



**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİK-YL-2015-0009**

**MASTITİSLİ SÜTLERDEN İZOLE EDİLEN
STAFİLOKOKLARIN
BİYOFİLM ÜRETME YETENEĞİNİN FENOTİPİK VE
GENOTİPİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Bahar KOÇ BÜYÜKTARAKÇI

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Serap SAVAŞAN**

AYDIN-2015

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİK-YL-2015-0009**

**MASTİTİSLİ SÜTLERDEN İZOLE EDİLEN
STAFİLOKOKLARIN
BİYOFİLM ÜRETME YETENEĞİNİN FENOTİPİK VE
GENOTİPİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Bahar KOÇ BÜYÜKTARAKÇI

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Serap SAVAŞAN**

AYDIN-2015

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Bahar KOÇ BÜYÜKTARAKÇI tarafından hazırlanan “MASTITİSLİ SÜTLERDEN İZOLE EDİLEN STAFİLOKOKLARIN BİYOFİLM ÜRETME YETENEĞİNİN FENOTİPİK VE GENOTİPİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI” başlıklı tez, 01/09/2015 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı ve Soyadı :

Üniversitesi :

İmzası:

1- Doç. Dr. Serap SAVAŞAN

ADÜ, Veteriner Fakültesi



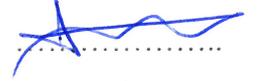
2- Doç. Dr. Alper ÇİFTÇİ

OMÜ, Veteriner Fakültesi



3- Yrd. Doç. Dr. Uğur PARIN

ADÜ, Veteriner Fakültesi



Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun Sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN
Enstitü Müdürü

Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

09100- AYDIN

Santral : (256) 218 20 00

Direkt Telefon : 218 20 44

Fax : (256) 218 20 44

ÖNSÖZ

İnsan sağlığı ve beslenmesinde büyük öneme sahip olan süt, meme dokusunda meydana gelen değişiklikler nedeni ile sağlıklı mastitisli süt haline gelir. Mastit sağmal hayvanlarda mikroorganizmalar tarafından oluşturulan, meme bezlerinde iltihaba neden olan, doku yangısı ile karakterize meme hastalığıdır. Gerek ülkemizde ve gerekse diğer ülkelerde süt sığırı yetiştiriciliğinde ekonomik kayıplara yol açtığı için önemli bir sorun oluşturmuştur.

Türkiye'de yılda 11 milyon ton süt üretildiği, süt ineklerinin % 30'unun mastitisli olduğu, mastitis nedeniyle süt verimindeki azalmanın %10 olduğu belirtilmektedir. Mastitisler toplam sığır hastalıklarının % 26'sını oluşturmaktadırlar. Ülkemizde önceki yıllarda yapılan araştırmalarda birçok mastitis vakası tespit edilmiş, tespit edilen vakaların çoğunluğunun subklinik olarak seyrettiği görülmüştür. Ülkemizde mastitisten kaynaklanan ekonomik kaybın yılda yaklaşık 57,7 milyon TL olduğu tahmin edilmektedir.

Ülkemizde mastitise neden olan etkenler üzerinde yapılan bakteriyolojik incelemeler sonucunda en fazla görülen bakteriyel mastitislerin stafilokok kökenli olduğu görülmüştür. İnsanlarda ve hayvanlarda infeksiyonlara neden olan tür öncelikle *S. aureus*'tur. Fırsatçı patojenler olan *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* da sıklıkla infeksiyon oluştururken; daha nadiren de olsa *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. saccharolyticus*, *S. cohnii* ve *S. simulans* da fırsatçı infeksiyonlara sebep olmaktadır. *S. aureus*, *S. auricularis*, *S. intermedius*, *S. hyicus* ve *S. caseolyticus* ise herhangi bir gruba sokulamamıştır.

Stafilokoklar, Gram pozitif, yuvarlak şekilli, 0.5 – 1.5 µm çapında sferik ya da oval, çoğunlukla düzensiz kümeler şeklinde, hareketsiz, sporsuz, fakültatif anaerobik ve katalaz aktivitesi pozitif bakterilerdir. İki türü *S. aureus subsp. anaerobius* ve *S. saccharolyticus* anaerobiktir ve katalaz negatiftir.

Stafilokoklardaki en önemli virulens faktörü slaym (biyofilm) üretimidir. Biyofilmler, mikroorganizmaların yüzeylere tutunması, çoğalmaları ve hücre dışı polimerler üretmeleriyle oluşmaktadır.

Biyofilm tabakası, içindeki bakterilerin çevre şartlarından etkilenmemesini sağlayan korunaklı bir yapıdır. Biyofilm içerisinde bulunan bakterilerin antibiyotiklere, planktonik formlarına göre daha dirençli oldukları bilinmektedir.

Mikrobiyal kökenli mastitis, tüm dünyada sığırcılığın en çok ekonomik kayba neden olan hastalığı olarak kabul edilmektedir. Klinik ve subklinik karakterde, akut ve kronik seyirli olabilen mastitisler, sığırlarda verim düşüklüğü, ürün kaybı ve tedavi masrafları nedeniyle ekonomik kayıplara yol açabildiği gibi, insan sağlığı açısından da risk oluşturabilmektedir. Biyofilm oluşturan stafilocok suşlarının en önemli özellikleri çoklu antibiyotik dirençli olmalarıdır. Bu aynı zamanda, yüksek mortalitenin de nedenlerinden birisi olarak düşünülmektedir. Biyofilm oluşturan bu türlerde meydana gelen yüksek dirençliliğin insan sağlığı için de risk teşkil edebileceği düşünülmektedir. Bu nedenle konu ile ilgili olarak daha detaylı araştırma ve denemelerin yapılması gerekmektedir.

Biyofilm üretimi stafilocoklarda önemli bir virulens faktörü olarak kabul edilmektedir. Stafilocoklarda biyofilm oluşumu, fenotipik ve genotipik olarak çeşitli yöntemlerle belirlenebilmektedir. Biyofilm, İca ve bap operonu tarafından kodlanan bir adhezindir. *ica* operonu ilk olarak *S epidermitis*'te tanımlanmış ve başlarda en çok bu tür üzerinde çalışılmıştır. Daha sonra *S aureus*' ta çalışmalara katılmıştır. Biyofilm koloni morfolojisi ile Kongo red agar ve Quantitative Microtitre plate tekniği ile fenotipik olarak belirlenebilmektedir. Bu bilgiler doğrultusunda bu tez çalışmasında, mastitisli sütlerden izole edilen stafilocokların biyofilm üretme yeteneğinin fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

Bu araştırma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: VTF-15045) tarafından desteklenmiştir

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL VE ONAY SAYFASI	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ÇİZELGELER	ix
ŞEKİLLER	x
1. GİRİŞ	1
1.1.Mastitis	1
1.1.1.Mastitisten Korunma Yöntemleri	2
1.1.2.Mastitisin Ekonomik Açıdan Önemi	3
1.1.3 Mastitite Neden Olan Mikroorganizmalar	4
1.2. Stafilokoklar	4
1.2.1.Stafilokokların Tarihçesi	4
1.2.2. Satafilokokların Sınıflandırılması	5
1.2.3.Stafilokokların Genel Özellikleri	6
1.2.4.Stafilokokların kültürleri, üremeleri, biyokimyasal özellikleri ve biyokimyasal testler	7
1.2.5. Stafilokokların Genom Yapıları	10
1.2.6.Stafilokokların Virulens Faktörleri	10
1.2.6.1. Hücre Duvarı	10
1.2.6.2. Kapsül	10
1.2.6.3. Yüzey proteinleri	10
1.2.6.4. Toksinleri	11
1.2.6.5. Enzimleri	11
1.2.6.5.1. Koagülaz	11
1.2.6.5.2. Katalaz	12
1.2.6.5.3.Fibrinolizin	12
1.2.6.5.4. Hiyalüronidaz	12
1.2.6.5.5. Termonükleaz	12
1.2.6.5.6. Lipaz	12
1.2.6.5.7. Deoksiribonükleaz	12
1.2.6.5.8. B- laktamazlar	12

1.2.7. Stafilokokların Neden Olduğu İnfeksiyonlar	14
1.2.8. Stafilokokların Tespitinde Kullanılan Biyokimyasal Testler	19
1.2.9. Stafilokokların Tespitinde Kullanılan Moleküler Yöntemler	20
1.3. Biyofilm	20
1.3.1. Biyofilm Yapısı ve Genel Özellikleri	20
1.3.2. Biyofilmin Tarihçesi	22
1.3.3. Biyofilmin Oluşumu	23
1.3.4. Biyofilm Oluşumunda “Quorum Sensing” Mekanizmaları	24
1.3.5. Biyofilm Oluşumundan Sorumlu Genler	25
2. GEREÇ VE YÖNTEM	27
2.1. Gereç	27
2.1.1. İzolasyon Örnekleri	27
2.1.2. Besiyerleri	27
2.1.2.1. Blood Agar (Merck 1. 10886)	27
2.1.2.2. Kongo Red Agar(CRA)	27
2.2. Yöntem	27
2.2.1. Örneklerin Alınması	27
2.2.2. Stafilokok Şüpheli Bakterilerin Belirlenmesi ve İdentifikasyon	27
2.2.2.1. Katalaz Testi	28
2.2.2.2. İzolatların <i>Staphylococcus</i> spp. ve <i>S.aureus</i> Yönünden PCR ile İdentifikasyonu	28
2.2.2.2.1. DNA Ekstraksiyonu	28
2.2.2.2.2. PCR Karışımı	28
2.2.2.2.3. Amplifikasyon Koşulları	28
2.2.2.2.4. DNA Agaroz Jel Elektroforezi	28
2.2.2.2.5. Görüntüleme ve Değerlendirme	29
2.2.3. Biyofilm Üretiminin Belirlenmesi	29
2.2.3.1. Biyofilm Üretiminin Fenotipik Olarak Belirlenmesi	29
2.2.3.2. Biyofilm Üretiminin Genotipik Olarak Belirlenmesi	29
2.2.3.2.1. Biyofilm Üretiminin Genotipik Tespiti	29
2.2.3.2.1.1. PCR Karışımı	30
2.2.3.2.1.2. Amplifikasyon Koşulları	30
2.2.3.2.1.3. DNA Agaroz Jel Elektroforezi	30
2.2.3.2.1.4. Görüntüleme ve Değerlendirme	30

2.2.3.2.1.6. Görüntüleme ve Değerlendirme	30
3. BULGULAR	31
3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları	31
3.2. Biyofilm Üretiminin Fenotipik İncelenmesine Ait Bulgular	32
3.3. PCR Bulguları	33
4. TARTIŞMA	41
5. SONUÇ	44
ÖZET	45
SUMMARY	46
KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ	54
TEŞEKKÜR	55

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bap :	Biofilm associated protein
Bbp :	Bone sialoprotein-binding protein
BHI :	Brain heart infusion
ClfA :	Clumping factor A
ClfB :	Clumping factor B
CMT :	Kaliforniya mastitis testi
CRA :	Congo Red Agar
CRF:	Koagulaz aktifleştirici faktör
DNA:	Deoksiribonükleik asit
EDTA:	Etilendiamin tetraasetik asit
EtBr :	Ethidium bromide
FnbA :	Fibronectin binding protein A
FnbB :	Fibronectin binding B
GN:	Gümüş nitrat
Ig:	İmmunoglobulin
İca :	Intercellular adhesion
Kbp :	Kilo-base pair
KNS (CNS):	Koagulaz Negatif Stafilokoklar
KPS (CPS) :	Koagulaz Pozitif Stafilokoklar
MRSA:	Metisilin Dirençli <i>S. aureus</i>
MSCRAMM :	Microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules
MSA :	Mannitol Salt Agar
MSS:	Metisiline Hassas Stafilokok
PCR (PZR):	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PCR-RFLP:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu- Kısıtlı Fragment Uzunluk Polimorfizmi
PIA :	Polysaccharide intercellular adhesin
PNAG :	Poly-N-acetyl-beta-1-6-glucosamine
SAK :	Stafilokinaz
SEM:	Scanning Electron Microscope
SPA:	Staphylokokkal Protein A
SSSS:	Stafilokokal Haşlanmış Deri Sendromu

STSS:	Stafilokokal Toksik Şok Sendromu
Taq:	Thermus aquaticus
TEM:	TransmissionElectronMicroscope
TSA:	Trypticase Soy Agar
TSST-1:	Toksik Şok Sendromu Toksin-1
QS :	Quorum - sensing

ÇİZELGELER

	Sayfa
Çizelge 1. 1. Stafilokokların Sınıflandırılması	5
Çizelge 1.2. Stafilokokların biyokimyasal idendifikasyon şeması	8
Çizelge 1. 3. <i>S. aureus</i> ' un bazı özellikleri	9
Çizelge 1.4. <i>S. aureus</i> 'un virulens faktörleri	12
Çizelge 1.5. Koagulaz Pozitif Stafilokoklar ve Klinik Önemleri	15
Çizelge 1.6. Stafilokok Tür ve Alt Türleri İle Tanımlandıkları Konaklar	17
Çizelge 2.1 Çalışmada kullanılan primer setler	29
Çizelge 3.1. Sütlerden İzole Edilen Suşlarda İdentifikasyon Bulguları	32
Çizelge 3.2. İzole edilen suşlarının 16SrRNA, <i>nuc</i> , <i>ica A</i> ve <i>ica D</i> genleri bakımından PCR' da değerlendirme sonuçları	34

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil.1.1. <i>Staphylococcus spp.</i>	6
Şekil 1.2. Stafilokoklarda Biyofilm Oluşum Modeli	24
Şekil 3.1. Kanlı agara yapılan ekim sonucu üreyen saflaştırılmış Gram pozitif koloniler	31
Şekil 3.2. Stafilokok suşlarının biyofilm oluşturma yeteneği bakımından Kongo Red Agarda incelenmesi	33
Şekil:3.3. 16S rRNA, <i>nuc</i> , <i>icaA</i> ve <i>icaD</i> genlerinin PCR çalışması bulguları	40

1.GİRİŞ

İnsan sağlığı ve beslenmesinde büyük öneme sahip olan sütün, sağlıklı olarak elde edilmesi gerekmektedir. Bu da sütü meydana getiren memenin sağlıklı olmasına bağlıdır. Çeşitli nedenler sonucu meme dokusunda meydana gelen değişiklikler nedeni ile anormal sütler üretilir. Bunlardan bir tanesi de mastitisli stlerdir. Çünkü mastitise bağlı olarak kan damarlarının geçirgenliği artar ve kan içeriğinde bulunan bazı iyon, proteinler, yangı hücreleri süte geçer, sentez mekanizmasının aktifliğinin değişmesi sonucunda süt verimi düşer, hücreler yıkımlanır, peynir altı protein oranı artacağı için süt kalitesi olumsuz etkilenir. Mastitisli sütlerin tadı, klorürlerin miktarının artışından dolayı tuzlu ve acıdır (Topuzoğlu, 2011).

