. CMT pozitif süt örneklerinden toplamda 67

(%11,7) koagülaz negatif stafilokok (CNS) izole etmişlerdir. Toplamda, 11 CNS türü olarak *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. chromogenes*, *S. caprae*, *S. xylosus*, *S. haemolyticus*, *S. hyicus*, *S. cohnii* ve *S. capitis* bakterilerini tanımlamışlardır. En çok rastlanan CNS türlerinin *Staphylococcus epidermidis* (%26,8) ve *Staphylococcus simulans* (%20,8) olduğunu, onları *Staphylococcus warneri*'nin (%14,9) takip ettiğini saptamışlardır. 67 CNS izolatu haricinde, slime oluşumunu 37 (%55,2) CNS strainlerinde bulmuşlardır. CNS izolatlarının en çok trimetoprim+sülfametoksazol (%76,2), eritromisin (%73,2), oksasilin ve ampisilin (%70,2), penisilin (%58,3), gentamisin (%53,8), tetrasiklin (%52,3), vankomisin (%51,8), siprofloksasin (%26,9), sefoksitim (%23,9) ve sefalotin (%13,5) antibiyotiklerine duyarlı olduklarını belirtmişlerdir. Bu sonuçlar ile Türkiye'nin Orta Batı'sında mastitisten korunma ve tedavide yoğun bir şekilde kullanılan beta-laktam antibiyotiklerine karşı CNS türlerinin herhangi bir antibiyotik duyarlılık testi olmadan yüksek oranda dirençlilik gösterdiklerini bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda ise bu sütlerden izole edilmiş 104 adet bakteri kullanılmıştır. Bu 104 izolatın 77'si *Staphylococcus aureus*, kalan 27 izolat ise; *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus pasteurii*, *Enterococcus faecalis*, *Hydrogenophaga flava*, *Staphylococcus chromogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis* subsp. *novobioceticus*, *Pseudomonas bathycetes* ve *Pseudomonas fluorescens* olarak tanımlanmıştır. *S. aureus* olarak tanımlanan strainler benzer bant profilleri vererek 8 farklı ribogrup oluşturmuşlardır. En fazla izolat içeren ribogruplar; ribogrup 3: %26 (20 strain), ribogrup 7: %22 (17 strain), ribogrup 1: %21 (16 strain) ve ribogrup 2: %10 (8 strain) olup, diğer ribogrupların izolat sayısı daha azdır. Bazı çiftliklerde ribogrupların lokalize olmadıkları, bir çiftlikte birden fazla ribogrup olduğu gözlemlenirken bazı çiftliklerde ise (E3, B2, A2, D2-D3) sadece bir ribogruba ait izolatların bulunduğu gözlemlenmiştir. Ribogrupların benzerlik oranına göre 1. ve 2. grup ile 7. ve 8. grupların birbirleri ile yaklaşık %98 oranında benzer oldukları ve diğer tüm grupların birbirleriyle %75'in üzerinde benzer oldukları belirlenmiştir. E3 çiftliğinde, B2 çiftliğinde ve A2 çiftliğinde tek tip ribogrup bulunması bu çiftlikteki mastitis olgularının aynı

bakteri straini, D2 ve D3 çiftliklerinde aynı ribogrupların bulunması ise bu çiftliklerdeki mastitis olgularının ise aynı bakteri straini tarafından oluşturulduğuna işaret etmektedir.

Buzzola ve ark. (2001) Arjantin’de moleküler epidemiyolojik analizleri için 21 bölgeden 112 *S. aureus* izolatu toplamışlardır. İzolatlara *Sma*I pulsed field jel elektroforezi (PFGE), otomatik *Eco*RI ribotiplendirme ve plazmid DNA profillerinin restriksiyon enzim analizi (REAP) yöntemlerini uygulamışlardır. PFGE analizleri sonucunda dört gruba dağılmış toplamda 22 bant profili, otomatik ribotiplendirme ile de 112 izolattan 13 ribotip elde etmişlerdir. PFGE genotipleri ve ribotipler arasında belirgin bir uyuşma yakalayan araştırmacılar bu ayrım gücünü her iki metodu birlikte kullanarak elde etmişlerdir.

Zhang ve ark. (2012) Çin’de domuz tonsilleri ve sığır sütlerinden izole ettikleri *Staphylococcus aureus* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık paternlerini ve ribotiplerini karşılaştıran bir çalışma yapmışlardır. 42’si domuz tonsillerinden, 48’i sığır sütlerinden olmak üzere toplamda 90 *S. aureus* izolatu çalışmışlardır. Antimikrobiyal duyarlılık testleri için broth mikrodilüsyon metodu ve çift diskli sinerji testi (D testi) kullanmışlardır. İzolatları Riboprinter sistemi ile tiplendirmişler ve toplamda 35 farklı ribogrup elde etmişlerdir. Domuz strainlerinin %83,3’ü 0,84 benzerlik katsayısı ile grup 1’e ait, süt strainlerinin %68,8’i arasında yüksek bir derecede spesifik baskınlık gösteren 3 ana grup gözlemlemişlerdir.

Gülbandılar (2006) Kütahya bölgesindeki gıda örneklerinden, gıda çalışanlarından, gıda alet-ekipmanlarından ve klinik örneklerden 106 adet *S. aureus* bakterisi izole ederek karakterize etmiş ve tiplendirme yöntemleri ile aynı yerdeki kaynak ve izolatlar arasında akrabalık ilişkilerini araştırmıştır. İdentifikasyon için geleneksel biyokimyasal testler ve VITEK sistemini, fenotiplendirme için antibiyotik duyarlılık testlerini, SET-RPLA test kiti ile enterotoksin belirleme testi, SDS-PAGE ile toplam hücre proteinlerinin analizi ve FAME analizleri, genotiplendirme için ise *Sma*I restriksiyon enzimi ile PFGE ve *Eco*RI restriksiyon enzimi ile otomatik ribotiplendirme yöntemlerini kullanmıştır. PFGE ve ribotiplendirme ile genotiplendirme çalışmalarında sırasıyla 9 pulsotip ve 7 ribogrup belirlemiş ve bu yöntemlerin özellikle aynı kaynaklardan izole

edilen *S. aureus* genotiplerinin belirlenmesinde ve enfeksiyon yollarının izlenmesinde güvenilir bir şekilde kullanılabileceklerini belirtmiştir.

Çakır (2007) Eskişehir ili merkezinde satış yapan çeşitli kasap, mandıra, pastane, semt pazarlarından topladığı gıda örneklerinden *S. aureus* bakterisi izole etmiştir. İdentifikasyon için geleneksel biyokimyasal testler ve VITEK sistemini, fenotipik tiplendirme için antibiyotik duyarlılık testleri, SET-RPLA test kiti ile enterotoksin belirleme testi ve FAME analizi, genotiplendirme için ise PFGE ve Ribotiplendirme metotlarını kullanmıştır. İzolatların geleneksel biyokimyasal testleri ile VITEK test sonuçları uyumlu bulurken, antibiyotik duyarlılık sonuçlarında izolatların %30,64'ü oksasiline dirençli bulunduğunu belirtmiştir. İzolatların PFGE analiz sonucunda 35 pulsotip ve ribotiplendirmede 7 ribogrup tespit ederek bu analiz yöntemlerinin özellikle strainlerin genotiplerinin belirlendiği epidemiyolojik çalışmalarda güvenilir olduklarını savunmuştur.

Moleküler tanı yöntemlerinin bir kısmı sadece tür düzeyinde identifikasyon yapabilecek uygulama yeterliliğine sahip iken bir kısmı ise alt türlerin evrimsel süreçte genomlarında meydana gelen genetik olaylar ve meydana getirdikleri varyasyonların saptanmasında da kullanılmaktadır. 16S rRNA genleri evrimsel süreçte çok iyi korunmuş ve diğer genlere oranla çevresel baskılardan etkilenmemiş evrensel belirteçler olmalarına rağmen, identifikasyon çalışmaları için tek başına kullanımlarda bazı olumsuzluklarla karşılaşmaktadır. Bu olumsuzluklardan biri 16S rRNA genlerinin genomda çok iyi korunmuş olarak bulunmasının bakteri analizinde sadece 16S genomlarında çalıştığı için sınırlandırıcı bir etki oluşturmaktadır (Achenbach ve ark., 2001). Diğer bir olumsuzluk ise, 16S rRNA genleri çeşitli bakteri türlerinde evrensel belirteçler olarak kullanılsalar bile genlerin kopya sayısının farklılık göstermesidir. Bu durum 16S rRNA genleri hedef olarak kullanıldığında bazı bakteri türlerinin çok iyi ayırt edilebilmesine, bazılarının ayırımının ise daha zor olmasına yol açmaktadır (Mohania ve ark., 2008). Bu nedenle, yapılmış olan otomatik ribotiplendirme çalışmaları pulsed field jel elektroforezi (PFGE) yöntemi ile desteklenmiştir.