1.1.Mastitis

Mastitis, Yunanca ‘‘mastos’’ (meme) ve ‘‘itis’’ (yangı) kelimelerinden köken almaktadır (Topuzoğlu, 2011).

Mastit sağmal hayvanlarda mikroorganizmalar tarafından oluşturulan, meme bezlerinde iltihaba ve yangıya neden olan bir hastalıktır. Ülkemizde ve birçok diğer ülkede hem süt üretimi hem de sığır yetiştiriciliğinde ekonomik olarak kayıplara yol açtığı için önemli bir problem haline gelmiştir (Mc Donald JS.1979, zdemir M. 2005).

Hayvanlarda görülen fiziksel, kimyasal, bakteriyolojik ve patolojik farklılıklar klinik, subklinik ve nonspesifik gibi farklı farklı tarzda mastitis formlarının ortaya çıkmasına neden olmuştur (Topuzoğlu, 2011).

Klinik mastitislerde memede şişlik, ağrı, kızarıklık, sıcaklık artışı ve duyarlılık gibi değişiklikler olur. Bunun dışında hayvanda ateş, halsizlik, memede sarımsı bir akıntı gibi belirtiler meydana gelir (Anonim3, Haziran 2005).

Subklinik karakterde olan mastitis ise bölgesel belirti göstermeden seyreder ancak sütteki lökosit sayısında artış gibi klinik yöntemler ile fark edilebilir. Sürüde hastalık olduğu halde gözlemlenemez (Yeşilmen S. ve ark. 2012). Subklinik mastitis; emzirme dönemi boyunca meme dokusu içinde ilerleyebilmesine rağmen görünür bir endikasyon oluşturmadığı için zor tespit edilir (Xu Wei ve ark. 2015). Bu tip hayvanlardan elde edilen süt miktarında bir azalma vardır, süt normal görünümdedir ancak süt içeriğinde değişiklikler meydana gelmiştir. Sütteki kan proteinlerinin ve beyaz kan hücrelerinin sayısı

artmaktadır. Çeşitli süt bileşenlerinin değişikliği mastitis göstergesi olarak kabul edilebilir. Subklinik mastitislerin tanısı ancak, süt içinde SHS'ndaki artışın ortaya konulması, bakteriyolojik izolasyon gibi laboratuvar yöntemlerinin yardımı ve 15 günde bir uygulanan CMT (Kaliforniya mastitis testi) ile yapılmaktadır (Sørensen L. P. ve ark. 2015).

Mastitisin bulaşma kaynakları;

- 1.Sürüde bulunan mastitisli hayvanlar
2. Meme başı yaraları
- 3.Ahır ve barınak yapısı
- 4.Memelerin büyük ve sarkık olması
- 5.Hormonal düzensizlikler
- 5.Sağım makinalarının düzensiz çalışması
- 6.Genetik etmenler
- 7.Beslenme yanlışlığı
- 8.Yanlış sağım
- 9.Mevsimsel etkiler
- 10.Sağım sırasında yeterince steril olunmaması (Anonim3 Haziran 2005, Anonim4 2008)

1.1.1.Mastitisten Korunma Yöntemleri

Hijyen mastitisten korunmanın en önemli koşuludur. Memeler hem sağımdan önce hem de sonra mutlaka yıkanmalıdır.

Ahırın temizliğine önem gösterilmeli, hayvanlar temiz olmayan zeminde barındırılmamalı, genç ve yaşlı hayvanlar birbirinden ayrılmalı, eğer memede kalıtsal bir bozukluk varsa bu hayvanlar ayıklanmalıdır.

Elle yapılan sağımlarda el temizliğine dikkat edilmeli, memede süt bırakılmamalıdır. Makineli sağımlarda her sağımdan sonra başlıklar dezenfektanla

temizlenmelidir. Sağım sonrasında meme başları antiseptik bir sıvıya batırılarak temizlenmelidir. Sağımdan sonra kuruya çıkan hayvanların laboratuvar sonuçlarına bakılarak; geniş spektrumlu, memede uzun süre kalabilen bir antibiyotik verilmeli ve mastitis için aşılama yapılarak nlem alınmalıdır (Tekeli T. ve ark.1985, Anonim2 2009, Anonim1 2012).

1.1.2.Mastitisin Ekonomik Açıdan nemi

Mastitis, azalan süt verimine, tedavi giderlerinin artmasına, hayvanların kesilme oranının artmasına ve ölümlere sebep verdiği için sığır yetiştiriciliğinde yüksek oranda ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Halasa T. ve ark. 2007).

1990 yılından günümüze kadar mastitis ve mastitis ekonomisi üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Mastitisler klinik veya subklinik karakterde ve akut veya kronik seyirli olabilir. Süt veriminde azalmaya, yüksek tedavi masraflarına ve verimli hayvanların sürüden ayıklanmasına neden olduğu için büyük ekonomik kayıplar oluşturmakta ve süt ineklerinde görülen en masraflı ve en önemli hastalıklardan biri olarak kabul edilmektedir. Sonuçta hayvan elden çıkarılmak zorunda kalır veya hastalık bazen de hayvanın ölümüyle sonuçlanır (Anonim4, 2008). Mastitisin kontrolu zor olduğu için yakın gelecekte de bu etkilerinin devam edeceği düşünülmektedir (Halasa T. ve ark. 2007, okal Y. 2012).

ABD’nde mastitis nedeniyle meydana gelen yıllık zararın 185 \$/inek olmak üzere (Schroeder.1997), toplam 2 milyar dolar; Japonya’da yıllık yaklaşık 69 milyar yen zarar oluşturduğu (Sugimoto ve ark.2006); İngiltere’de ise 300 milyon sterlin olduğu tahmin edilmektedir (Hillerton ve Berry.2005).

Türkiye’de yılda 11 milyon ton süt üretildiği, süt ineklerinin ortalama % 30’unun mastitisli olduğu, mastitis nedeniyle süt verimindeki azalmanın yaklaşık %10 olduğu görülmektedir. Mastitisler toplam sığır hastalıklarının % 26’sını oluşturmaktadırlar. Ülkemizde nceki yıllarda yapılan araştırmalarda birçok mastitis vakası tespit edilmiş, tespit edilen vakaların çoğunluğunun subklinik olarak seyrettiği görülmüştür (zdemir M. 2005, Yeşilmen S. ve ark. 2012). Ülkemizde mastitiste bağlı ekonomik kaybın yılda yaklaşık 57,7 milyon TL olduğu tahmin edilmektedir (okal Y. 2012).

1.1.3 Mastitise Neden Olan Mikroorganizmalar

Mastitise neden olan etmenler için 130'dan fazla farklı ajanın izole edildiği ve enfeksiyona daha çok bakteriyel etkenlerin neden olduğu bildirilmektedir. Bulaşıcı ve çevresel kaynaklı olarak gruplanan bu bakteriyel patojenler arasında stafilocoklar, streptokoklar, çeşitli Gram negatif bakteriler ve başta *Escherichia coli* olmak üzere enterobakteriler daha sık izole edilmektedir (Hillerton ve Berry, 2005). Bununla beraber, maya ve küf izolasyonları da gerçekleşmektedir (Çokal Y. 2012).

Ülkemizde mastitise neden olan etmenler üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda mastitise en çok stafilocok kökenli bakterilerin neden olduğu görülmüştür (Özdemir M. 2005).

1.2. Stafilocoklar

Stafilocoklar genellikle cerrahi ve cilt enfeksiyonlarına, solunum hastalıklarına ve gıda zehirlenmesine yol açan Gram pozitif, küresel bir bakteri cinsidir (Licitra G. 2013).

1.2.1. Stafilocokların Tarihçesi

Stafilocok Yunanca 'staphyle' (üzüm salkımı) ve 'coccus' (tane) kelimelerinden köken almaktadır (Licitra G. 2013)

Stafilocoklar ilk olarak Robert Koch (1843-1910) ve Louis Pasteur (1822-1895) tarafından tanımlanmıştır ancak ilk detaylı çalışmalar İskoçyalı cerrah Sir Alexander Ogston (1844-1929) tarafından gerçekleştirilmiştir (Stenholm T. 2012). Ogston Stafilocokları ilk kez 1880 yılında diz eklemine operasyon sonrası oluşan bir apseden aldığı örnekte gözlemlemiş ve bu bakteriye, benzerliğinden dolayı Yunancada üzüm salkımı anlamına gelen *Staphylococcus* adını vermiştir. 1884 yılında Alman hekim Friedrich Julius Rosenbach bakteriyi koloni renklerine göre *S. aureus* (altın) ve *S. albus* (beyaz) olarak ikiye ayırmıştır. *S. albus* insan derisindeki yaygınlığından dolayı sonradan *S. epidermidis* olarak tekrar adlandırıldı (Licitra G. 2013, Orenstein A.).

Bakteride 1900 yılında alfa toksini, 1935 yılında ise beta toksini, 1938'de gama ve 1947'de de delta toksini bulunmuştur. 1978'de bakterinin "Toksik Şok Sendromu" adında yeni bir hastalığa neden olduğu bulunmuştur.

1.2.2. Stafilokokların Sınıflandırılması

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'nin son baskısına göre stafilokoklar Staphylococcaceae familyasında yer almaktadır.

Stafilokoklar *Micrococcaceae* ailesine ait olup, fakültatif anaerobik, gram pozitif, katalaz pozitif koklardır. Deri ve mukoz membranların zararsız kommensalleridir ancak insanlar ve diğer pek çok hayvan çeşidi için potansiyel patojendirler (Blunt ve ark. 2013).

Çizelge 1. 1. Stafilokokların Sınıflandırılması (Todar K)

Domain	<i>Bacteriae</i>
Alem	<i>Eubacteria</i>
Bölüm	<i>Firmicutes</i>
Sınıf	<i>Bacilli</i>
Takım	<i>Bacillales</i>
Aile	<i>Staphylococcaceae</i>
Cins	<i>Staphylococcus</i>
Tür (insan ve hayvanlarda hastalık yapan en önemli türler)	<i>S. aureus, S. epidermidis, S. saprophyticus, S. haemolyticus, S. lugdunensis</i>

Bugüne kadar yapılan çalışmalar sonucunda *Staphylococcus* cinsine ait 33 tane tür ve 17 tane alt tür olduğu belirtilmiştir. Stafilokoklar fenotipik özellikleri ve DNA/DNA ilişkileri göz önünde bulundurularak en az dört grup altında toplanabilirler:

1. *S. epidermidis* grubu: *S. capitis, S. epidermidis, S. haemolyticus, S. saccharolyticus, S. warneri, S. hominis*

2. *S. saprophyticus* grubu: *S. cohnii, S. saprophyticus, S. xylosus*

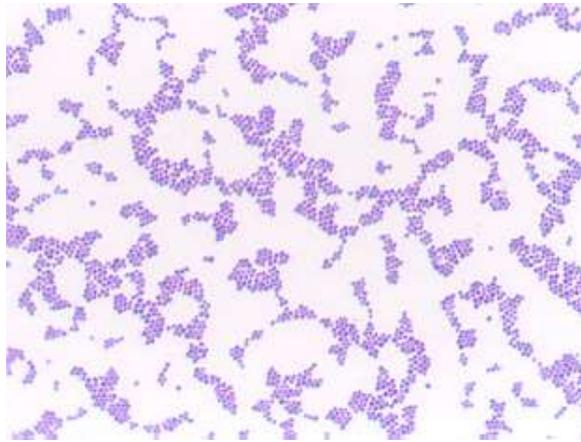
3. *S. simulans* grubu: *S. carnosus*, *S. simulans*

4. *S. sciure* grubu: *S. lentus*, *S. sciure* (Tünger A. 2004)

Günümüzde yapılan genotipik ve kemotaksonomik çalışmalar birçok yeni türünün varlığını saptamamıza yardımcı olmaktadır. Günümüzde *Staphylococcus* genusu içinde 40 tür ve 24 alt tür tanımlanmıştır (Türkel C.Ş. 2012).

1.2.3. Stafilokokların Genel Özellikleri

Stafilokoklar, Gram pozitif bakterilerdir. Yuvarlak şekilli, 0.5 – 1.5 µm çapında sferik ya da oval, çoğunlukla düzensiz kümeler şeklinde, hareketsiz, sporsuz, fakültatif anaerobik ve katalaz aktivitesi pozitif bakterilerdir. Anaerobik ve katalaz negatif olan iki türü vardır. Bunlar *S. aureus subsp. anaerobius* ve *S. saccharolyticus* 'tur (AK Ö. ve ark 2004). Sitokrom bulundurmalarına rağmen çoğunluğu oksidaz negatiftir. Nitriti nitrate dönüştürürler. Kapsül kültürün ilk dönemlerinde (3-4 saatlik dönemde) oluşur. Kültür süresinin uzadığı durumlarda kapsül oluşumu görülmemektedir. İki türü *S. aureus subsp. anaerobius* ve *S. saccharolyticus* anaerobiktir ve katalaz negatiftir (Alen ve ark 2008, Bannerman 2006). Birçok ortamda kolay ürerler ve aktif metabolizmaya sahiptirler. Stafilokokların ideal üreme sıcaklıkları 37°C civarındadır. Laboratuvarlarda besiyerlerinde 37°C'de 24-48 saat inkübasyon süresinde üreme gözlenir. Kolonileri düzgün ve ortalama 2-4 mm çapındadır. Karbonhidrat fermentasyonu gözlenebilir. Pigment üretimi sonucu farklı renkte koloniler oluşturabilirler. Örneğin *S. aureus* altın sarısı, *S. epidermidis* ise beyaz renkte koloni oluşturur. Eğer anaerobik şartlar mevcutsa pigment oluşturamazlar (Tanrıbuyurdu E. 2014).