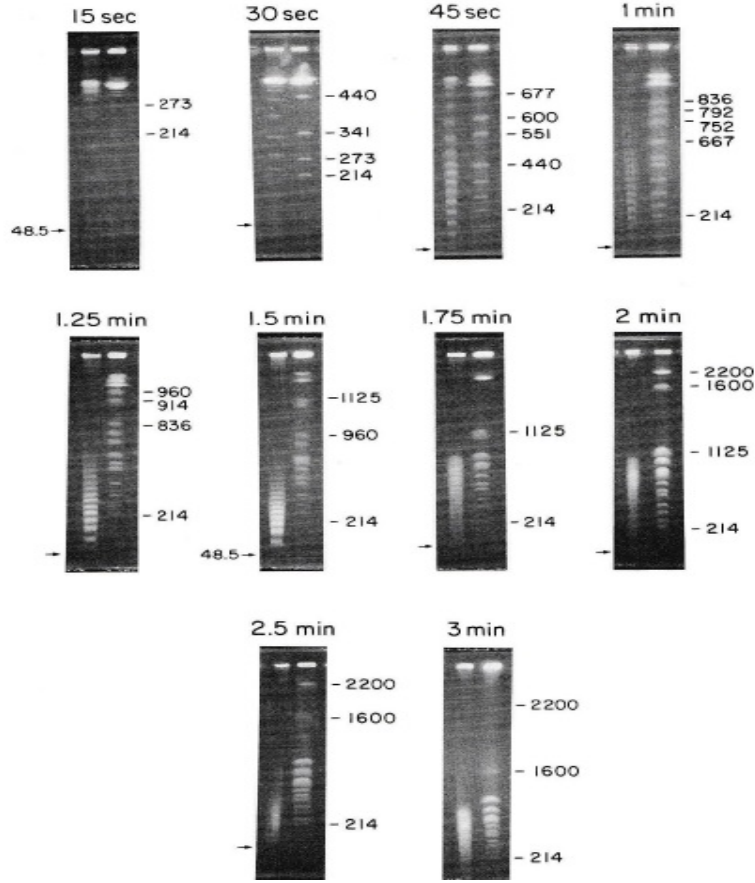
Pulsed field jel elektroforezi (PFGE) bakterilerin moleküler tiplendirilmesinde kullanılan, ayırım gücü yüksek, tekrarlanabilirliği olan güvenilir genotipik bir metottur. Epidemiyolojik çalışmalarda farklı mikobakteri, mantarlar, virüsler, gram negatif ve gram pozitif organizmalar gibi geniş bir oranda uygulanabilirliğe sahip başarılı bir yöntemdir (Matushek ve ark. 1996; Kuştımur 2000). PFGE, *S. aureus* popülasyonlarının genetik varyasyonlarını belirlemede güçlü ve iyi bilinen bir metottur. Schwartz ve Cantor tarafından 1984'te geliştirilmiş olan bu yöntem agaroz jel elektroforezinin bir varyasyonudur ve günümüzde moleküler tiplendirme yöntemleri içerisinde “altın standart” olarak kabul edilmektedir. Standart jel elektroforezinden en belirgin farkı uygulanan elektrik akım alanının, yönünün ve şiddetinin sabit olmaması, tekrarlanan bir biçimde değiştirilmesidir (Çakır 2007; Zadoks ve ark. 2000). Diğer önemli bir fark ise; 50 kilobazdan (kb) daha büyük DNA moleküllerinin yetersiz hareket yetenekleri nedeniyle jel üzerinde göç ederken ayrışmalarının gözlemlenememesi ve 750 kb'dan büyük olan DNA moleküllerinin kırılma noktalarının fazla olması nedeniyle jel üzerinde göçlerinin olumsuzluklarına PFGE yönteminin çözüm getirmesidir. Yüksek kalitede bozulmamış DNA'yı “*in situ lysis*” (yerinde lizis) sayesinde geleneksel DNA izolasyon uygulamalarından farklı olarak agaroz jel içerisinde gömülü koruyarak değişken elektriksel alanda kırılmadan göç etmesine ve ayrışmasına imkan sağlamaktadır (Günay, 2012).

PFGE metotunda daha az sayıda ve daha uzun fragmentler oluşturan restriksiyon enzimlerin kullanılması gerekmektedir. Daha uzun fragmentlerin oluşmasını sağlayan enzimler kromozom üzerinde daha az sıklıkta bulunan bölgeleri tanırlar ve genomu bu bölgelerden keserler. Böylece 0,5-50 kb arasında yüzlerce fragment yerine 10-800 kb uzunluğunda sayıları 5-20 arasında değişen fragmentler oluşmaktadır. Enzim seçimi yapılırken *S. aureus* genomunun düşük G+C içeriğine sahip olduğu dikkate alınarak tanıma bölgesinde G+C içeriği fazla olan enzimler kullanılmalıdır. Güvenilir ve kolay yorumlanabilir sonuçlar için bütün genomu sayıca 45'ten daha az parçaya ayırabilecek kriterlere sahip *Sma*I (CCCGGG) enzimi çalışmaya uygun bulunmuştur (Sağlam 2011; Günay 2012).

Elde edilen DNA fragmentleri elektroforez işlemi sırasında, konvansiyonel tekniklerde kullanılan agaroz jelin eleme etkisi nedeniyle ekarte edilmektedir. Konvansiyonel metotlarda DNA fragmentleri düz bir doğrultuda katottan anota doğru hareket ederken PFGE’de elektrik akımının yönü kısa zaman aralıklarla periyodik olarak (pulsed) sürekli değişmektedir (Weller, 2000).

Çalışmamızda kullanılan PFGE analiz parametreleri, çeşitli matematiksel hesaplamalar sonucunda optimize edilerek elde edilmiş ve daha önce başka araştırmacılar tarafından da denenmişlerdir (Bannerman ve ark., 1995). Bu parametreler analiz edilen izolatların araştırılmak istenilen genom bölgelerine, genom boyutlarına göre değişmektedir. Kullandığımız marker (Bio-Rad Lambda Ladder) için belirlenen 48,5-485 kilobaz (kb) büyüklükleri arasındaki bant paternlerini elde etmek için atılım açısı (pulse angle) 120°, akım hızı 6 volt/cm (200V) şartlarında, başlangıç atılım zamanı (initial pulse time) 5sn, bitiş atılım zamanı (final pulse time) 40sn olarak ayarlanmıştır (Birren ve Lai, 1993).

Aynı PFGE analiz parametreleri şartlarında (atılım açısı 120°, akım hızı 6 volt/cm, 0,5X TBE tamponu yürütme sıcaklığı 14°C), 50-1000 kb boyutları arasında Lambda ladders ve *S. cerevisiae* mayasının kromozomları farklı atılım aralıklarında ayrıştırıldığında elde edilen sonuçlarda (Şekil 4.2) farklı büyüklüklerde bant paternleri elde edilmiştir (Birren ve Lai, 1993).



Şekil 4.2. Farklı atılım aralıklarında ayrımları yapılmış (switch intervals) 50-1000 kb büyüklükleri arasındaki DNA'lar (Birren ve Lai, 1993)

Tenover ve ark. (1995), pulsed field jel elektroforezini epidemiyolojik hastalıklarda salgın suşları tanımlayabilmek amacıyla kullanmış ve oluşan makrorestriksiyon fragmentlerini genetik olaylar ile ilişkilendirerek yorumlanmasına yardımcı olan bazı kriterler geliştirmiştir (Çizelge 4.6). PFGE bant profilleri aynı olan bakterileri aynı kabul edilirken, bant sayısında farklılık sayısı yediden büyük görüldüğünde izolatların birbirleri ile ilişkisiz strainler oldukları söylenilebilmektedir.

Çizelge 4.6. PFGE profillerini yorumlama kriterleri (Tenover ve ark., 1995)

Kategori	Salgın strain ile arasındaki genetik fark sayısı	Salgın strain ile fark gösteren bant sayısı	Epidemiyolojik yorum
Aynı	0	0	İzolant, salgının bir parçası
Yakın ilişkili	1	1-3/ 2-3	İzolant salgınla yakın ilişkili
Olası ilişkili	2	4-6	İzolant salgınla olası ilişkili
Farklı	≥ 3	≥ 7	İzolant salgınla ilişkisiz

Çalışmamızda ribotiplendirme ile *S. aureus* olarak tanımlanmış 77 adet izolantın genotipik benzerlikleri *Sma*I enzimi kullanılarak araştırılmış ve 19 farklı pulstotip belirlenmiştir.

Pulstotip dağılımları; 77 *S. aureus* strainlerinden pulstotip 1’de %4 (3 strain), pulstotip 2’ de %1 (1 strain), pulstotip 3 ‘te %1 (1 strain), pulstotip 4’te %1 (1 strain), pulstotip 5 ‘te %4 (3 strain), pulstotip 6’da %1 (1 strain), pulstotip 7’de %3 (2 strain), pulstotip 8’de %1 (1 strain), pulstotip 9’da %1 (1 strain), pulstotip 10’da %1 (1 strain), pulstotip 11’de %49 (38 strain), pulstotip 12’de %1 (1 strain), pulstotip 13’te %1 (1 strain), pulstotip 14’te %1 (1 strain), pulstotip 15’te %1 (1 strain), pulstotip 16’da %1 (1 strain), pulstotip 17’de %1 (1 strain), pulstotip 18’de %1 (1 strain), pulstotip 19’da %22 (17 strain) olarak belirlenmiştir. İşletmeler baz alınarak inceleme yapıldığında; E3, B1, A2 ve D1 çiftliklerinde sadece pulstotip 11 (G11), B2 çiftliğinde sadece pulstotip 19 (G19), D2, D3, S1 ve S2 çiftliklerinde sadece pulstotip 11 ve 19 (G11-G19) gözlemlenmiştir.

Oluşan dendograma göre 4. ve 7. pulstotipler ile 5. ve 6. pulstotipler birbirleriyle yaklaşık %98 oranında benzer, 14. ve 18. pulstotipler ile 8. ve 11. pulstotipler birbirleriyle yaklaşık %97 oranında, diğer tüm grupların birbirleriyle %75 oranında benzer oldukları bulunmuştur. Pulstotipler arasındaki bant farklılığı sayıları Tenover ve ark. (1995) kriterlerine göre değerlendirildiğinde; G5 ve G6 grupları arasında 2 bant farkı görülerek birbirleriyle en yakın genetik ilişkide

oldukları, G4-G7 ve G14-G18 grupları arasında 3 bant farkı, G8 ve G11 grupları arasında 4 bant farkı, G3 ve G5 grupları arasında 5 bant farkı, G4-G5-G6-G7 grupları arasında 6 bant farkı, G4 ve G5 grupları arasında ise 7 bant farkı belirlenmiştir. G5 ve G6 gruplarında yer alan izolatlar, G4 ve G7 gruplarında yer alan izolatlar ve G14 ve G18 gruplarında yer alan izolatların birbirleriyle yakın ilişkili oldukları söylenebilir. G8 ve G11 gruplarında yer alan izolatlar, G3 ve G5 gruplarında yer alan izolatlar ve G4-G5-G6-G7 gruplarında yer alan izolatlar birbirleriyle olası ilişkili; G4 ve G5 gruplarında ve geriye kalan diğer tüm gruplarda yer alan izolatların birbirleriyle ilişkisiz oldukları söylenebilir. Pulsotipler arasındaki farklı fragment sayıları Tenover ve ark. (1995) kriterlerine göre değerlendirildiğinde dendogram verileri ile birbirlerini destekler nitelikte oldukları görülmüştür.

Schlichting ve ark. (1993) epidemiyolojik olarak ilişkili olmayan iki kaynaktan izole ettikleri 69 *Staphylococcus aureus* izolatını *Sma*I restriksiyon enzimi kullanarak pulsed field jel elektroforezi ile tiplendirmişler ve sonuçlarını diğer tiplendirme metotları olan faj tiplendirmesi, serotiplendirme ve zimotiplendirme ile karşılaştırmışlardır. Bu dört tiplendirme metodu ile *S. aureus* tipleri arasında iyi bir korelasyon yakalamışlardır. Bu genom tiplendirme çalışmalarının sonucunda pulsed field jel elektroforezinin sadece strain identifikasyonu için güçlü bir metot olmakla kalmayıp aynı zamanda *S. aureus* strainlerinin klonal akrabalıklarının ayrılmasında, çözümlenmesinde de etkili bir metot olduğu çıkarımını yapmışlardır.

Stephan ve ark (2001) Kuzeydoğu İsviçre’de 34 farklı çiftlikten, mastitisli 34 süt sığırının süt örneklerinden elde ettikleri 34 enterotoksin üreten *Staphylococcus aureus* izolatını tanımlamışlar ve sonrasında fenotipik ve genotipik metotlarla karakterize etmişlerdir. Çalışmalarının içeriği; stafilokokkal enterotoksin (SE) tiplerinin identifikasyonu, antibiyotik duyarlılık testi, hemoliz ölçümü, egg yolk reaksiyonu, clumping faktör ve lateks aglütinasyonu sayesinde protein A tespiti, *S. aureus*’da 16S-23S rRNA “intergenic spacer” bölgesini kodlayan genlerin spesifik parçalarının ve clumping faktör (*clfA*) geninin PCR analizi, X bölgesi ve protein A (*spa*) geninin IgG-bağlayıcı bölgesi, koagülaz geni

(*coa*) ve ek olarak kromozomal DNA'nın makrorestriksiyon analizidir. Tekli SE oluşturan 26 kültür içinde, 23 SEC ve üç adet SED oluşturduğunu ve sekiz kültürün SEAD oluşturuğunu bulmuşlardır. 22 adet SEC oluşturan izolatın aynı zamanda TSST-1 için pozitif olduğunu görmüşlerdir. Bir enterotoksin tipine sahip kültürlerin çoğunun aynı zamanda protein A geninin IgG-bağlayıcı bölgesinin boyutlarında X bölgesi tekrarlarının, boyut ve sayı olarak ciddi bir benzerlik gösterdiğini belirtmişlerdir. Makrorestriksiyon analizinin 11 PFGE paterni ortaya çıkardığını, birbirleri ile sadece birkaç fragmentte farklılık gösterdiklerini ve bu durumda yakın klonal akrabalığı ortaya çıkardığını bulmuşlardır.

Hennekinne ve ark. (2003); çeşitli kaynaklardan (insan, hayvan, gıda) izole edilen 73 adet *S. aureus* ve 1 adet *S. simulans* izolatını PFGE yöntemi ile analiz etmişler ve 62 patern oluştuğunu gözlemlemişlerdir. *S. aureus* izolatlarından oluşan birinci grup ile sadece *S. simulans* izolatından oluşan ikinci grup arasında %20 oranında benzerlik olduğunu belirlemişlerdir. *S. aureus* grubunun da kendi içerisinde %50 benzerlik gösteren 14 alt grubu olduğunu belirtmişlerdir. Aynı biyotip içerisindeki strainlerin %86'sının aynı alt gruplarda yer aldıklarını ve pulstipler ve biyotipler arasında güçlü bir korelasyonu ilk kez kendi çalışmalarında gösterdiklerini savunmuşlardır. PFGE tiplendirme yönteminin geleneksel *S. aureus* biyotiplerini ayırım gücünde başarılı olduğunu ve biyokimyasal tiplendirmeden daha güçlü bir ayırım gücüne sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Vasudevan ve ark. (2003) sığır mastitisinden izole edilmiş *S. aureus* izolatlarında in vitro slime yapısı, biyofilm oluşumu, *ica* gen bölgesi varlığı ve *icaA* ve *icaD* genlerini incelemeyi amaçlayan bir çalışma yapmışlardır. 35 izolattan 32'sinin Kongo Red Agar plak yöntemiyle slime oluşumunu test etmişler fakat izolatların sadece 24 tanesinin in vitro biyofilm oluşturduğunu bulmuşlardır. Bununla birlikte, 35 izolatın hepsinin *ica* bölgesi, *icaA* ve *icaD* genlerine sahip olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmaları ile mastitis etmeni *S. aureus* izolatları arasında *ica* genlerinin büyük oranda yaygınlığını ve onların varlığının her zaman slime ya da biyofilmin in vitro formu ile ilişkili olmadığını göstermişlerdir.