Şekil.1.1. *Staphylococcus spp.*

S. aureus kolonileri geniş, düz, hafif kabarık, sarımsı renkte, yarı şeffaftır ve kanlı agarda beta hemoliz göstermektedirler.

Bazı stafilokoklar insan ve hayvan derilerinde normal flora bakterisi olarak yaşarken bazıları ise irinli enfeksiyonlara, apse oluşumuna ve hatta ölümlere sebep olmaktadır.

Genellikle stafilokoklar konak canlı ile simbiyotik ilişkiye sahiptirler. Eğer deri ve mukozada bir travma oluşumu varsa ya da cerrahi bir operasyon gerçekleştiyse stafilokoklar dokuya girer ve patojen olabilirler (Bannerman 2003).

İnsanlarda ve hayvanlarda enfeksiyonlara neden olan en önemli tür *S. aureus*' tur. *S.epidermidis* ve *S.saprophyticus* fırsatçı patojenlerdir ve genellikle enfeksiyon oluşumuna sebep olurlar. *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S.saccharolyticus*, *S.cohnii* ve *S.simulans* fırsatçı patojenlerdir ancak daha az enfeksiyona neden olurlar. *S.aureus*, *S. auricularis*, *S.intermedius*, *S.hyicus* ve *S.caseolyticus* ise herhangi bir gruba dahil edilmemiştir (Uçan N. 2014).

1.2.4.Stafilokokların kültürleri, üremeleri, biyokimyasal özellikleri ve biyokimyasal testler

Stafilokokların sınıflandırmasında koagülaz üretimi en önemli biyokimyasal özelliklerdendir. Stafilokoklar; koagülaz pozitif (CPS) ve koagülaz negatif (CNS) olarak ikiye ayrılır. *S. aureus*, koagülaz pozitif ve en önemli patojendir. Diğer koagülaz pozitif olanlar *S. aureus*, *S. schleiferi subsp. coagulans*, *S. aureus subsp. anaerobius*, *S. delphini*, *S. hyicus* ve *S. intermedius* 'tur. Koagülaz negatif stafilokoklar daha önceleri sadece normal flora bakterisi olarak görülürken günümüzde zararlı etkilerinin de olduğu bilinmektedir. Koagülaz-negatif stafilokoklar da sığır mastitisine neden olabilmektedirler (Taponen ve Pyorola 2000) .

Stafilokoklar normal laboratuvar besi yerlerinde kolayca ürerler. 37°C stafilokokların ideal üreme sıcaklığıdır. Bunun yanında 10-48 °C arasında toksin oluşturabilmektedirler.

Stafilokoklar yüksek NaCl derişimlerinde (% 10-15) üreyebilirler, bununla birlikte kanlı agar, nutrient agar, triptik soy agar veya beyin kalp infüzyon agar gibi birçok besiyerinde de ürerler. Ancak kanlı besiyerlerinde daha iyi çoğalırlar. Kanlı besiyerinde,

yuvarlak, düzgün, 1-4 mm çapında, konveks ve parlak koloniler oluştururlar. *S. aureus* kolonisi altın sarısı renğinde, *S. epidermidis* kolonisi ise beyaz renktedir.

S. aureus yüksek tuz yoğunluğunda üreyebilir. *S. aureus* diğer stafilocoklardan Mannitol Salt Agar'da koloniler etrafında sarı bir hale oluşturmasıyla ayrılır. Fakat *S.saprophyticus* gibi diğer bazı stafilocoklar da MSA'da benzer koloniler oluşturabilirler.

Patojen olan stafilocok suşlarında pigment ve hemoliz görülebilir. Patojenik stafilocok suşlarının ayırımında özel besiyeri olarak DNase testi için DNase agardan yararlanılır. Stafilocoklar genel sıvı besi yerlerinde 24 saatlik inkübasyon sonunda orta dereceden koyuya kadar değişen bir bulanıklık oluşturur. Sıvı besiyerinde üreyen stafilocoklar pigment oluşturmazlar.

Genellikle aerobtururlar. *S. saccharolyticus* ve *S. aureus subsp. anaerobius* türleri zorunlu anaerobtururlar. Fakültatif anaerob türleri de bulunmaktadır. Anaerobik ortamda glukozdan asit oluşumu gözlenmektedir.

MacConkey agarda da üreme yeteneğine sahiptirler. Patojen stafilocoklar kültür ortamında +4' °C de 2-3 ay, -20 °C de ise 3-6 ay canlı kalabilirler.

Stafilocoklar, sporsuz olmalarına rağmen dış etkenlere ve dezenfektanlara karşı en çok dayanabilen bakterilerdir. 60' °C ye 30 dakika civarında dayanabilirler. Sodyum klorürün %9'luk konsantrasyonlarına ve sakkaroz toleranslıdır. %2'lik fenolde 15 dakikada inaktive olurlar. Buna karşın alkol ve iyot gibi antiseptiklere de oldukça duyarlıdır (Koneman ve ark. 2006).

Çizelge 1. 2. Stafilocokların biyokimyasal identifikasyon şeması

REAKSİYON	<i>S. aureus</i>	<i>S. hyicus subsp. Hyicus</i>	<i>S.hyicus subsp. chromogenes</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>
Katalaz	+	+	+	+	+	+
Koagülaz	+	d	-	+	-	-
Clumping	+	d	?	d	-	-

faktör						
Hemoliz	+	d	D	+	d	?
Mannitol Aerobik	+	-	-	+	-	D
Mannitol Anaerobik	+	-	D	-	-	-
Glukoz	+	+	+	+	+	+
Termonükleaz	+	+	-	+	-	-
Hyaluronidaz	+	+	-	-	-	?
Protein A	+	+	?	D	-	?
Tellürit reaksiyonu	+	d	?	-	-	?
Pigment oluşumu	+	-	+	-	-	-
Dnase	+	?	?	?	-	-

d: değişken ; ? bilgi yok

Çizelge 1. 3. *S. aureus* ' un bazı özellikleri

Özellik	<i>S. aureus</i>	Özellik	<i>S. aureus</i>
Aerobik ortamda üreme	+	Ksiloz	-
Anaerop ortamda üreme	+	Sellobioz	-
Hemoliz	+	Glikoz	+
Koagulaz	+	Hücre duvarı	
DNA' ase (Endonükleaz)	+	Ribitol	+
TMPA' da renk değişikliği	+	Gliserol	-
Asetoin	+	Protein A	+
Mannitol (asit oluşturma)	+	Alfa toksin	+
Trehaloz	+	Novobiosin duyarlılığı	+
Maltoz	+	Basitrasin duyarlılığı	-
Laktoz	+		

1.2.5. Stafilokokların Genom Yapıları

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

1.2.6. Stafilokokların Virulens Faktörleri

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

1.2.6.1. Hücre Duvarı

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

1.2.6.2. Kapsül

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

1.2.6.3. Yüzey proteinleri

S. aureus'un kolonizasyon sürecini başlatan konakçı hücre yüzeyine tutunması bazı adhesinler aracılığıyla olur. *S. aures* adhesinlerinin büyük bir sınıfı hücre

peptidoglikanlarına tutunan ortak Protein A (SpA) olarak isimlendirilen proteinleri içerir. Protein A IgG3 hariç diğer IgG' lerle, IgA2 ile bazı IgM'lerin Fc reseptörleri ile birleşebilmektedir. Bu nedenle protein A'nın antikomplemanter ve antifagositer etkinliği vardır.

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

Diğer stafilokoksik yüzey proteinleri; fibronectin bağlayıcı proteinler A ve B (FnbpA ve FnbpB), kollojen bağlayıcı protein, elastin bağlayıcı protein ve kümeleştirici faktör (Clf) A ve B proteinleridir. Kimyasal yapıları ve hücre duvarı yerleşimleri birbirlerine benzer olan bu proteinler; stafilokokların konak dokularında kolonize olmasında önemli rol oynamaktadır (Sareyyüpoğlu B, 2013).

1.2.6.4. Toksinleri

Stafilokokların hücre zarına etkili olduğu bilinen 5 sitotoksini vardır. Bunlardan alfa, beta, delta ve gama toksinleri hemolizin özelliğindedir.

Leukosidin adlı toksin lökositler üzerine etkilidir. Eksfoliatif toksin Dermatitislere neden olur. Toksik şok sendrom toksin-1(TSST-1) insanlarda toksik şok sendromunun nedenidir.

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

1.2.6.5. Enzimleri

1.2.6.5.1. Koagülaz (*S. aureus*) : Coagulase-Reacting faktör ile birleşerek aktifleşir ve inaktif olan fibrinojeni fibrine dönüştürerek plazmayı pıhtılaştırır. Ekstraselluler bir proenzimdir. *S.aureus* için, patojen olan-olmayan stafilokok ayrımı yapılır. Mikroorganizma fibrin ile kaplanma sonucu opsonizasyondan ve fagositozdan korunabilir ve bu da patojenliğine katkı sağlamış olur.

1.2.6.5.2. Katalaz (Tüm stafilokoklar): Zehirli olan hidrojen peroksidi zehirli olmayan oksijen ve suya dönüştürür. Bakteriler, bu enzim sayesinde toksik oksijen radikalleri tarafından öldürülmeye karşı direnç kazanır.

1.2.6.5.3. Fibrinolizin (S. aureus): (Stafilokinaz (SAK)) Fibrin pıhtısının çözülmesine neden olur. Plazminojen aktivatörüdür. Fagositoz için önemli komponentler olan IgG ve C5 gibi opsoninlerin parçalanmasını sağlayarak antiopsonik bir etki gösterir ve bakteriyi fagositozdan korur.

1.2.6.5.4. Hiyalüronidaz (S. aureus): Hücreler arası mukopolisakkaritleri parçalayarak konakçı dokularında stafilokokların yayılmasına ve gelişmesine katkıda bulunur.

1.2.6.5.5. Termonükleaz (Stafilokokal nükleaz): Isıya dirençli bir enzimdir. Endo ve ekzonükleolitik özellikleri olan fosfodiesteraz yapısındadır. Konakçı hücrelerin DNA ve RNA'sını hidrolize edebilir.

1.2.6.5.6. Lipaz (S. aureus ve bazı koagulaz negatif stafilokoklar): Ekstrasellüler bir enzimdir. Yağları hidrolize ederek vücudun yağ içeren bölgelerinde stafilokokların yaşamasını sağlar.

1.2.6.5.7. Deoksiribonükleaz (DNase) (S. aureus): Nükleik asitleri fosfomononukleotidlere parçalayan fosfodiesterazlardır. Endo ve ekzonükleaz aktivitesine sahiptir.

1.2.6.5.8. B- laktamazlar (Penisilinaz): Penisilini, penisiloina hidroliz eden ve Stafilokoklarda penisilin direncine neden olan enzimdir..

Çizelge 1.4. S. aureus'un virulens faktörleri (Cengiz ve ark 2004)

	Kapsül	Kemotaksisi, fagositozu ve mononükleer hücrelerin proliferasyonunu inhibe eder, aderasını kolaylaştırır.
	Peptidoglikan	Osmotik dengeyi korur, endojen pirojenlerin üretimini stimüle eder (endotoksine benzer aktivite). Lökosit kemoatraktandır.

YAPISAL BİLEŞENLER		Fagositozu inhibe eder.
	Teikoik asit	Hücre membranındaki katyonik konsantrasyonu düzenler, fibronektine bağlanır.
	Protein A	IgG1, IgG2 ve IgG4'ün Fc reseptörlerine bağlanarak antikor aracılı atılımı(klirensi) inhibe eder, lökosit kemoatraktanıdır
	Sitoplazmik membran	Osmotik bariyerdir, hücre içi ve dışına transportu düzenler, biyosentetik ve solunum enzimlerinin içerir.
TOKSİNLER	Sitotoksinler (α, β, γ, P-V lökositidin)	Lökosit, eritrosit, makrofaj, trombosit ve fibroblastları içeren birçok hücreye toksik etki gösterir.
	Eksfoliatif toksin (ETA, ETB)	Serin proteazlar, epidermisin stratum granulosum tabakasındaki interselüler köprülerin ayrılmasına neden olurlar.
	Enterotoksinler (A-E, G-I)	Süperantijenlerdir (sitokin salınımını ve T hücrelerin proliferasyonunu stimüle ederler); mast hücrelerinden inflamatuvar mediatörlerin salınımını uyarırlar; bulantı-kusma, intestinal peristaltizmde artma ve sıvı kaybına neden olurlar
	Toksik Sok Sendrom Toksin-1	Süperantijendir. Endotelial hücrelerde sızıntı veya hücre yıkımına neden olurlar.

ENZİMLER	Koagulaz	Fibrinojeni fibrine çevirir.
	Katalaz	Hidrojen peroksiti su ve oksijene katalize eder.
	Hyaluridaz	Bağ dokuda bulunan hyaluronik asitin hidrolizi ve mikroorganizmanın dokuda yayılımının kolaylaştırılmasını sağlar.
	Fibrinolizin	Fibrin kümesinin çözülmesini sağlar.
	Lipaz	Lipitleri hidrolize eder.
	Nükleaz	DNA'yı hidrolize eder
	Penisilinaz	Penisilini hidrolize eder.