Eslampour ve ark. (2009) İran'daki mastitisli *S. aureus* izolatlarının moleküler karakterizasyonunun bilinmediğini belirterek, Tahran'da PFGE ile saptadıkları yaygın *S. aureus* klonlarını çalışmalarında rapor etmişlerdir. Süt örneklerinden 68 *S. aureus* izolatını kültür etmişlerdir. *S. aureus* izolatlarını gram boyama, koagülaz oluşturma, katalaz, DNaz, oksidaz ve mannitol fermantasyonu testleri ile tanımlamışlardır. Spesifik primer kullanarak PCR ile nükleaz (*nucA*) kodlayan geni incelemişlerdir. 68 *S. aureus* izolatının makrorestriksiyon analizi PFGE ile 10 özgün pulsotip belirlemiş ve bu pulsotipleri 7 PFGE tipinde gruplandırmışlardır.

Morandi ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada 122 farklı çiğ süt örneğinden ve 8 farklı insan örneğinden toplamda 130 *Staphylococcus aureus* strainini izole etmişlerdir. Biyokimyasal profiller (Biolog GP), koagülaz genin restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (*coaRFLP*), rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) ve multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA) olmak üzere dört farklı tiplendirme tekniği uygulamışlardır. Bunlara ek olarak kodlanmış stafilokokkal enterotoksin genlerinin dağılımını araştırmak için multiplex-PCR kullanmışlardır. Çalışmanın sonuçları ile test edilen *S. aureus* strainleri arasındaki işaretli genomik ve fenotipik çeşitlilik ortaya çıkarılmıştır. Kullandıkları tüm tekniklerin strain tiplendirmesinde uygun oldukları ama tiplendirme sisteminin anahtar parametresi olan ayırım gücüne dayalı teknikler olan MLVA ve Biolog GP teknikleri en güçlüleri olarak belirlenmiştir.

Dendani ve ark. (2010) Fransa'da 5 aylık bir periyotta klinik mastitisten etkilenmiş 32 adet sığırın süt örneklerinden 32 tane *Staphylococcus aureus* straini toplamışlardır. İdentifikasyonun fenotipik ve genotipik karakterizasyonu için 25 *S. aureus* straini hedef olarak seçilmiş ve antibiyotik duyarlılık ve Pulsed Field Gel Elektroforezi (PFGE) teknikleri ile epidemiyolojik olarak test edilmişlerdir. Kromozomal DNA'nın *SmaI* enzimi ile kesiminden sonra 9 farklı genetik profil elde edilmiştir. Bu genetik profiller içerisinde genotip A ve genotip B olmak üzere iki majör pulsotip belirlenmiş ve bu gruplarda yer alan *S. aureus* strainlerinin mastitis oluşma nedenlerinde dominant genotipler oldukları bildirilmiştir.

Aydın ve ark. (2011) Türkiye, Marmara Bölgesi'nde yaptıkları çalışmada perakende satış yapan marketler ve süt çiftliklerinden *S. aureus* varlığını belirlemek için 1070 gıda örneği toplamışlardır. Gıda örneklerinin 115'i et (sığır eti, koyun eti, tavuk ve hindi eti), 15'i et ürünleri (sucuk, salam, sosis), 303'ü süt çiftliklerinden toplanan çiğ süt, 452'si süt ürünleri (peynir, yağ, yoğurt ve krema), 141'i unlu mamüller (pasta, yufka ve kek) ve 44'ü hazır gıda ürünlerini içermektedir. 147 izolat dışında, 92 adetini enterotoksijenik bulmuşlar ve bu enterotoksin genlerini belirlemek için PCR ve ELISA metotlarını kullanmışlardır. PFGE analiz yöntemi ile enterotoksijenik *S. aureus* izolatlarının genetik akrabalık ilişkilerini araştırmışlar ve farklı ya da aynı kaynaktan gelen izolatların 13 farklı grup oluşturduğunu gözlemlemişlerdir. Diğer enterotoksijenik izolatların yakın bant paternleri sergilediğinden bahsetmiş ve Marmara Bölgesi'nde enterotoksinler ve akraba gen bileşimi gösteren *S. aureus* gıda örnekleri ile ilk kez kendilerinin çalıştıklarını savunmuşlardır.

Monecke ve ark. (2011) Birleşik Arap Emirlikleri'nde, hem populasyon yapısı hem de toksin genlerin ve rezistans markerların taşınması hakkında bilgi elde etmek amacıyla Dubai tek hörgüçlü develerinden toplanan 45 izolatlık bir koleksiyonu genotiplendirmişlerdir. Rezistans genlerin az bulunduğunu ispatlamışlardır. 45 izolattan sadece üçünün (%6,67) beta-laktamaz operonu taşıdığını aynı zamanda tetrasiklin rezistans geni *tetK*'nin da bu üç izolatta saptandığını belirtmişlerdir. Ne *mecA* genini ne de diğer rezistans genleri MRSA olarak tanımlanan izolatlarda bulamamış fakat genel virülans markerlar olan lökositin genleri *lukD* + *lukE*, stafilokinaz geni *sak*, enterotoksin gen kümesi *egc* ve enterotoksin A geninin farklı bir varyasyonunu içerdiklerini saptamışlardır. Bir izolatın da Panton-Valentine lökositin kodlayan genler için pozitif olduğunu belirlemişlerdir (*lukF*-PV + *lukS*-PV). Çalışmalarının populasyon yapısı, toksin genlerinin varlığı ve orta doğu develerinde bulunan *S. aureus* strainlerinin rezistans markerlarının ilk genotiplendirme bilgisini sağladığını belirtmişlerdir.

Ote ve ark. (2011) Belçika'da klinik ve subklinik mastitis hastası sığırların sütlerinden izole ettikleri *S. aureus* strainlerinin genetik profillerini belirlemek amaçlı çalışma yapmışlardır. Spesifik polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile 40

ortak virulans geninin varlığını incelemişlerdir. Çok sayıda genotipik subtipleri belirlemiş, *S. aureus* izolatlarında virulans genlerin varlığından başka büyük varyasyonları ispatlamış ve strain popülasyonlarının büyük ölçüdeki çeşitliliğin sığırlarda mastitise neden olabileceğini belirtmişlerdir. Diğer yapılan çalışmalarla doğru orantılı olarak, 40 genden bazılarının mastitis nedeni *S. aureus* izolatları ile ilgili olduğunu ama diğerlerinin ilgili bulunmamış ya da nadiren bulunmuş olduğunu göstermişlerdir.

Costa ve ark. (2012) Brezilya süt sürülerindeki sığır mastitislerinden izole ettikleri *S. aureus* strainlerinde, PCR-RFLP analizi ile popülasyon çeşitliliğini, koagülaz geninin 3' ucunun sekans dizilimini ve strainlerin antimikrobiyallere duyarlılığını değerlendirmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlar ile çalıştıkları *S. aureus* popülasyonunda geniş bir çeşitlilik olduğunu ve baskın kolonilerin varlığının çoğu enfeksiyonun sorumlusu olduğunu belirtmişlerdir. PCR-RFLP analizlerinde baskın tipler arasında ilişki olmadığını ve mastitisin teşhis edilmiş formları ya da farklı paternlerin hiçbirinin antimikrobiyal duyarlılığı olmadığını belirlemişlerdir.

Gharsa ve ark. (2012) Tunus'ta 2010 yılı boyunca, iki çiftlik ve bir mezbahada bulunan 163 sağlıklı koyundan nazal swablar toplamışlardır. Örnekleri *Staphylococcus aureus* ve iyileşen metisilin-dirençli *S. aureus* (MRSA) için Baird Parker agar ve ORSAB medium'a sırasıyla inoküle etmişlerdir. ORSAB medium'da 163 örnekten 5 tanesi (%3) saptamışlardır. MRSA izolatlarını *mecA* pozitif bulmuşlardır. MRSA izolatlarının ya ayırt edilemeyecek derecede benzer ya da yakın akraba PFGE paternleri gösterdiğini ve Pantone-Valentine lökositidin (PVL) kodlayan *lukF/lukS* genlerini ve *luk-ED*, *hla*, *hld*, *hlg* genlerini barındırdığını belirtmişlerdir. 163 örnekten 68 tanesinde (%41,7) metisilin-duyarlı *S. aureus* (MSSA) izolatlarını geri kazanmışlardır. Sonuç olarak, sağlıklı koyunların burun deliklerinin PVL-pozitif topluluk-MRSA ortaklı organizmalar için rezervuar olabileceğini ve halk sağlığında potansiyel bulaşıcı olduklarını savunmuşlardır.

Ribotiplendirme analizi sonucu elde edilen diğer 27 adet bakteriden bazılarının mastitis vakalarında rastlanılan bakteriler olmasına rağmen bazılarının ise mastitis ile ilişkisini belirten bir çalışma bulunamamıştır.

Lüthje ve Schwarz (2005) sığır mastitisi ile ilişkili patojenlerin kontrolü için koagülaz negatif stafilocokları (KNS) antimikrobiyal etkenlerine ve makrolid ve linkozamid (ML) dirençlerine göre analiz etmişlerdir. Toplamda 298 KNS izolatını 2003 ve 2005 yılları arasında Almaya’da subklinik mastitisli sığırlardan toplamışlardır. Standardize identifikasyon kiti kullanarak *Staphylococcus chromogenes* (99 izolat, %32,2), *Staphylococcus simulans* (69 izolat, %23,2), *Staphylococcus epidermidis* (35 izolat, %11,7), *Staphylococcus xylosus* ve *Staphylococcus haemolyticus* (her birinden 28 izolat, %9,4) türlerini identifiye etmişlerdir. Bu türlerin aynı zamanda KNS’ler içerisinde en yaygın türler olduklarını belirtmişlerdir. Bunlara ek olarak *Staphylococcus warneri* (13 izolat), *Staphylococcus sciuri* (8 izolat), *Staphylococcus equorum* (6 izolat), *Staphylococcus saprophyticus* (3 izolat), *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus hominis* (her birinden 2 izolat) ve tek izolat *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus arlettae* ve *Staphylococcus gallinarum* türlerini de identifiye etmişlerdir.

Delgado ve ark. (2008) laktasyonal mastitis olgusunun mikrobiyal çeşitliliğini 20 adet kadının memelerinden alınan sütlerde PCR-DGGE analiz yöntemleriyle çalışmışlardır. Sonuçlarda stafilocokları bakteriyel dominant grup ve *Staphylococcus epidermidis*’i dominant tür olarak belirlemişlerdir. DGGE markerlarından Marker 1’in *S. aureus*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas fluorescens*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis*, *Rothia mucilaginosa* ve *Streptococcus parasanguis* izolatlarını içerdiğini; Marker 2’nin *Lactobacillus salivarius*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus gasseri* ve *Lactobacillus fermentum* izolatlarını içerdiğini saptamışlardır.

Kaynarca ve Türkyılmaz (2009) sığır mastitislerine neden olan stafilocok strainlerinde metisilin direnci ve slaym oluşumunu incelemek için 152 sağmal inekten 339 mastitisli süt örneği toplamışlardır. İzole edilen mikroorganizmaların cins düzeyinde identifikasyonunu standart biyokimyasal yöntemlerle, koagülaz pozitif stafilocok (KPS) ve koagülaz negatif stafilocok (KNS) strainlerinin tür düzeyinde identifikasyonunu ise sekans analizi ile yapmışlardır. Mastitis etkeni

olarak ilk sırayı KNS'lar (%24,5) alırken, bunu KPS'ların (%20,9) takip ettiğini, sonrasında ise mayalar (%12,1), *E. coli* (%9,3), *Streptococcus* spp. (%6,2), *Bacillus* spp. (%5,6), *Shigella* spp (%3,5), *Pseudomonas* spp. (%2,6) ve diğer mikroorganizmaları (%2,4) tanımladıklarını belirtmişlerdir.

Pankaj ve ark. (2013) subklinik mastitisli Murrah sığırlarının etiyolojik etmenlerini ve antibiyogramlarını çalışmışlardır. Görünüş olarak sağlıklı görülen 82 sığırdan toplamda 326 süt örneği almışlardır. Analizler sonucu 44 organizma ortaya çıkartmışlardır. Bunların %15,90'ı koagülaz pozitif stafilokoklar, %47,72'si koagülaz negatif stafilokoklar, %25'i *Streptococcus dysgalactiae*, %9,09'u *Streptococcus agalactiae*, %2,27'si *Streptococcus uberis* ve %13,63'ü de *Staphylococcus* spp. ve *Streptococcus* spp. karışımı olarak bulunmuştur. Stafilokoklar arasında başlıca izolatlar olarak *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus haemolyticus*, onları takiben *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *saprophyticus*, *Staphylococcus arlettae* ve *Staphylococcus gallinarum* izolatlarını tanımlamışlardır.

Staphylococcus hominis subsp. *novobioceticus* strainleri Brezilya'da bir çalışmada nozokomiyal kan dolaşım sisteminde, başka bir çalışmada kan ve deri kaynaklı strainler olarak çalışılmış ve insan-kan kaynaklı bakteriler oldukları belirlenmiştir (Kloos ve ark. 1998; Palazzo ve ark. 2008; Piessens ve ark. 2010).

Pseudomonas fluorescens türü insan kaynaklı mastitis hastalığında görülmüş olması ile birlikte *Pseudomonas bathycetes* ve *Escherichia coli* türleri ile bütün hücrelerdeki protein sentezinde yüksek hidrostatik basıncın etkileri araştırılırken saptanan bakteriler arasında da yer almıştır (Pope ve ark. 1974). Bu üç bakteri türü protein sentezi barotoleransı ölçülürken yine beraber başka bir çalışmada da çalışılmışlardır (Landau ve ark. 1976).

Sonuç olarak;

1. Bu çalışma ile mastitisli sütlerden izole edilen bakteriler arasında *S. aureus* ile aynı anda başka etmenlerin de bulunabileceği saptanmıştır. Mastitis etmeni olabilen *S. aureus* dışındaki bu bakteriler *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus pasteurii*, *Enterococcus faecalis*, *Hydrogenophaga flava*, *Staphylococcus chromogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Pseudomonas fluorescens* olarak tanımlanmıştır. *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* ve *Pseudomonas bathycetes* ise mastitis ile ilişkili olmayan bakterilerdir.

2. Ribotiplendirme ile *S. aureus* olarak tanımlanan izolatlar toplamda 8 ribogrupa ayrılmış olup, ribogrup 3 dominant grup olarak belirlenmiştir. Oluşturulan dendogram sonucunda ribogrup 7 ve 8 ile ribogrup 1 ve 2'nin birbirleri ile yaklaşık %98 oranında genotipik benzerlik gösterdikleri ve diğer tüm grupların birbirleri ile %75'in üzerinde benzer oldukları belirlenmiştir.

3. Bu çalışmada kullanılan PFGE analiz yöntemi ile izolatların çiftlik-pulsotip ilişkisi gösterilmiş olup dominant pulsotipler sırasıyla G11 ve G19 olarak belirlenmiştir. PFGE dendogramında yer alan benzerlik oranları (%98, %97, %75) ile PFGE yorumlama kriterlerine dayalı bant sayılarındaki farklılıklar doğru orantılı bulunmuştur. G5 ve G6 gruplarında yer alan izolatlar, G4 ve G7 gruplarında yer alan izolatlar ve G14 ve G18 gruplarında yer alan izolatların birbirleriyle yakın genetik ilişkili oldukları; G8 ve G11 gruplarında yer alan izolatlar, G3 ve G5 gruplarında yer alan izolatlar ve G4-G5-G-G7 gruplarında yer alan izolatlar birbirleriyle olası ilişkili; G4 ve G5 gruplarında ve geriye kalan diğer gruplarda yer alan izolatların birbirleriyle ilişkisiz oldukları sonucuna varılmıştır.