1.2.7.Stafilokokların Neden Olduğu İnfeksiyonlar

Stafilokoklar hayvanlarda ve insanlarda çeşitli toksinler üreterek birçok hastalığa neden olabilirler. Bunlardan birkaç tanesi fronkül, karbonkül, panaris, hidrozadenit, sellülit, blefarit, arpacık, impetigo, Stafilokoklara bağlı haşlanmış deri sendromu (SSSS) deri infeksiyonlarıdır. Solunum sisteminde farinjit, tonsilit, stafilokok anjinleri, akut sinüzit, pnömoni, akciğer absesi gibi infeksiyonlar oluştururlar. *S. aureus* ayrıca toksik şok sendromundan (STSS) da sorumlu olabilir. Ayrıca piyemi diye adlandırılan bir çeşit septisemiye de yol açabilir. Diğer sistem ve organlara yerleşerek; mastitis, perikardit, osteomyelit, artrit, miyozit, protez eklem infeksiyonu, Tromboflebit, otitis media, menenjit, beyin absesi, parotit, prostatit, perinefritik abse gibi hastalıklara neden olurlar. Uygun olmayan şartlarda saklanan yiyeceklerde üreyerek besin zehirlenmelerine yol açabilirler.

Çizelge 1.5. Koagulaz Pozitif Stafilokoklar ve Klinik Önemleri (Quinn ve ark.2011)

TÜRLER	HASTALIKLAR / İZOLE EDİLEN YERLER	
	KONAKLAR	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Sığır	Mastitis, impetigo
	Koyun	Mastitis, dermatitis, kene piyemisi, benign folikülitis
	Keçi	Mastitis, dermatitis
	Domuz	Meme bezlerinde botriyomikoziz Meme bezlerinde impetigo
	At	Mastitis
	Kedi, Köpek	Piyoderma, endometritis, sistitis, otitis eksterna ve diğer irinli durumlar
	Kümes hayvanları	Artitis ve septisemi, bumblefoot, omfalitis
<i>S. pseudintermedius</i>	Köpek	Piyoderma, endometritis, sistitis, otitis eksterna ve diğer irinli durumlar
	Kedi	Çeşitli pyojenik durumlar
	At	Nadiren

	İnek	Nadiren
<i>S. hyicus</i>	Domuz	Eksudatif epidermitis, artritis
	Sığır	Mastitis
<i>S. intermedius</i>	At	Burun
	Güvercin	Üst solunum yolları
	Köpek, Kedi	Piyoderma, otitis eksterna, sistitis
<i>S. aureus subsp. Anaerobius</i>	Koyun	Lenfadenitis
<i>S. delphini</i>	Yunus	İrinli deri lezyonları
	At	Burun
	Güvercin	Üst solunum yolları
<i>S. lutrae</i>	Samur	Patojenik önemi belirsiz
<i>S. schleiferi subsp. Coagulans</i>	Köpek	Otitis eksterna

Çizelge 1.6. Stafilokok Tür ve Alt Türleri İle Tanımlandıkları Konaklar (Lister 2000).

TÜRLER ve ALT TÜRLER	KONAKLAR
<i>Staphylococcus aureus</i>	İnsan, memeli türleri, kus
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	İnsan, evcil hayvanlar
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	İnsan, memeli türleri
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	İnsan, evcil hayvanlar, maymun türleri
<i>Staphylococcus warneri</i>	İnsan, evcil hayvanlar, maymun türleri
<i>Staphylococcus hominis</i>	İnsan
<i>Staphylococcus simulans</i>	İnsan, memeli türleri
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	İnsan
<i>Staphylococcus capitis</i>	
<i>S.capitis subsp. capitis</i>	İnsan
<i>S.capitis subsp. Ureolyticus</i>	İnsan ,maymun türleri
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	
<i>S.schleiferi subsp. schleiferi</i>	İnsan
<i>S.schleiferi subsp. Coagulans</i>	Köpek

<i>Staphylococcus pasteurii</i>	İnsan ve memeli türleri
<i>Staphylococcus auricularis</i>	İnsan ve maymun türleri
<i>Staphylococcus cohnii</i> <i>S. cohnii subsp. cohnii</i> <i>S. cohnii subsp. Ureolyticum</i>	İnsan ve maymun türleri
<i>Staphylococcus xylosus</i>	İnsan, memeli türleri, kus
<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	İnsan
<i>Staphylococcus caprae</i>	İnsan, keçi
<i>Staphylococcus pulvereri</i>	İnsan, tavuk
<i>Staphylococcus intermedius</i>	Memeli türleri, kuş
<i>Staphylococcus hyicus</i>	Domuz, keçi, sığır
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Sığır, at, keçi
<i>Staphylococcus sciuri</i>	Memeli türleri, kuş
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	Kümes hayvanları, kuş
<i>Staphylococcus lentus</i>	Evcil hayvanlar, yunus
<i>Staphylococcus felis</i>	Kedi

<i>Staphylococcus muscae</i>	Evcil hayvanlar
<i>Staphylococcus piscifermentus</i>	Balıklar
<i>Staphylococcus vitilus</i>	Memeli türleri, balina, et ürünleri
<i>Staphylococcus equorum</i>	At
<i>Staphylococcus dephini</i>	Balık
<i>Staphylococcus carnosus</i>	Et ve balık ürünleri
<i>Staphylococcus caseolyticus</i>	Süt ve süt ürünleri, balina, sığır
<i>Staphylococcus kloosii</i>	Memeli türleri
<i>Staphylococcus arlettae</i>	Memeli türleri, kuş

1.2.8. Stafilokokların Tespitinde Kullanılan Biyokimyasal Testler

- 1) Katalaz Testi
- 2) Koagülaz Testi
- 3) Novobiosine Dirençlilik Testi
- 4) Mannitol Hidroliz Testi
- 5) Mannoz Hidroliz Testi
- 6) Maltoz Hidroliz Testi
- 7) Sükroz Testi

8) Pigment Testi

9) Termonükleaz Testi

1.2.9. Stafilokokların Tespitinde Kullanılan Moleküler Yöntemler

Moleküler teknikler DNA ve RNA üzerindeki anormallikleri tespit ettiği için özeldir. Hastalığın doku analizine ve tanıya ulaşmayı sağlar. Enfeksiyon hastalıklarının tanısı ve patogeneze sorumlu genlerin saptanması, moleküler epidemiyoloji çalışmalarına büyük ölçüde kolaylık sağlamıştır (Tompkins 1998, Çavuşoğlu Z.B, 2012).

Stafilokok tanımlamasında kullanılan bazı moleküler yöntemler şunlardır:

1.DNA Probları ve Hibridizasyon Yöntemleri:

a) İn situ Hibridizasyon Yöntemleri

b) Katı Faz Hibridizasyon Yöntemleri (Slot Blot, Dot Blot, Southern Blot, Northern Blot)

c) Sıvı Faz Hibridizasyon Yöntemleri

2. Nükleik asit Amplifikasyon Yöntemleri: DNA Amplifikasyon Yöntemleri (Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR))

1.3. Biyofilm

1.3.1. Biyofilm Yapısı ve Genel Özellikleri

Slaym (biyofilm) oluşumu stafilokoklarda önemli virulens faktörlerinden biridir. Biyofilmler, mikroorganizmaların yüzeylere tutunması (adhere olmaları), çoğalmaları ve hücre dışı polimerler üretmeleriyle oluşmaktadır (Fidan I. 2005).

Biyofilm; enfeksiyon ve hastalık oluşumu sırasında antimikrobiyal ajanlar ve konak canlının bağışıklık sistemi tarafından eliminasyona dirençlidir. Yani genelde kullanılan antibiyotik konsantrasyonları biyofilm oluşumundan sonra etki göstermemektedir (Amorenaa B ve ark. 1999).

Stafilokoklarda slaym oluşumu, fenotipik ve genotipik olarak çeşitli yöntemlerle belirlenebilmektedir.

Biyofilmler, çok tabakalı heterojen bir yapı gösterir. Bu mikrokoloniler birbirlerinden su kanalları aracılığıyla ayrılmıştır. Bu su kanalları içinde devam eden su akışı besin maddelerinin ve oksijenin difüzyonunu sağlar (Bothwell MR, 2003).

Biyofilm tabakasının oluşmasında protein ve ekzopolisakkaritten oluşan hücre dışı matriks ve tutunma yüzeyi önemli yer tutar. Bu bileşenlerden biri eksik olduğunda biyofilm oluşmamaktadır (Donlan RM. 2002). Bakteriler ekstraselüler polimerik maddeler olarak da bilinen ve bir dizi polisakkarid, nükleik asit ve protein içeren çamur veya balçık benzeri bir matriks içerisinde gömülü olarak bulunurlar (Çiftçi Z. 2005). Biyofilm yapısında %97 su olmak üzere, %2–5 mikroorganizma, %1–2 polisakkarid, %1-2 protein, %1-2 DNA ve iyonlar bulunmaktadır. Yapılan genomik ve proteomik çalışmalar, biyofilm gelişimi ile ilgili birçok genin bulunmasına neden olmuştur. Bu genlerin hücre fizyolojisindeki rolleri araştırıldığında adhezyon, yoğunluğa bağlı algılama (quorum sensing), hücre duvar yapımı, metabolizma, stres yanıtı ve plazmide bağlanmada etkili oldukları rapor edilmektedir (Davey ME ve ark. 2000).

Biyofilm tabakası, içindeki bakterilerin çevre şartlarından etkilenmemesini sağlayan korunaklı bir yapıdır. Biyofilm içerisinde bulunan bakterilerin antibiyotiklere, planktonik formlarına göre daha dirençli oldukları bilinmektedir (Esteban J. ve ark. 2010)

Antimikrobiyal ajanlara herhangi bir direnci bulunmayan bir mikroorganizma biyofilm oluşturunca dirençli hale, biyofilmden ayrıldığında ise yine duyarlı hâle dönüşebilmektedir (Fux C.A. ve ark. 2005). Biyofilm içerisindeki oksijen yoğunluğu mikrobiyal direncin gelişmesinde önemlidir. Oksijenin biyofilmin yüzey katmanlarında tüketildiği ve dip kısımlarda anaerobik ortam olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bazı antibiyotiklerin etkinliği azalmakta ve antimikrobiyal direnç gelişebilmektedir (Drenkard E. 2003).

Ayrıca biyofilm içerisinde bakteri metabolizması sonucu oluşan asidik atık maddelerden dolayı meydana gelen pH değişiminin bazı antibiyotikler üzerinde zıt etkileri bulunmaktadır (Thien-Fah C. ve ark. 2001, Uludağ Altun H ve Şener B. 2008).

Biyofilm içindeki bakterilerin antibiyotiklere dirençli hâle gelmesinde, biyofilmin antibiyotik direnç genlerinin bakteriler arasında aktarım kolaylığı sağlaması önemli rol oynamaktadır (Savage Victoria J. ve ark. 2013).

1.3.2. Biyofilmin Tarihçesi

Mikrobiyoloji tarihinin büyük bir kısmında, mikroorganizmalar primer olarak planktonik hücreler olarak görülmüş ve zengin kültür ortamlarında gösterdikleri büyüme özelliklerine göre tanımlanmışlardır. İlk olarak Van Leeuwenhoek 'mikroorganizmaların bir yüzey üzerinde tutunarak yaşayabildikleri' şeklinde görüş bildirmiştir. Heukelekson ve Heller, İlk olarak, suda yaşayan mikroorganizmalarda 'şişe etkisi' ni gözlemlemişlerdir. Bu organizmalar tutunabilecek bir yüzey bulabilirlerse aktivite ve büyüme hızlarında artma olduğu gözlenmiştir. Zobell deniz suyu yüzeyinde bulunan bakteri sayısının, su içerisinde serbest dolaşan bakteri sayısından çok daha fazla olduğunu ortaya koymuştur. Bir atık su işleme ünitesindeki filtreleri inceleyen Jones ve ark. filtreler üzerinde tutunmuş halde bulunan hücrelerin morfolojilerine bakarak ve SEM-TEM kullanarak farklı mikroorganizmaların bir arada bulduklarını tesbit etmiştir. Rutenyum kırmızısı adında spesifik bir polisakkarid boyası kullanılarak, bu topluluklar içerisindeki hücreleri çevreleyen matriks materyalinin polisakkarid olduğu belirlenmiştir. 1973 yılında Characklis, endüstriyel su sistemlerindeki mikrobiyal toplulukları incelemiş ve sadece yüzeye kuvvetle tutunmadıklarını, aynı zamanda klor gibi dezenfektanlara karşı çok dirençli olduklarını da belirlemiştir (Donlan RM. 2002).

Characklis ve Marshall'da 1990 yılında uzaysal veya zamansal heterojenite ve inorganik ya da abiyotik maddelerin biofilmin yapısındaki rolleri gibi, biofilmin diğer tanımlayıcı özelliklerini açığa çıkararak bu teorinin doğruluğunu desteklemişlerdir. Biofilmler aslında ilk olarak 17. yüzyılda Anton von Leeuwenhoek tarafından tanımlanmışlardır. Bununla beraber o dönemde dişinin üzerindeki plaktan aldığı sürüntüyü inceleyen ve mikroskop altında mikrobiyal kümelerin varlığını izleyen Leeuwenhoek, baktığı şeyin biofilm olduğunun farkında değildi 1970'li yılların başında Costerton dağlardaki akarsuların içerisinde yaşayan bakterileri incelerken bakterilerin %99.99'unun bir yüzeye yapışarak, balçık benzeri bir yapı içerisinde yaşadıklarını ortaya koymuştur. Daha önce yapılan çalışmaların da ışığında, 1978 yılında bu toplulukları tanımlamak amacıyla Costerton ilk defa 'biofilm' terimini kullanmıştır (Donlan R. M ve Costerton J.W, 2002).

1.3.3. Biyofilmin Oluşumu

Olgun bir biyofilmin oluşması sistemin yapısına, mikroorganizmanın türüne ve çevresel faktörlere bağlı olarak birkaç saat ile birkaç hafta zaman alır. Biyofilm oluşumu basamaklar halinde gelişen bir olaydır.