4. Çalışmamızda ribotiplendirme yöntemi ile belirlenen ribogruplar (8 ribogrup) ile pulsotipler (19 pulsotip) birbirleriyle tamamen  akışmasa da benzerlikleri saptanmıştır. PFGE analizinde en yoğun pulsotip olan G11'de yer alan izolatların bir kısmının ribotiplendirmede birbirleriyle %98 benzerlik gösteren ribogrup 2, ribogrup 7 ve ribogrup 8'de yer alan izolatlarla aynı olduğu belirlenmiştir. Ribogruplar 7 ve 8'de yer alan izolatlarının bir kısmının da PFGE analizinde %98 ve %97 benzerlik oranı gösteren G5, G7 ve G8 pulsotiplerinde yer

aldığı belirlenmiştir. Ribotiplendirme ile strain identifikasyonunun güvenilir bir şekilde kromozomal DNA'nın PFGE analiz yöntemi ile kombine olarak kullanılabileceği gösterilmiştir.

5. PFGE ve ribotiplendirme yöntemleri mastitis etmeni *S. aureus* strainlerinin epidemiyolojik çalışmalarında güvenilirlik, tekrarlanabilirlik, hassasiyet ve ayırım gücü bakımlarından elverişli, kullanılabilir metotlardır. Alternatif olarak yeni bir yöntem olan, DNA sentezi esnasında ortaya çıkan pirofosfatların saptanması esasına dayalı gerçek zamanlı kantitatif bir dizi analizi tekniği olan pirosekanslama metodu ile çalışılabilir (Masoud ve ark. 2012; Oikonomou ve ark. 2012).

6. Çalışma sonucunda mastitis etmeni olmayan *Pseudomonas bathycetes* ve *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* bakterilerinin saptanması ve bu bakterilerin insan kanı ve derisinde rastlanılan bakteriler olması isolatların süt sağımı veya kaynaktan izole edilip tarafımıza ulaştırılması sıralarında kontaminasyondan kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Öneriler

Tarafımıza ulaştırılmadan önce gerçekleştirilen API testleri ve konvensiyonel biyokimyasal teknikler ile 104 adet izolatın *S. aureus* bakterisi olarak tanımlanmış olması geleneksel identifikasyon metotlarının güvenilirliğinin yüksek derecede olmadığını göstermiştir. Bu tip metotların mutlaka moleküler tiplendirme metotları ile desteklenmesi gerekmektedir.

Ribotiplendirme kit gerektirmesi yönünden pahalı olması dezavantajına sahiptir. Ancak bir gün içerisinde 24 izolat identifiye edilebilir. PFGE yöntemi bu süreden daha uzun zaman alsa da daha az masraflı olup, ayırım gücü ribotiplendirmeden çok daha kadar yüksektir. Bu nedenle “altın standart” olarak geçerliliğini korumaktadır.

Süt sağım esnasında çalışan personel veya kişilerin hem kendi sağlıkları hem de hayvan sağlığı açısından steril bir şekilde çalışmaları gerekmektedir.

Bunun yanı sıra kullanılan sağıım ekipmanlarının bakımları ve temizliğı periyodik olarak yapılmalıdır. Patojen mikroorganizmalar çevreye kolay yayıldığı için hayvan barınak temizliğı ve beslenme koşullarına dikkat edilmelidir.

Masititis hastalığı tek tip olmayıp latent, subklinik ve klinik mastitis olmak üzere üç tipi mevcuttur. Özellikle subklinik mastitis çeşidinin görülme sıklığının fazla olması ve hastalığın gözle görülür belirtiler göstermeden ilerlemesi nedenleriyle hayvan veteriner kontrolleri düzenli bir şekilde yaptırılmalıdır. Hasta olduğu teşhis edilen hayvanlar derhal ortamdan izole edilmelidirler.

Bu çalışmada kullanılan mastitit etmeni izolatların toksin profillerinin araştırılması bir sonraki çalışma konusu olup, makale haline getirilmesi için bu eksikliğin giderilmesi büyük önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Abd-Elrahman, A. H. (2013), *Mastitis in housed dairy buffaloes: incidence, etiology, clinical finding, antimicrobial sensitivity and different medical treatment against E. coli mastitis*, Life Science Journal, 10(1): 532-538.
- Achenbach, L. A., Carey, J. ve Madigan, M. (2001), *Photosynthetic and phylogenetic primers for detection of anoxygenic phototrops in natural environments*, Appl. Environ. Microbiol., 67(7): 2922-2926.
- Albayrak, A. İ. (2007), *Mastitisli ineklerden izole edilen Staphylococcus aureus suşlarının REP-PCR ile tiplendirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Anonim (2013), *Tarım Bakanlığı, Hayvan Genel Müdürlüğü Verileri (HAYGEM)*, <http://www.tarim.gov.tr/Sayfalar///Icerikler.aspx?rid=245&NodeValue=245&KonuId=224&zGroup=0&ListName=Icerikler>
- Anonim (2013), *Tarım Bakanlığı, Afyonkarahisar Tarım İl Müdürlüğü* http://www.afyonkarahisartarim.gov.tr/index_tr.asp?mn=127&bn=0&in=403
- Aras, Z., Aydın, I. ve Kav, K., (2011), *Isolation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from caprine mastitis case*, Small Ruminant Research, 102: 67-73.
- Atasever, S. ve Erdem, H. (2008), *Süt sığırlarında mastitis ile sütün elektriksel iletkenliği arasındaki ilişkiler*, OMÜ Zir. Fak. Dergisi/ J. of Fac. Of Agric., 23(2): 131-136.
- Aydın, A., Sudagidan, M. ve Muratoğlu, K. (2011), *Prevalence of staphylococcal enterotoxins, toxin genes and genetic-relatedness of foodborne Staphylococcus aureus strains isolated in the Marmara Region of Turkey*, International Journal of Food Microbiology, 148: 99-106.

- Baird-Parker, A. C. (1965), *The classification of Staphylococci and Micrococci from world-wide sources*, J. Gen. Microbiol., 38, 363-387.
- Bannerman, T., Hancock, G. A., Tenover, F. C. ve Miller, J. M. (1995), *Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of Staphylococcus aureus*, Journal of Clinical Microbiology, 33(3): 551-555.
- Barkar. S. (2009), *Toplum kaynaklı metisilin dirençli Staphylococcus aureus (CA-MRSA) suşlarında kromozomal kaset tiplerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemleri ile araştırılması*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Birren, B. ve Lai, E. (1993), *Pulsed field gel electrophoresis: A practical guide*, Academic Press, Inc., California, A.B.D..
- Boynukara, B., Gülhan, T., Alisarli, M., Gurturk, K. ve Solmaz, H. (2008), *Classical enterotoxigenic characteristics of Staphylococcus aureus strains isolated from bovine mastitis in Van, Turkey*, International Journal of Food Microbiology, 125: 209-211.
- Buzzola, F. R., Quelle, L., Gomez, M. I., Catalano, M., Steele-Moore, L., Berg, D., Gentilini, E., Denamiel, G. ve Sordelli, D. O. (2001), *Genotyping analysis of Staphylococcus aureus from milk of dairy cows with mastitis in Argentina*, Epidemiol. Infect., 126: 445-452.
- Capurro, A., Aspan, A., Artursson, K. ve Waller K. P. (2010), *Genotypic variation among Staphylococcus aureus isolates from cases of clinical mastitis in Swedish dairy cows*, The Veterinary Journal, 185: 188-192.
- Cartwright, E. J. P., Paterson, G. K., Raven, K. E., Harrison, E. M., Gouliouris, T., Kearns, A., Pichon, B., Edwards, G., Skov, R. L., Larsen, A. R., Holmes, M. A., Parkhill, J. ve Peacock, S. J. (2013), *Use of Vitek 2 antimicrobial susceptibility profile to identify mecC in methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, Journal of Clinical Microbiology, 51(8): 2732-2734.

- Costa, G. M., Paiva, L. V., Figueiredo, H. C. P., Figueira, A. R., Pereira, U. P. ve Silva, N. (2012), *Population diversity of Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis in Brazilian dairy herds*, Research in Veterinary Science, 93: 733-735.
- Çakır, P. (2007), *Gıda ve insan kaynaklı Staphylococcus aureus strainlerinin karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Çokal, Y. ve Konuş, R. (2012), *Subklinik mastitisli ineklerin sütlerinden aerobik bakterilerin izolasyonu*, Balıkesir Sağlık Bil. Derg., Cilt: 1, Sayı: 2, Sayfalar 65-69.
- Delgado, S., Arroyo, R., Martin, R. ve Rodriguez, J. M. (2008), *PCR-DGGE assessment of bacterial diversity of breast milk in women with lactational infectious mastitis*, BMC Infectious Diseases, 8:51.
- Dendani, Z., Arcangioli, M. A., Bezille, P., Ouzrout, R. ve Sellami, N. L. (2010), *Genotyping of Staphylococcus aureus isolated from bovine clinical mastitis by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)*, Journal of Animal and Veterinary Advances, 9(1): 5-11.
- Dijkshoorn, L., Ursing, B. M ve Ursing J. B. (2000), *Strain, clone and species: comments on three basic concepts of bacteriology*, J. Med. Microbiol., 49: 397-401.
- Dilsiz, B. (2010), *Subklinik mastitisli inek sütlerinden izole edilen Staphylococcus aureus suşlarında metisilin direncinin fenotipik ve genotipik araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Hatay.
- Dinges, M. M., Orwin, P. M. ve Schlievert, P. M. (2000), *Exotoxins of Staphylococcus aureus*, Clinical Microbiology Reviews, 13(1): 16-34.
- Ekici, L., Telli, R. ve Yetim, H. (2008), *Gıda kaynaklı enfeksiyon ve intoksisasyon bakterileri-1*, Teknolojik Araştırmalar: GTED (2): 29-42.

- Eslampour, M. A., Hovareshti, P., Feizabadi, M. M., Aligholi, M., Blolourchi, M., Jabalameli, F., Barin, A., Niasari-Naslaji, A., Taherikalani, M. ve Emaneini, M. (2009), *Molecular characterizaiton of Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis in Iran*, Veterinary Microbiology, 139: 207-208.
- Febler, A., Scott, C., Kadlec, K., Ehricht, R., Monecke, S. ve Schwarz, S. (2010), *Characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 from cases of bovine mastitis*, J. Antimicrob. Chemother., doi:10.1093/jac/dkq021, 1-7.
- Fournier, C., Kuhnert, P., Frey, J., Miserez, R., Kirchhofer, M., Kaufmann, T., Steiner, A. ve Graber, H. U. (2008), *Bovine Staphylococcus aureus: Association of virulence genes, genotypes and clinical outcome*, Research in Veterinary Science, 85, 439-448.
- Gharsa, H., Slama, K. B., Lozano, C., Gomez-Sanz, E., Klibi, N., Sallem, R. B., Gomez, P., Zarazaga, M. ve Boudabous, A. (2012), *Prevalence, antibiotic resistance, virulence traits and genetic lineages of Staphylococcus aureus in healthy sheep in Tunisia*, Veterinary Microbiology, 156: 367-373.
- Götz, F., Bannerman, T. ve Schleifer, K. H. (2006), *The genera Staphylococcus and Micrococcus*, Prokaryotes 4:5-75, Chapter 1.2.1, Pages 5-75.
- Gülbandılar, A. (2006), *Kütahya yöresinde çeşitli kaynaklardan elde edilen Staphylococcus aureus izolatlarının karakterizasyonu*, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Günay, Ö. (2012), *Türkiye kökenli Lactococcus lactic suşlarının kromozomal farklılıklarının tanımlanması*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.
- Günaydın, B., Aslantaş, Ö. ve Demir, C. (2011), *Detection of superantigenic toxin genes inn Staphylococcus aureus strains from subclinical bovine mastitis*, Trop Anim Health Prod, 43: 1633-1637.

- Harris, L. G., Foster, S. J. ve Richards, R. G. (2002), *An introduction to Staphylococcus aureus, and techniques for identifying and quantifying S. aureus adhesins in relation to adhesion to biomaterials: Review*, European Cells and Materials Vol. 4. Pages 39-6
- Hartmann, H., Stender, H., Schafer, A., Autenrieth, I. B. ve Kempf, V. A. J. (2005), *Rapid identification of Staphylococcus aureus in blood cultures by a combination of fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes and flow cytometry*, Journal of Clinical Microbiology, 43(9): 4885-4857.
- Hennekinne, J. A., Kerouanton, A., Brisabois, A. ve Buyser, M. L. (2003), *Discrimination of Staphylococcus aureus biotypes by pulsed-field gel electrophoresis of DNA macro-restriction fragments*, Journal of Applied Microbiology, 94: 321-329.
- Hillerton, J. E. (2000), *Detecting mastitis cows-side*, National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings, 48-53.
- Jain, N. C. (1979), *Common mammary pathogens and factors in infection and mastitis*, J. Dairy Sci., 62: 128-134.
- Kapur, V., Sisco, W. M., Greer, R. S., Whittam, T. S. ve Musser, J. M. (1995), *Molecular population genetic analysis of Staphylococcus aureus recovered from cows*, Journal of Clinical Microbiology, 33(2): 376-380.
- Karahan, M. ve Çetinkaya, B. (2006), *Coagulase gene polymorphisms detected by PCR in Staphylococcus aureus isolated from subclinical bovine mastitis in Turkey*, The Veterinary Journal, 174: 428-431.
- Karahan, M., Açıık, M. N. ve Çetinkaya, B. (2009), *Investigation of toxin genes by polymerase chain reaction in Staphylococcus aureus strains isolated from bovine mastitis in Turkey*, Foodborne Pathogens and Disease, 6(8): 1029-1035.

- Kaynarca, S. ve Türkyılmaz, S. (2009), *Sığır mastitislerinden izole edilen stafilocoklarda metisilin direnci ve slaym pozitifliği*, Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg., 16(4): 567-572.
- Kenar, B., Kuyucuoğlu, Y. ve Şeker, E. (2012), *Antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine subclinical mastitis in Turkey*, Pak. Vet. J., 32(3): 390-393.
- Kılıç, S. (2007), *Hindi etlerinden izole edilen koagülaz pozitif stafilocokların enterotoksin oluşturma yeteneklerinin EIA (Enzyme Immuno Assay) yöntemiyle belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Kıran, F. ve Osmanağaoğlu, Ö. (2011), *Laktik asit bakterilerinin (LAB) identifikasyonunda/tiplendirmesinde kullanılan moleküler yöntemler*, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 27(1): 62-74.
- Kloos., W. E., George, C. G., Olgiate, J. S., Pelt, L. V., Mckinnon, M. L., Zimmer, B. L., Muller, E., Weinstein, M. P. ve Mirrett, S. (1998), *Staphylococcus hominis subsp. novobiosepticus subsp. nov., a novel trehalose- and N-acetyl-D-glucosamine-negative, novobiocin- and multiple-antibiotic-resistant subspecies isolated from human blood cultures*, International Journal of Systematic Bacteriology, 48: 799-812.
- Kuştimur, S. (2000), *Mantarların tanı ve araştırılmasında kullanılan yöntemler*, Mikrobiyol. Bül., 34: 189-192.
- Landau, J. V., Smith, W. P. ve Pope, D. H. (1976), *Role of the 30S ribosomal subunit, initiation factors, and specific ion concentration in barotolerant protein synthesis in Pseudomonas bathycetes*, Journal of Bacteriology, 130(1): 154-159.
- Lüthje, P. ve Schwarz, S. (2005), *Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide-lincosamide resistance phenotypes and genotypes*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 57: 966-969.

- Masoud, W., Vogensen, F. K., Lillevang, S., Al-soud, W. A., Sorensen, S. J. ve Jakobsen, M. (2012), *The fate of indigenous microbiota, starter cultures, Escherichia coli, Listeria innocua and Staphylococcus aureus in Danish raw milk and cheeses determined by pyrosequencing and quantitative real time (qRT)-PCR*, International Journal of Food Microbiology, 153: 192-202.
- Matushek, M. G., Bonten, M. J. M. ve Hayden, M. K. (1996), *Rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis*, Journal of Clinical Microbiology, 34(10): 2598-2600.
- Memmedova, N. (2012), *Süt sığırlarında mastitisin bazı yapay zeka yöntemleri kullanılarak erken dönemde tespiti*, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Mohania, D., Nagpal, R., Kumar, M., Bhardwaj, A., Yadav, M., Jain, S., Marotta, F., Singh, V., Parkash, O. ve Yadav, H. (2008), *Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria*, Journal of Digestive Diseases, 9: 190-198.
- Monecke, S., Ehricht, R., Slickers, P., Wernery, R., Johnson, B., Jose, S. ve Wernery, U. (2011), *Microarray-based genotyping of Staphylococcus aureus isolates from camels*, Veterinary Microbiology, 150: 309-314.
- Morandi, S., Brasca, M., Lodi, R., Brusetti, L., Andrighetto, C. ve Lombardi, A. (2009), *Biochemical profiles, restriction fragment length polymorphism (RFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA) for typing Staphylococcus aureus isolated from dairy products*, Research in Veterinary Science, 88: 427-435.
- Mork, T., Jorgensen, H. J., Sunde, M., Kvitle, B., Sviland, S., Waage, S. ve Tollersrud, T. (2012), *Persistence of staphylococcal species and genotypes in the bovine udder*, Veterinary Microbiology, 159: 171-180.