Biyofilm gelişiminde etkili olan genlerin hücre fizyolojisindeki rolleri araştırıldığında adezyon, “quorum sensing”, hücre duvar yapımı, metabolizma, stres cevabı ve plazmide bağlanmada etkili oldukları görülmüştür. Bu genlerin bir kısmı biyofilm oluşumunu artırırken bir kısmı da azaltmaktadır. Biyofilm oluşturan genetik materyal; plazmidler aracılığı ile de kolaylıkla aktarılmaktadır. Biyofilm oluşumu beş evrede gerçekleşmektedir (Vuong C ve Otto M 2002, Post JC ve ark.2004).

1. Mikroorganizmanın yüzeye tutunması:

Yüzeye başta organik ve inorganik maddelerin yapışmasının ardından mikroorganizmalar bu yüzeye geri dönüşümlü olarak tutunurlar. Bakterinin hareketi veya bakteri yüzeyi ile tutunulan yüzey arasındaki elektrostatik veya fiziksel etkileşimler bu evrede rol oynamaktadır. Tutunma sonucu biyofilm fenotipinin ortaya çıkmasına neden olan bir dizi genetik işlem başlatılır (Uludağ Altun H ve Şener B 2008)

2. Yapışma:

Bakteriler yüzeye tutunduktan sonra, hücre zarındaki proteinlerin uyarımı sonucunda ekzopolisakkarid yapıda bir madde sentezlemeye başlar ve bu da hücrelerin birbirine ve yüzeye tutunmasını sağlar. Bu ekzopolisakkarid yapı aynı zamanda bakterinin olumsuz çevre koşullarından korunmasını da sağlamaktadır (Uludağ Altun H ve Şener B 2008).

3. Kolonizasyon:

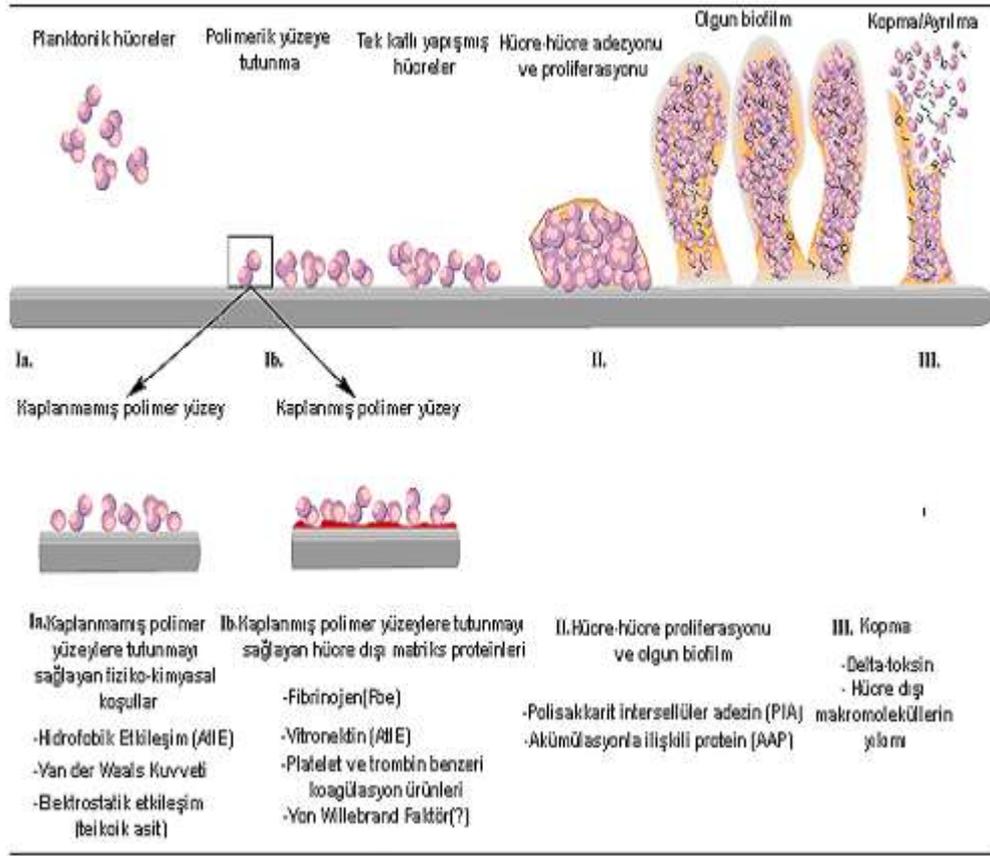
Yüzeye tutunan bakteriler bölünerek mikrokolonileri oluştururlar. Bu mikrokolonilerin üzerine ortamdaki planktonik bakteriler de yapışarak kolonizasyon sağlanır (Uludağ Altun H ve Şener B, 2008)

4. Olgun Biyofilm:

Mikrokoloniler büyürler ve kompleks, mantar şeklindeki yapılara veya kulelere dönüşürler (Şahin R. 2007).

5. Kopma:

Bakteri veya bakteri kümeleri biyofilm tabakasından koparak ortama yayılır. Biyofilmin üst kısımlarından kopan hücreler yeni biyofilm odaklarını oluşturmak üzere ayrılır Bu süreç bir dengeye oturunca süreklileşir (Jones H. C. ve ark. 1969).



Şekil 1.2. Stafilokoklarda Biyofilm Oluşum Modeli (Vuong C ve Otto M, 2002)

1.3.4. Biyofilm Oluşumunda “Quorum Sensing” Mekanizmaları

Biyofilm oluşumunu kontrol eden hücreden hücreye yollanan sinyal sistemi “quorum sensing” (QS) olarak adlandırılmaktadır. Bu mekanizma bakterinin etrafındaki popülasyon yoğunluğunu saptamasına yarayan bir sistemdir. Bakteri bu bilgiyi birçok genin kontrolünü sağlamakta kullanır. Bakteri çevresel bir faktör değişikliğinde metabolizmasında değişiklikler yaparak adapte olmaya çalışır. Patogenezi için çevreye uyum sağlar ve çevreden gelen uyarıları algılayarak yanıt geliştirir. (Donabedian H. 2003) “Quorum sensing” kavramı “minimum popülasyon birimini algılama” olarak ifade edilebilir (Fuqua W. C 1994). Doğal ortamda mikroorganizmalar çevresel uyarılara bağlı olarak planktonik ya da bir yüzeye tutunmuş durağan fazda bulunur. Besin kaynaklarındaki herhangi yetersizliğe bağlı olarak bakteriler durağan faza geçerek biyofilm içinde korumaya alır. Bir odakta toplanan mikroorganizmalar “Quorum sensing” mekanizması sayesinde biyofilmin temelini oluşturur (Lynch A.S 2008).

Birçok Gram pozitif ve negatif bakteri ve mantarlar birbirleri ile farklı sinyal molekülleri aracılığı ile iletişim kurmaktadır. Belirli bir çoğunluğa ulaşıp ulaşmadıklarını

kontrol edip, yeterli çoğunluğa ulaştıkları anda virulens faktörlerinin sentezi gen ekspresyonlarını tetiklemektedir. Konağın bağışıklık sisteminin zamanında uyarılmasını engelleyerek enfeksiyon sürecini başlatmaktadır. Bunun yanında, QS molekülleri aracılığı ile gerçekleştirilen iletişimin bozulması durumunda, mikroorganizmalar koordineli davranamazlar ve başarılı bir enfeksiyon süreci oluşturamazlar. Bu açıdan bakıldığında, QS çalışmalarının yeni ve önemli bir antibiyoterapi alanı olduğu görülmektedir (Saraçlı M.A. 2006).

1.3.5. Biyofilm Oluşumundan Sorumlu Genler

Biyofilm oluşumu çeşitli mekanizmaları içeren dinamik bir süreçtir. Biyofilm tabakası iki aşamada gerçekleşmektedir. İlk aşamada, bakteriler bir yüzeye yapışarak kolonize olurlar (erken aderans). Bu süreçten mikrobiyal yapıştırıcı matriks molekülleri olarak bilinen (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules, MSCRAMM) yüzey proteinleri sorumludur. İkinci aşamada ise, bakteriler diğer bakterilere tutunarak çok tabakalı (multilayer) biyofilmi oluşturmaktadır (Cucarella C.2001, Vancraeynest D ve ark. 2004). Bu aşamadan, *icaADBC* operonu sorumlu tutulmaktadır.

İcaA geni, UDP-N-asetilglukozaminden N-asetilglukozamin oligomerlerinin sentezinde yer alan N-asetilglukozamil transferaz üretiminden sorumlu tutulmuştur (Gad G.F.M ve ark. 2009).

İcaD geni ise kapsüler polisakkaritin fenotipik ifadesinde önemli olan N-asetilglukozamiltransferaz'ın aktivitesinin artışında rol oynar (Gad G.F.M ve ark. 2009).

İcaC geninin deasetilasyon basamağında görev yaparak, PIA spesifik anti-serumlarla reaksiyon verebilen oligomerleri uzattığı gösterilmiştir (Götz F. 2002).

İcaB geninin ise tam olarak işlevi bilinmemekle birlikte deasetilasyon basamağında katalizör görevi yaptığı düşünülmektedir (Götz F. 2002).

Çeşitli bakteri türlerinin biyofilm tabakasının oluşumunda bazı yüzey proteinlerinin önemli katkısı olduğu bilinmektedir. *S. aureus* suşlarından izole edilen bir protein olan “biofilm associated protein” (bap) biyofilm oluşumu için gerekli yapılardan birisi olarak belirtilmiştir. *S. aureus* türünde çeşitli MSCRAMM'ler ile diğer önemli yüzey bileşenleri (PIA ve bap) bir arada bulunmaktadır. Bap, bakteri yüzeyine yerleşmiş, molekül ağırlığı yüksek olan, ardı ardına yineleyen C-domainlerini içeren, bakterilere yüksek biyofilm

oluşturma kapasitesi sağlayan ve enfeksiyon s¼recinde ¼nemli rol oynayan 2276 aminoasit içeren bir proteindir.

Yapılan çalışmalarla abiyotik y¼zeyle yapışma ve intersell¼ler adhezyon basamaklarının her ikisinde de g¼rev yaptığı g¼sterilmiřtir. Bap genine sahip *S.aureus* suşları daha g¼l¼ biyofilm oluşturduğu g¼r¼lm¼řtir (Cucarella C ve ark. 2004, Lasa I. 2006).

Bu tez çalışmasında, mastitisli s¼tlerden izole edilen stafilokoklarda ¼nemli bir virulens fakt¼r¼ olarak kabul edilen biyofilm ¼retme yeteneğinin fenotipik ve genotipik y¼ntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. İzolasyon Örnekleri

Bu çalışmada 2015 Temmuz ayında, Aydın ili ve çevresinde bulunan işletmelerden ve köylerden sağlıklı ve mastitisli 100 inekten süt alınıp, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına soğuk zincirde getirildi.

2.1.2. Besiyerleri

2.1.2.1. Blood Agar (Merck 1. 10886)

Tekniğine uygun bir şekilde hazırlanan karışımın pH'sı 7,2–7,4 olarak ayarlandı. Onbeş dakika süre ile otoklavda steril edildikten sonra, 50°C'ye kadar soğutulup, içine % 7 oranında steril insan kanı ilave edilmiştir.

2.1.2.2. Kongo Red Agar(CRA)

52 gr BHIA, 40 gr sakkaroz, 0,8 gr kongo kırmızısı, 1000 ml distile su ile hazırlanan besiyeri otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiş ve petrilere dağıtılmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Örneklerin Alınması

Süt örnekleri alınırken; dışkı ve çamurla bulaşık meme başları ılık su ile yıkandı ve daha sonra kağıt havlular ile kurulandı. Meme başları %70'lik etil alkol emdirilmiş pamuk ile silindi. Her meme başı için ayrı alkollü pamuk kullanıldı. İlk birkaç çekimlik süt bir kova içine sağıldıktan sonra süt örnekleri steril cam tüplere alındı.

2.2.2. Stafilokok Şüpheli Bakterilerin Belirlenmesi ve İdentifikasyon

Laboratuvara getirilen örneklerin kanlı agara ekimi yapılarak 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda üreyen bakterilerin oluşturdukları kolonilerin makroskopik morfolojileri ve hemoliz özellikleri de incelenerek stafilokok şüpheli

kolonilerden gram boyama yapıldı. Mikroskopik olarak Gram pozitif ve kok şekilli olan kolonilerden saflaştırılma işlemi yapıldı.

2.2.2.1. Katalaz Testi

Saflaştırılmış Gram pozitif kolonilerden lam üzerine örnekler alındıktan sonra 1–2 damla % 3'lük hidrojen peroksit damlatıldı. Test sonucunda kabarcık meydana gelmesi pozitif, kabarcık oluşmaması ise negatif reaksiyon olarak değerlendirildi.

2.2.2.2. İzolatların *Staphylococcus* spp. ve *S.aureus* Yönünden PCR ile İdentifikasyonu

2.2.2.2.1. DNA Ekstraksiyonu

Mastitisli sütte izole edilen stafilocok şüpheli suşlarda DNA eldesi için kaynatma yönteminden yararlanıldı. Bu amaçla stafilocok suşlarının Trypticase Soy Agar (TSA)'a ekimi yapıp ve 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Stafilocoklar üretildikten sonra bir öze dolusu saf koloni alınarak 500 mikrolitrelik DNase-RNase free ependorf tüpünde deiyonize su ile süspanse edildi. Süspanسیون 100 derecede 10 dk kaynatıldı ve daha sonra 10 000 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Üstte kalan sıvı alınarak PCR amplifikasyonlarında hedef DNA olarak kullanıldı (Çiftçi A. 2009).

2.2.2.2.2. PCR Karışımı

16S rRNA ve *nuc* genleri için 2mM MgCl₂, 0.3 mM dNTP karışımı, 1.5 IU Taq polimeraz, 0.1 mM her bir primerden, 1X PCR buffer içeren 25 mikrolitrelik PCR karışımı hazırlandı.

2.2.2.2.3. Amplifikasyon Koşulları

PCR amplifikasyon koşulları: (16S rRNA ve *nuc* için) 94°C'de 5 dk ön denaturasyonu takiben; 94°C'de 40 sn, 50 °C'de 40 sn, 72°C'de 1 dk olmak üzere 35 siklus ve 72°C'de 10 dk son uzama aşaması uygulanmıştır.

2.2.2.2.4. DNA Agaroze Jel Elektrofrezisi

1 mg/ml etidyum bromür içeren % 1.5' luk agaroz jelle kullanılacak olan örnekler ve markerları yükledikten sonra 50 voltluk akımda 60 dk yürütüldü.

2.2.2.2.5. Görüntüleme ve Değerlendirme

Elektroforez işleminin sonunda elde edilen jel, elektroforez tankından çıkarılarak UV ışığı altında fotoğraflanmış ve her PCR için ayrı olarak bant uzunlukları değerlendirilmiştir.

Değerlendirme sürecinde PCR analizinde; 16S rRNA için 756 bp'lik bantın görülmesi *Staphylococcus* spp. için 279 bp'lik bantın görülmesi *S.aureus*'un göstergesi olarak kabul edilmiştir.

2.2.3. Biyofilm Üretiminin Belirlenmesi

2.2.3.1. Biyofilm Üretiminin Fenotipik Olarak Belirlenmesi

Slaym oluşumu Kongo red agar (CRA) yöntemi kullanılarak belirlendi. Slaym üretimi araştırılacak suşların bu besiyerine ekimi yapıldı. 37 ° C'de 24 saat inkübasyondan sonra siyah ve etrafı opak haleli koloni oluşturan örnekler slaym pozitif olarak değerlendirildi.

2.2.3.2. Biyofilm Üretiminin Genotipik Olarak Belirlenmesi

2.2.3.2.1. Biyofilm Üretiminin Genotipik Tespiti

İncelenen suşa ait DNA'nın amplifikasyonunda, slime faktör için *icaA* ve *icaD* genlerini ve kullanılan suşun *S.aureus* olduğunu konfirme etmek için Nucve 16S rRNA genlerini amplifiye eden primer setleri kullanıldı.

Çizelge 2.1.Çalışmada kullanılan primer setleri

GEN	FORWARD PRİMER	REVERSE PRİMER
<i>icaA</i>	5'-CCT AAC TAA CGA AAG GTA G-3'	5'-AAG ATA TAG CGA TAA GTG C -3'
<i>icaD</i>	5'-AAA CGT AAG AGA GGT GG-3'	5'-GGC AAT ATG ATC AAG ATA-3'

16SrRNA	5'-AAC TCT GTT ATT AGG GAA GAA CA-3'	5'-CCA CCT TCC TCC GGT TTG TCA CC-3'
nuc	5'-GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT-3'	5'-AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC-3'

2.2.3.2.1.1. PCR Karışımı

Slaym faktörün genotipik olarak belirlenmesi için *icaA* ve *icaD* genlerini hedef alan PCR karışımında 3 mM MgCl₂, 0.25 mM dNTP karışımı, 1.25 IU Taq polimeraz, 0.15 mM her bir primer, 1X PCR buffer içeren 50 mikrolitrelik PCR karışımı hazırlandı. .

2.2.3.2.1.2. Amplifikasyon Koşulları

PCR amplifikasyon koşulları olarak 92°C'de 7 dk ön denaturasyonu takiben; 92°C'de 45 sn, 49°C'de 45 sn, 72°C'de 1 dk olmak üzere 35 siklus ve 72°C'de 7 dk son uzama aşaması uygulanmıştır

2.2.3.2.1.3. DNA Agaroz Jel Elektrofrez

1 mg/ml etidyum bromür içeren % 1.5' luk agaroz jele kullanılacak olan örnekler ve markerlar yüklendikten sonra 50 voltluk akımda 60 dk yürütüldü.

2.2.3.2.1.4. Görüntüleme ve Değerlendirme

Elektrofrez işleminin sonunda elde edilen jel, elektrofrez tankından çıkarılarak UV ışığı altında fotoğraflanmış veher PCR için ayrı olarakbant uzunlukları değerlendirilmiştir.

Değerlendirme sürecinde PCR analizinde; *icaA* geni için 1315 bp ve *icaD* geni için 381bp aralığında bant oluşumları arandı (Şahin R. 2007; Çiftci A. 2009).

3. BULGULAR

3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Bu çalışma için, Aydın ili ve çevresinde bulunan işletmelerden ve köylerden laktasyon döneminde olan farklı ırk, yaştaki sağlıklı ve mastitisli 100 inekten süt örnekleri uygun teknikle toplanıp Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarı'na soğuk zincirde getirilerek incelendi.

Besi yerlerine ekimleri yapıldıktan sonra 37 °C'de 24 saat inkubasyona bırakıldı. Stafilocok şüpheli kolonilerin identifikasyonu için öncelikle gram boyama testi yapıldı. Gram pozitif kok olarak değerlendirilen suşlara katalaz testi uygulandı. Gram pozitif ve katalaz pozitif suşlar saflaştırıldı. Daha sonra PCR da kullanılmak üzere gliserinli besiyerine ekilerek kaldırıldı.



Şekil:3.1. Kanlı agara yapılan ekim sonucu üreyen saflaştırılmış Gram pozitif koloniler

Alınan sütlerden üreyen stafilokok cinsi bakterilerin değerlendirilmesi Çizelge 3.1’ de verilmiştir.

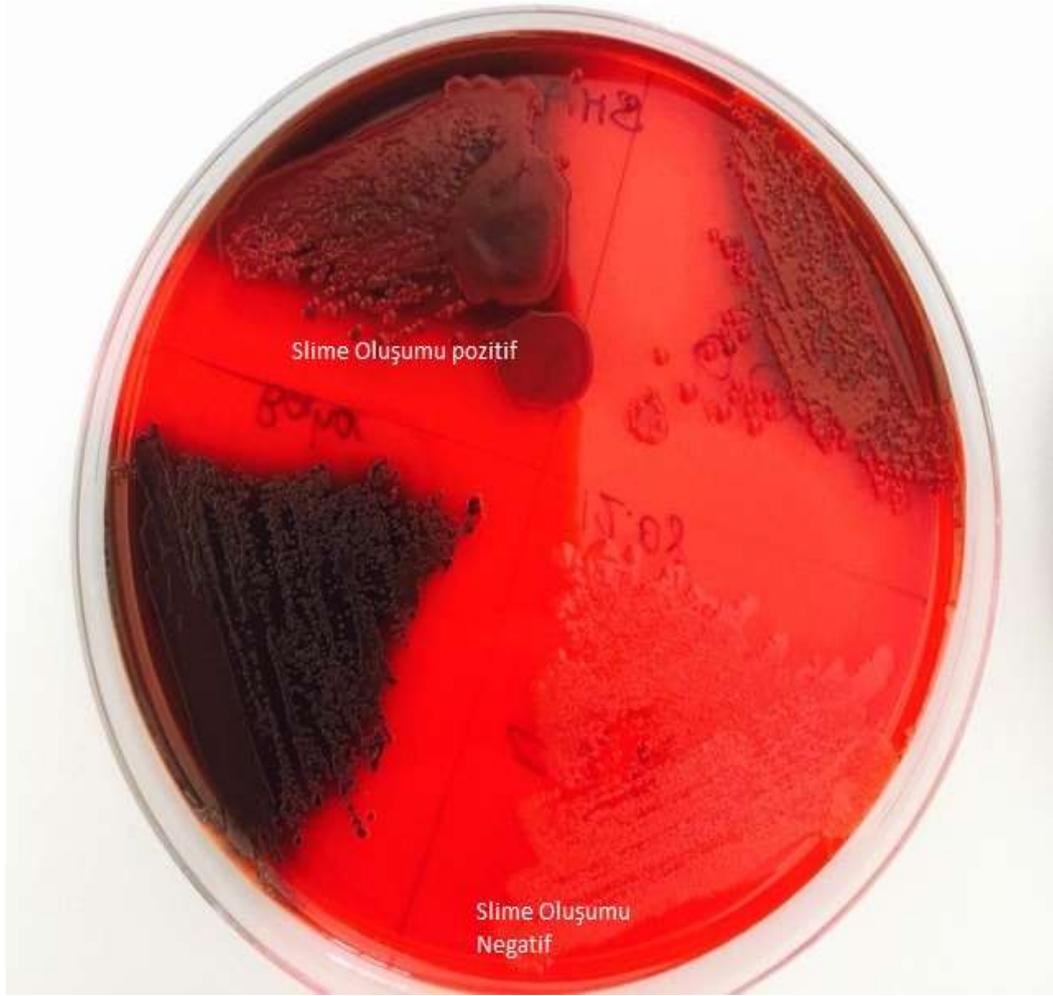
Çizelge 3.1. Sütlerden İzole Edilen Suşlarda İdentifikasyon Bulguları

Toplanan süt örneği	İzole edilen suş	Gram pozitif kok	Katalaz pozitif
100	77	77	77

Çalışma için toplanan 100 örneğin kanlı agara ekiminden sonra; 23 besiyerinde üreme gözlenmezken 77 tanesinde bakteriyolojik üreme gözlenmiştir. Üreme gerçekleşen 77 örneğe önce gram boyama testi uygulanmış ve tamamının Gram pozitif ve kok şekilli olduğu belirlenmiştir. Gram pozitif kok şekilli izolatlara katalaz testi uygulanmış ve tamamının katalaz pozitif olduğu gözlenmiştir.

3.2.Biyofilm Üretiminin Fenotipik İncelenmesine Ait Bulgular

Çalışılan izolatların biyofilm oluşturma durumları, Kongo kırmızılı agar ile araştırıldı. Kongo kırmızılı agar besiyerine ekilen kültürlerin 37°C’de bir gece ve sonrasında oda ısısında 48 saat inkübasyon sonrasında siyah ve etrafı opak haleli koloni oluşturanlar biyofilm pozitif, pembemsi-kırmızı, düz ve merkezi koyu (öküz gözügörünümü) koloni yapanları biyofilm negatif olarak kabul edildi.



Şekil 3.2. Stafilokok suşlarının biyofilm oluşturma yeteneği bakımından Kongo Red Agarda incelenmesi

Yapılan değerlendirmeler sonrasında 77 örneğin 13'ünde (%16.8) biyofilm oluşumu negatif bulunurken, 64'ünde (%83.1) biyofilm oluşumu pozitif bulundu.

3.3. PCR Bulguları

Saklama amaçlı gliserinli besiyerine ekilen suşların tekrar TSA'ya ekimi yapıldı. İdentifikasyon amaçlı yapılan PCR çalışmasında izole edilen 77 bakteri kullanıldı. Biyofilm üretiminin genotipik olarak belirlenmesinde ise PCR identifikasyonu sonucunda *Staphylococcus* spp. olarak değerlendirilen izolatlar kullanıldı.

Staphylococcus spp. yönünden cins düzeyinde ve *S.aureus* yönünden tür düzeyinde PCR ile incelendi.

Staphylococcus spp. olarak identifiye edilen izolatlarda biyofilm oluşumunda görev yaptığı bilinen *icaA* ve *icaD* genleri araştırıldı.

Çizelge 3.2. İzole edilen suşlarının 16SrRNA, Nuc, *icaA* ve *icaD* genleri bakımından PCR' da değerlendirme sonuçları

İzolat No.	16S rRNA (756bp)	<i>nuc</i> (279bp)	<i>icaA</i> (1315bp)	<i>icaD</i> (381bp)
1.	—	—	İncelenmedi	İncelenmedi
2.	—	—	İncelenmedi	İncelenmedi
3.	—	—	İncelenmedi	İncelenmedi
4.	—	—	İncelenmedi	İncelenmedi
5.	—	—	İncelenmedi	İncelenmedi
6.	—	—	İncelenmedi	İncelenmedi
7.	—	—	İncelenmedi	İncelenmedi
8.	—	—	İncelenmedi	İncelenmedi
9.	—	—	İncelenmedi	İncelenmedi
10.	—	—	İncelenmedi	İncelenmedi
11.	—	—	İncelenmedi	İncelenmedi
12.	—	—	İncelenmedi	İncelenmedi

13.	-	-	İncelenmedi	İncelenmedi
14.	-	-	İncelenmedi	İncelenmedi
15.	-	-	İncelenmedi	İncelenmedi
16.	+	-	-	-
17.	+	+	-	-
18.	+	-	-	-
19.	+	+	+	-
20.	+	-	+	+
21.	+	+	-	+
22.	+	+	+	+
23.	+	-	-	-
24.	+	-	-	-
25.	+	-	+	+
26.	+	+	-	-
27.	+	+	+	-
28.	+	+	-	-
29.	+	-	-	-

30.	+	+	+	-
31.	+	-	-	-
32.	+	-	-	+
33.	+	-	+	-
34.	+	-	-	-
35.	+	-	+	-
36.	+	-	-	-
37.	+	-	-	+
38.	+	-	-	-
39.	+	-	-	+
40.	+	+	-	-
41.	+	-	-	-
42.	+	+	-	+
43.	+	+	-	+
44.	+	+	-	+
45.	+	-	-	+
46.	+	+	+	-

47.	+	+	-	-
48.	+	-	-	+
49.	+	-	-	-
50.	+	-	+	-
51.	+	-	+	-
52.	+	-	-	+
53.	+	+	-	-
54.	+	+	-	-
55.	+	+	-	+
56.	+	-	-	+
57.	+	-	-	-
58.	+	-	-	-
59.	+	-	-	-
60.	+	-	-	+
61.	+	-	-	-

62.	+	-	-	-
63.	+	-	-	+
64.	+	-	-	-
65.	+	-	-	-
66.	+	+	-	+
67.	+	-	-	-
68.	+	-	-	-
69.	+	-	-	-
70.	+	-	-	-
71.	+	-	-	-

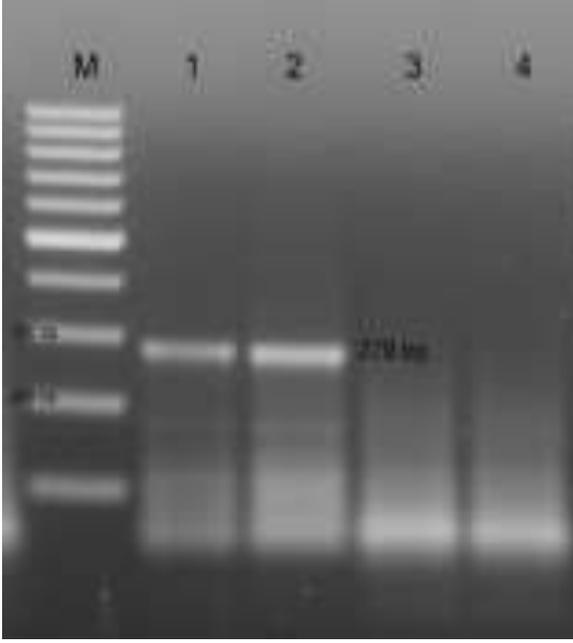
72.	+	+	-	+
73.	+	-	-	-
74.	+	-	-	-
75.	+	-	-	-
76.	+	-	-	-
77.	+	+	+	+

Staphylococcus spp. olma bakımından PCR ile incelenen 77 izolattan 15 (%19.4) tanesinde *nuc* ve 16S rRNA genlerinin bulunmadığı görüldü. Diğer 62 (%80.5) izolattın tamamında 16S rRNA geninin bulunduğu görüldü ve bu suşlar tamamının *Staphylococcus spp.* olarak değerlendirildi.