- Oikonomou, G., Machado, V. S., Santisteban, C., Schukken, Y. H. ve Bicalho, R. C. (2012), *Microbial diversity of bovine mastitic milk as described by pyrosequencing of metagenomic 16S rDNA*, PLOS ONE, 7(10): 1-14.
- Ote, I., Taminiau, B., Duprez, J. N., Dizier, I. ve Mainil J. G., (2011), *Genotypic characterization by polymerase chain reaction of Staphylococcus aureus isolates associated with bovine mastitis*, Veterinary Microbiology, 153: 285-292.
- Özpulat, B. (2011), *Sığır mastitislerinden Streptococcus agalactiae, Streptococcus dysgalactiae ve Streptococcus uberis'in kültür ve moleküler yöntemlerle tanısı*, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Palazzo, I. C. V., Azevedo, P. A., Secchi, C., Pignatari, A. C. C. ve Darini, A. L. C. (2008), *Staphylococcus hominis subsp. novobiosepticus strains causing nosocomial bloodstream infection in Brazil*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 62: 1222-1226.
- Pankaj, Sharina, A., Chhabra, R. ve Sindhu, N. (2013), *Sub-clinical mastitis in Murrah buffaloes with special reference to prevalence, etiology and antibiogram*, Buffalo Bulletin, 32(2): 107-115.
- Paterson, G. K., Morgan, F. J. E., Harrison, E. M., Peacock, S. J., Parkhill, J., Zadoks, R. N. ve Holmes, M. A. (2013), *Prevalence and properties of mecC methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in bovine bulk tank milk in Great Britain*, J. Antimicrob. Chemother., doi:10.1093/jac/dkt417, 1-5.
- Pehlivanoğlu, F. (2011), *Mastitisli sığır sütlerinden izole edilen stafilocok türlerinde metisilin ve vankomisin dirençliliğinin fenotipik ve genotipik analizi*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- Petersson-Wolfe, C. S., Mullarky, I. K. ve Jones, G. M., *Staphylococcus aureus mastitis: Cause, detection, and control*, Virginia Cooperative Extension, Publication 404-229, 1-7.
- Piessens, V., Supre, K., Heyndrickx, M., haesebrouck, F., Vlieghe, S. D. ve Coillie, E. V. (2010), *Validation of amplified fragment length polymorphism genotyping for species identification of bovine associated coagulase-negative staphylococci*, Journal of Microbiological Methods, 80: 287-294.
- Pope, D. H., Smith, W. P., Swartz, W. ve Landau, J. V. (1974), *Role of bacterial ribosomes in barotolerance*, Journal of Bacteriology, 121(2): 664-669.
- Rainard, P., Corrales, J. C., Barrio, M. B., Cochard, T. ve Poutrel, B. (2003), *Leucotoxic activities of Staphylococcus aureus strains isolated from cows, ewes, and goats with mastitis: Importance of LukM/LukF'-PV leukotoxin*, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 10(2): 272-277.
- Rişvanlı, A. ve Kalkan, C. (2001), *İneklerde meme papillomatozisi ile mastitis arasındaki ilişki*, Vet. Bil. Derg., 17(3): 143-147.
- Ruoff, K. L., Ferraro, M. J., Jerz, M. E. ve Kissling, J. (1982), *Automated identification of gram-positive bacteria*, Journal of Clinical Microbiology, 16(6): 1091-1095.
- Sabour, P. M., Gill, J. J., Lepp, D., Pacan, J. C., Ahmed, R., Dingwell, R. ve Leslie, K. (2004), *Molecular typing and distribution of Staphylococcus aureus isolates in Eastern Canadian dairy herds*, Journal of Clinical Microbiology, 42(8): 3449.
- Sağlam, A. (2011), *Adana'da satışa sunulan dondurmalarda stafilokokkal enterotoksinlerinin varlığının saptanması ve Staphylococcus aureus identifikasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

- Sarıkaya, R. (2004), *Cryptosporidium türlerinin tanımlanmasında yeni bir yaklaşım: Ribotiplendirme*, Gazi Üniversitesi Kırşehir Eğitim Fakültesi, 5(2): 13-26.
- Schlichting, C., Branger, C., Fournier, J. M., Witte, W., Boutonnier, A., Wolz, C., Goulet, P. ve Döring, G. (1993), *Typing of Staphylococcus aureus by pulsed-field gel electrophoresis, zymotyping, capsular typing, and phage typing; resolution of clonal relationships*, Journal of Clinical Microbiology, 31(2): 227-232.
- Semacan, A., Uçan, U. S., Temimhan, S. M. ve Çizmeci, Ü. (2012), *Observations on trials of Potoclean as a teat-dipping disinfectant*, Eurasian J. Vet. Sci., 28(1): 54-56.
- Stephan, R., Annemüller, C., Hassan, A. A. ve Lammler, C. (2001), *Characterization of enterotoxigenic Staphylococcus aureus strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland*, Veterinary Microbiology, 78: 373-382.
- Stoakes, L., John, M. A., Lannigan, R., Schieven, B. C., Ramos, M., Harley, D. ve Hussain, Z. (1994), *Gas-liquid chromatography of cellular fatty acids for identification of Staphylococci*, J. Clin. Microbiol., 32(8): 1908-1910.
- Tenover, F. C., Arbeit, R., Archer, G., Biddle, J., Byrne, S., Goering, R., Hancock, G., Hebert, G. A., Hill, B. ve Hollis, R. (1994), *Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of Staphylococcus aureus*, Journal of Clinical Microbiology, 32(2): 407.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H. ve Swaminathan, B. (1995), *Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing*, Journal of Clinical Microbiology, 33(9): 2233-2239.

- Ünal, N. (2007), *İnsan ve hayvan kökenli Staphylococcus aureus izolatlarının fenotipik ve genotipik özellikleri üzerine çalışmalar*, Doktora Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale.
- Ünal, N. ve İstanbulluoğlu, E. (2009), *İnsan ve sığır kökenli Staphylococcus aureus izolatlarının fenotipik ve genotipik özelliklerinin araştırılması*, Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg., 56: 119-126.
- Vasudevan, P., Nair, M. K. M., Annamalai, T. ve Venkitanarayanan, K. S. (2003), *Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of Staphylococcus aureus for biofilm formation*, Veterinary Microbiology, 92: 179-185.
- Weller, T. M. A. (2000), *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus typing methods: which should be the international standard?*, Journal of Hospital Infection, 44: 160-172.
- Wu, Q., Li, Y., Hu, H., Wang, M., Wu, Z. ve Xu, W. (2012), *Rapid identification of Staphylococcus aureus: FISH versus PCR methods*, Lab Medicine, 43(6): 276-280.
- Yıldız, A. (2003), *Laktasyondaki subklinik ve klinik mastitisli sütçü ineklerde lincomycin- neomycin kombinasyonu ile mem içi tedavinin etkinliği*, F. Ü. Sağlık Bil. Dergisi, 17(1): 65-69.
- Zadoks, R. N., Leeuwen, W. B. van., Barkema, H. W., Sampimon, O. C., Verbrugh, H., Schukken, Y. H. ve Belkum, A. van. (2000), *Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiology of bovine and human Staphylococcus aureus*, Journal of Clinical Microbiol., 38(5): 1931-1939.
- Zhang, C., Song, L., Chen, H., Liu, Y., Qin, Y. ve Ning, Y. (2012), *Antimicrobial susceptibility and molecular subtypes of Staphylococcus aureus isolated from pig tonsils and cow's milk in China*, The Canadian Journal of Veterinary Research, 76: 268-274.

Zschöck, M., Kloppert, B., Wolter, W., Hamann, H. P. ve Lammler, Ch. (2005).
Pattern of enterotoxin genes seg, seh, sei and sej positive Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis, Veterinary Microbiology 108: 243-249.