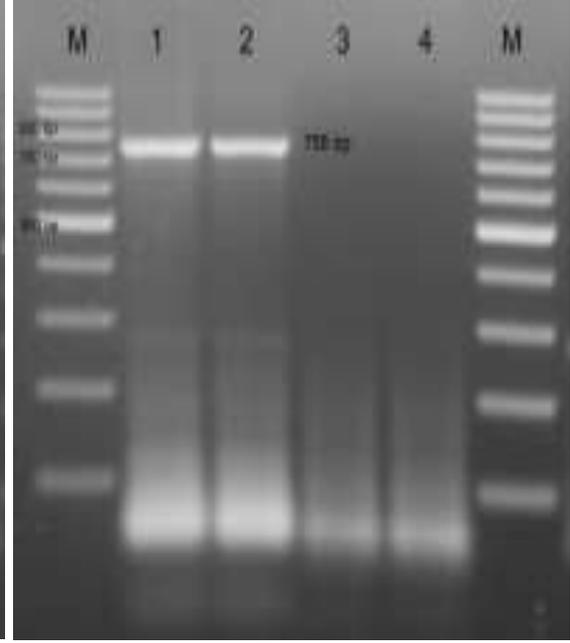
Staphylococcus spp. olarak değerlendirilen 62 izolattan 20 (%32.2) tanesinde *nuc* geninde bulunduğu görüldü ve bu izolatlar *S.aureus* olarak değerlendirildi.

Staphylococcus spp. olarak değerlendirilen 62 izolattın 8 (%12.9) tanesinde sadece *icaA*, 16 (%25.8) tanesinde sadece *icaD*, 4(%6.4) tanesinde ise *icaA* ve *icaD* genlerinin birarada bulunduğu görüldü. 34 (%54.8) izolatta ise her iki gen de saptanmadı

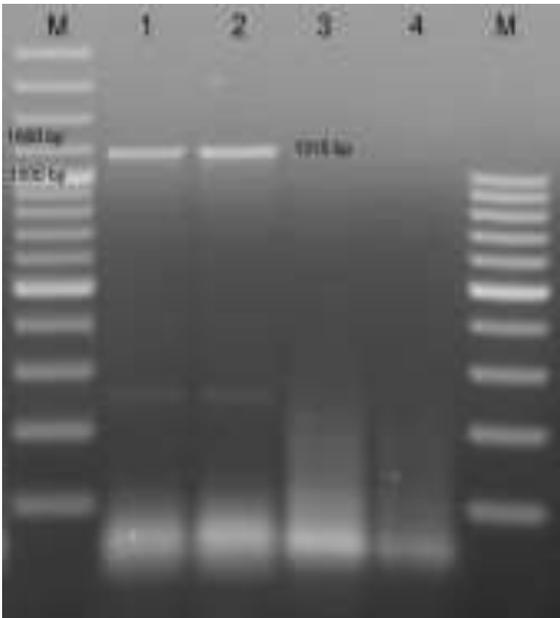
Staphylococcus spp. olduğu belirlenen 62 suşun 20 tanesi *S.aureus* olarak tanımlanmış ve bu 20 izolatın 4'ünde(%20) sadece *icaA* geni, 7'sinde(%35) sadece *icaD* geni, 2'sinde(%10) ise hem *icaA* hem de *icaD* geni bulundu. 7 (%35) tanesinde ise her iki gen de saptanamadı.



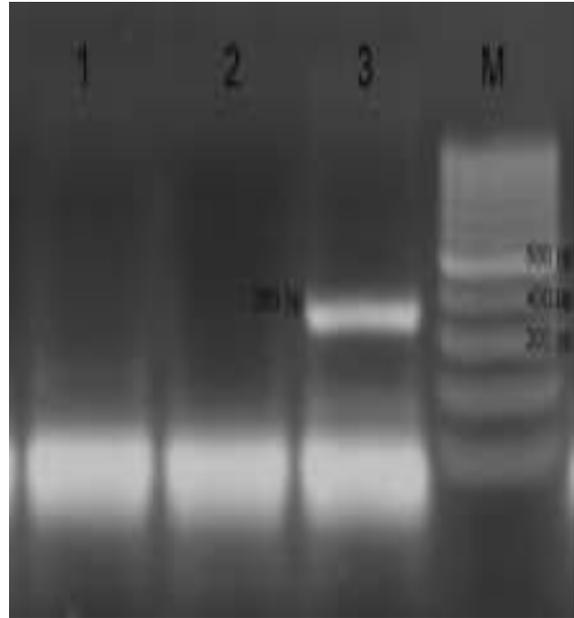
(a) 16SrRNA(756bp)



(b) *nuc*(279bp)



(c) *icaA*(1315bp)



(d) *icaD* (381bp)

Şekil:3.3. 16S rRNA, *nuc*, *icaA* ve *icaD* genlerinin PCR çalışması bulguları

4. TARTIŞMA

Mastitis, bir meme dokusu hastalığıdır. Bu hastalık süt miktarında azalmaya, tedavi giderlerinin artmasına, hayvan kesim oranının artmasına ve ölümlere yol açabilmektedir. Bu nedenle süt sığıru yetiştiriciliğinde yüksek oranda ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Mastitisli ineklerden en çok izole edilen etken *Staphylococcus spp.* 'dir. Virulenslerinde etkili olan faktörler hücre duvarı, kapsül, yüzey proteinleri, toksinler ve enzimlerdir.

Slaym (biyofilm) oluşumu stafilocoklarda önemli bir virulens faktörü olarak kabul edilmektedir. Biyofilmler, mikroorganizmaların yüzeylere tutunması (adhere olmaları), çoğalmaları ve hücre dışı polimerler üretmeleriyle oluşmaktadır. Biyofilm tabakası, içindeki bakterilerin çevre şartlarından etkilenmemesini sağlayan korunaklı bir yapıdır.

Stafilocoklarda biyofilm oluşumundan *icaADBC* operonu ve ürünü olan "polysaccharide intercellular adhesin" (PIA) sorumlu tutulmaktadır. *İca ADBC* operonu stafilocoklarda biyofilm oluşumunun intersellüler adhezyon kısmında görev yapan PIA oluşumundaki "polyN-acetyl-beta-1-6-glucosamine"(PNAG) oligomerlerini sentezlettirir.

Bu çalışmada, sığırlarda subklinik mastitis olgularında izole edilen Gram pozitif ve katalaz pozitif suşlarının biyofilm oluşturma yetenekleri fenotipik ve genotipik olarak araştırıldı.

Ammendolia ve ark.'ları, biyofilm pozitiflik oranını KPS%88.9, KNS'lerde %47.8 olarak bildirmiştir. Arciola ve ark.'ları, *S. aureus* suşlarının (%61) *S. epidermidis'e* (%49) göre daha fazla biyofilm ürettiğini belirtmiştir. Votava ve ark. Kongo kırmızılı agar besiyerinde kan kültüründen izole edilen 32 *S.aureus* suşunun 18'ini (%56.2) biyofilm pozitif değerlendirmiştir. Arciola ve ark. protez infeksiyonlarından izole edilen 15 *S.aureus* suşunun 11'ini (%73.0) ve 15 *S.epidermidis* izolatının 9'unu (%60.0) biyofilm pozitif bulmuşlardır. Kontrol grubu olarak deri ve mukozadan izole edilen 10 stafilocok suşunun hiçbirinde biyofilm üretimi tespit edememişlerdir. Yazdani ve ark. yara infeksiyonlarından izole ettiği 50 *S.aureus* suşunun Kongo kırmızılı agar besiyerinde 27'sini (%54.0) biyofilm pozitif, 23'ünü (%46.0) biyofilm negatif bulmuşlardır.

Arciola ve ark. Kongo kırmızılı agar besiyerinde 23 *S.aureus* suşunun 14'ünde biyofilm pozitif olarak değerlendirirken, biyofilm pozitif suşlarda *icaA* ve *icaD* genlerinin her ikisini de saptamışlar, biyofilm negatif örneklerin hiçbirisinde genleri tespit

edememişlerdir. Rohde ve ark. fenotipik olarak Kongo kırmızılı agar besiyerinde biyofilm pozitifliği ile *icaA* ve *icaD* genlerinin arasında tam uyum olmadığını savunmaktadırlar. Bununla birlikte Vancraeynest ve ark. Kongo kırmızılı agarda biyofilm pozitif bulunduğu *S.aureus* suşlarının yalnızca %45.0 *icaA* ve *icaD* genlerini saptamışlardır. Bunun nedeninin Kongo kırmızılı agar besiyerindeki koloni morfolojisinin yorumlanmasına bağlı olabileceğini bildirmişlerdir. Vasudevan ve ark. biyofilm pozitif ve negatif toplam 35 izolatan tamamında *icaA* ve *icaD* genlerinin bulunduğunu göstermişlerdir. *IcaAD* pozitif iki izolatta biyofilm üretiminin görülmemesi insersiyonel inaktivasyona veya *ica* lokusundaki delesyonlara bağlı olabileceği bildirilmiştir. Yazdani ve ark. yara infeksiyonlarından izole ettikleri biyofilm negatif ve biyofilm pozitif 50 *S.aureus* suşunun tamamında *icaAD* genlerini belirlemişlerdir. Chaieb ve ark. diyaliz kateterlerinden izole edilen 32 *S.epidermidis* suşunun 16'sında Kongo kırmızılı agarda biyofilm pozitif bildirmişlerdir. Çalışılan 32 suşun 23 tanesinde *icaA* ve *icaD* genlerini pozitif bildirmişlerdir. Bunların 15'i biyofilm pozitif, 8 tanesini de biyofilm negatif göstermişlerdir. *IcaA* ve *icaD* genleri negatif 1 izolatan ise biyofilm oluşturduğunu göstermişlerdir. *S.epidermidis*'de biyofilm oluşturma yeteneği ile *ica* genleri arasında ilişki olduğu bildirilmiştir.

Bu çalışmada toplanan 100 örneğin kanlı agara ekiminden sonra; 23 besiyerinde üreme gözlenmezken 77 tanesinde bakteriyolojik üreme gözlenmiştir. Üreme gerçekleşen 77 örneğe önce gram boyama testi uygulanmış ve tamamının Gram pozitif olduğu gözlenmiştir. Gram pozitif suşlara katalaz testi uygulanmış ve tamamının katalaz pozitif olduğu gözlenmiştir.

Kongo Red agarda yapılan değerlendirmeler sonrasında 77 örneğin 13'ünde (%16.8) biyofilm oluşumu negatif bulunurken, 64'ünde (%83.1) biyofilm oluşumu pozitif bulunmuştur.

Stafilococcus spp olma bakımından PCR da incelenen 77 suştan 15 (%19.4) tanesinde *nuc* ve 16S rRNA genlerinin bulunmadığı görüldü. Diğer 62 (%80.5) izolatan tamamında 16S rRNA geninin bulunduğu görüldü ve bu suşlar tamamının *Staphylococcus spp.* olarak değerlendirilmiştir.

Staphylococcus spp. olarak değerlendirilen 62 izolattan 20 (%32.2) tanesinde *nuc* geninde bulunduğu görüldü ve bu izolatlar *S.aureus* olarak değerlendirilmiştir.

Staphylococcus spp. olarak değerlendirilen 62 izolatın 8 (%12.9) tanesinde sadece *icaA*, 16 (%25.8) tanesinde sadece *icaD*, 4 (%6.4) tanesinde ise *icaA* ve *icaD* genlerinin birarada bulunduğu görülmüştür. 34 (%54.8) izolatta ise her iki gen de saptanamamıştır.

Staphylococcus spp. olduğu bilinen 62 suşun 20 tanesinin *S.aureus* olduğu belirlenmiş ve bu 20 izolatın 4 'ünde(%20) sadece *icaA* geni, 7'sinde(%35) sadece *icaD* geni, 2'sinde(%10) ise hem *icaA* hem de *icaD* geni bulundu.7 (%35) tanesinde ise her iki gen de saptanamamıştır.

Kongo Red Agarda fenotipik olarak biyofilm negatif olarak değerlendirilen 13 izolatın tamamında 16SrRNA, *nuc*, *ica A* ve *ica D* genleri de saptanamamıştır. Bunun yanında Kongo Red Agarda biyofilm pozitif olarak değerlendirilen 2 suşta da 16SrRNA, *nuc*, *ica A* ve *ica D* genleri saptanamamıştır.

Kongo Red Agarda fenotipik olarak biyofilm pozitif olarak değerlendirilen 64 izolatın 62' sinin (%96.8) *Staphylococcus spp.* olduğu, bunlardan 20 tanesininde *S.aureus* olduğu belirlenmiştir.

5. SONUÇ

Mastitis, süt veriminde azalmaya yol açan, süt sğırı yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olan meme dokusu hastalığdır. Sığır mastitislerinden en sık izole edilen etkenlerin başında *Staphylococcus spp.* gelmektedir. Slaym (biyofilm) üretimi stafilokoklarda önemli bir virulens faktörü olarak kabul edilmektedir. Stafilokoklarda biyofilm oluşumundan *icaADBC* operonu ve ürünü olan “polysaccharide intercellular adhesin” (PIA) sorumlu tutulmaktadır

Yapılan çalışmada toplanan 100 örneğın, 23 ‘ünde üreme gözlenmezken 77 tanesinde bakteriyolojik üreme gözlenmiştir. Bu 77 örneğın tamamı önce gram boyama testi uygulanmış ve tamamının Gram pozitif olduğu gözlenmiştir. Yapılan değerlendirmeler sonrasında 77 örneğın 13’ünde (%16.8) biyofilm oluşumu negatif bulunurken, 64’ünde (%83.1) biyofilm oluşumu pozitif bulundu. Kongo kırmızılı agar besiyerinde; biyofilm pozitif olarak değerlendirilen 64 izolatın 62’sinin *Staphylococcus spp.* olduğu, bunlardan 8 (%12.9) tanesinde sadece *icaA*, 16 (%25.8) tanesinde sadece *icaD*, 4 (%6.4) tanesinde ise *icaA* ve *icaD* genlerinin bir arada bulunduğu görüldü. *Staphylococcus spp.* suşlarının 34 (%54.8) tanesinde her iki gene de rastlanmadı. Kongo Red Agarda biyofilm negatif olarak değerlendirilen 13 izolatın ise tamamında *icaA* ve *icaD* genlerinin her ikisinde saptanamadı.

ÖZET

Mastitisli Sütlerden İzole Edilen Stafilocokların Biyofilm Üretme Yeteneğinin Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle Araştırılması

Bu araştırmada 2015 Temmuz ayında, Aydın ili ve çevresinde bulunan işletmelerden ve köylerden laktasyon döneminde olan 100 ineğin her birinden süt örnekleri tekniğine uygun olarak alınıp Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına soğuk zincirde getirilerek biyofilm oluşturan stafilocoklar fenotipik ve genotipik yönden araştırılmıştır.

Bu çalışmada toplanan 100 örneğin, 77 tanesinde bakteriyolojik üreme gözlenmiş bu 77 örneğin Gram pozitif olduğu gözlenmiştir. CRA 'da yapılan değerlendirmeler sonrasında 77 örneğin 13'ünde (%16.8) biyofilm oluşumu negatif bulunurken, 64'ünde (%83.1) biyofilm oluşumu pozitif bulunmuştur. PCR çalışmalarında, biyofilm pozitif olarak değerlendirilen bu 64 izolatın 28'inde (%43.7) *icaA* ve *icaD* geni bulunmuştur. Biyofilm negatif olarak değerlendirilen 13 izolatın tamamında ise her iki gende saptanamamıştır.

Anahtar Kelimeler biyofilm, *icaA* ve *icaD*, , PCR, mastitisli süt, *staphylococcus spp*

SUMMARY

Investigation of Biofilm Producing Ability of *Staphylococcus* spp. with Phenotypic and Genotypic Methods which are Isolated from Mastitis Milk

This research has been done in July 2015, by collecting the samples of milk from the cows in the period of lactation according to the techniques from 100 businesses and villages around Aydin and bringing them to the routine identification laboratory of microbiology major science department in faculty of veterinary in Adnan Menderes University with cold chain and the *Staphylococcus* maintaining the biofilm have been searched according to the phenotype and genotypes.

In this research 77 of the 100 samples were seen bacteriological reproduction and they were all gram positive. To the results in CRA, the 13 samples of the 77 (%16.8) the biofilm formation was negative however, in the rest (64 of the 77)(%83.1) it was positive.

In the PCR works, in the 28 isolates of the 64 positive biofilms (%43.7), the *icaA* and *icaD* genes were found. In 13 isolates of the 13 negative biofilms (%100) the *icaA* and *icaD* genes were both not found.

Key Words: biofilm, *icaA* ve *icaD*, PCR, mastitis in milk, *Staphylococcus* spp.

KAYNAKLAR

Anonim1 <http://baytarizm.blogspot.com.tr/2012/06/mastitisten-korunma.html> , Mastitis'ten Korunma, Haziran 2012 Erişim Tarihi: 5 Haziran 2015

Anonim2 http://www.bozkirtarim.gov.tr/index.php?option=com_content&task=view&id=254&Itemid=34, Boyar M.H. İneklerde Mastitis ve Korunma Yöntemleri Mart 2009 , Erişim Tarihi: 18 Haziran 2015

Anonim3 <http://tyhm.cu.edu.tr/Tr/detay.aspx?pageId=1517> , Çukurova Üniversitesi Çiftçi Broşürü Haziran 2005, Erişim Tarihi: 15 Temmuz 2015

Anonim4 <https://intravet.wordpress.com/2008/08/11/sut-sigirciliginda-mastitis/>, Süt Sığırcılığında Mastitis, Ağustos 2008, Erişim Tarihi: 17 Temmuz 2015

Anonim5 <http://www.mikrobiyoloji.org/> , Staphylococcus Erişim tarihi: 22 Temmuz 2015

Anonim6 https://tr.wikipedia.org/wiki/Polimeraz_zincir_tepkimesi , Polimeraz zincir tepkimesi Erişim Tarihi: 3 Ağustos 2015

Ak Ö, Benzonana N.A, Balkan İ.İ, Özer S. Katalaz Negatif *Staphylococcus aureus* 'a Bağlı Bir Yumuşak Doku İnfeksiyonu: Olgu Sunumu. Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi. Cilt XV : 3 , 2004.

Alen S, Koneman E, Janda W, Schreckenberger P, Winn W, Woods G, Procop G. The gram positive cocci: Part 1: Staphylococci and related organism. In: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5. Baskı, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006; 539-576

Amorenaa B, Gracia E, Monzon M, Leiva J, Oteiza C, Perez M, Alabart J.L, Yago H.J. Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 1999 44: 43-55

Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki K, Oguchi A, Nagai Y, Iwama N, Asano K, Naimi T, Kuroda H, Cui L, Yamamoto K, Hiramatsu K. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. Lancet. 2002 May 2

Bannerman TL. Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase positive cocci that grow aerobically. In Manual of Clinical Microbiology, Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC, eds. 8th ed. 2003. Washington, DC: ASM Press. p. 384-404.

5;359(9320):1819-27.

Bannerman TL, Peacock SJ. Staphylococcus, Micrococcus and Other Catalase-Positive Cocci. In: Manual of clinical microbiology 9th edition. (2007). Edited by: Murray PR, Baron EJ, Jorgenson JH, Landry ML, Pfaller MA. Washington, D.C: ASM Press; 390-411

Blunt CA1, van Vuuren M, Picard J; Antimicrobial susceptibility profiles of Staphylococcus intermedius isolates from clinical cases of canine pyoderma in South Africa. S Afr Vet Assoc. 2013 May 16;84(1): E1-6

Bothwell MR, Smith AL, Phillips T. Recalcitrant otorrhea due to Pseudomonas biofilm. Otolaryngol Head Neck Surg. 2003 Nov;129(5):599-601

Cengiz SA. Koagülaz Negatif Stafilokoklar. Tıp ve Diş Hekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji. Cengiz AT, editör. Ankara: Güneş Kitabevi, TÜRKİYE; 2004. s: 351-60.

Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penades A. Bap, a Staphylococcus aureus Surface Protein Involved in Biofilm Formation. JOURNAL OF BACTERIOLOGY, May 2001, Vol. 183, No. 9, p. 2888-2896

Cucarella C, Tormo M.A, U'beda C, Trotonda M.P, Monzo'n M, Peris C, Amorena B, Lasa I, Penades J. Role of Biofilm-Associated Protein Bap in the Pathogenesis of Bovine Staphylococcus aureus INFECTION AND IMMUNITY, Apr. 2004, Vol. 72, No. 4, p. 2177-2185

Çavuşoğlu Z.B. Klinik Örneklerden İzole Edilen Staphylococcus aureus Suşlarından Elde Edilen Bakteriyofajlarda Bulunan SCIN, CHIPS, SEI, SEK Toksin Genlerinin Varlığının PZR ve Southern Blot Yöntemi İle Kıyaslanması. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü. Ankara. Türkiye. 2012

Çiftçi A, Fındık A, Onuk E.E, Savaşan S. Detection of Methicillin Resistance and Slime Factor Production of Staphylococcus aureus in Bovine Mastitis. Brazilian Journal of Microbiology (2009) 40:254-261

Çokal Y, Konuş R. Subklinik Mastitisli İneklerin Sütlerinden Aerobik Bakterilerin İzolasyonu. Balıkesir Sağlık Bil Derg Ağustos 2012; Cilt:1 Sayı:2

Davey ME, O'toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol Mol Biol Rev. 2000 Dec;64(4):847-67.

Donlan R.M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. Emerging Infectious Diseases . September 2002. Vol. 8, No. 9

Donlan R. M, Costerton J.W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, Apr. 2002, Vol. 15, No. 2 , p. 167–193

Drenkard E. Review Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Microbes and Infection 5 (2003) 1213–1219

Esteban J, Molina-Manso D, Spiliopoulou I, Cordero-Ampuero J, Fernández-Roblas R, Foka A, Gómez-Barrena E. Biofilm development by clinical isolates of *Staphylococcus spp.* from retrieved orthopedic prostheses. Acta Orthopaedica 2010; 81 (6): 674–679

Fidan I, Yüksel S, Çetin Gürel F. Koagülaz Negatif Stafilokok Suşlarında Biyofilm Olulmuş ve Siprofloksasinin Biyofilm Üzerine Etkisi. Türk Mikrobiyol Cem Derg (2005) 35:149-152

Fuqua W. C, Winans S.C, Greenberg E.P. Quorum Sensing in Bacteria: the LuxR-LuxI Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulators. JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Jan. 1994, Vol. 176, No. 2, p. 269-275

Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. Trends Microbiol 2005; 13: 34-40.

Gad G.F.M, El-Feky M.A, El-Rehewy M.S, Hassan M.A, Hassan A, El-Baky R.M.A Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. J Infect Dev Ctries 2009; 3(5):342-351.

Götz F. Staphylococcus and biofilms. Molecular Microbiology (2002) 43(6), 1367–1378

H. Donabedian. Quorum Sensing and its Relevance to Infectious Diseases. Journal of Infection (2003) 46: 207-214

Halasa T, Huijps K, Østerås O, Hogeveen H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. Veterinary Quarterly 2007; 29(1): 18-31

Hillerton J.E, Berry E.A. A Review Treating mastitis in the cow – a tradition or an archaism. Journal of Applied Microbiology 2005, 98: 1250–1255

Jones H. C, Roth I. L ve Sanders W. M. Electron Microscopic Study of a Slime Layer. JOUR. OF BAC., July 1969, Vol. 99, No. I, p. 316-325

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Procop G, Woods G. Color Atlas and Textbook of Diagnostik Microbiology. Sixth edition. Philadelphia: Lippincott Co 2005:700-711 Erişim Adresi: <https://books.google.com.tr/books?hl=tr&id=xzIsZo44GkoC&q=625#v=snippet&q=625&f=false> Erişim Tarihi: 4 Temmuz 2015

Lasa I, Penadés J.R. Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. Research in Microbiology 157 (2006) 99–107 Carme Cucarella,

Licitra G. *Staphylococcus* etymologia. Emerging Infectious Diseases 2013 Vol. 19, No. 9,

Lynch A.S, Robertson G.T. Bacterial and Fungal Biofilm Infections. Annu. Rev. Med. 2008. 59: 415–28

Mc Donald JS. Bovine mastitis. J Dairy Sci. 1979, 62: 117-118

Orenstein A. The Discovery and Naming of *Staphylococcus aureus*. www.antimicrobe.org

Özdemir M. Mastitisli İnek Sütlerinden *Staphylococcus* Türlerinin İzolasyonu ve İdentifikasyonu. Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü. İstanbul. 2005

Post JC, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Ehrlich GD. The role of biofilms in otolaryngologic infections. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg 2004; 12: 185- 190.

Saiki, K.R., Gelfand, H.D., Stoffi, S., Scharf, J.S., Higuchi, R., Horn, T.G. Primerdirected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 1988, (158); 1154-1157.

Saraçlı MA. "Quorum sensing": mikroorganizmalar iletişim mi kuruyor? Gülhane Tıp Dergisi 2006; 48: 244-250

Sareyyüpoğlu B, Müştak H. K, Cantekin Z, Diker K.S. Molecular detection of exfoliative toxin in *Staphylococcus intermedius* isolates from dogs with pyoderma. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 2013, 60:15-19,

Savage Victoria J, Chopra Ian, O'Neill Alex J. *Staphylococcus aureus* Biofilms Promote Horizontal Transfer of Antibiotic Resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy April 2013. Volume 57 Number 4 p. 1968 –1970

Schroeder J.W. Mastitiscontrol programs: Bovine mastitis and milking management. North Dakota State University Extension Service. April 1997; AS–1129

Sørensen L. P, Engberg R. M, Løvendahl P, Larsen T. Short communication:Effects of *Bos taurus*autosome 9-located quantitative trait loci haplotypes on enzymatic mastitis indicators of milk from dairy cows experimentally inoculated with *Escherichia coli*. J. Dairy Sci. 2015, 98:5440–5447

Sugimoto, M, Fujikawa A, Womack J. E. and Sugimoto Y. Evidence that bovine forebrain embryonic zinc finger-like gene influences immune response associated with mastitis resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences Online. 2006, 103 (17): 6454-6459.

Somma M, Querci M. The Polymerase Chain Reaction (PCR). The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms. Session 6

Stenholm T. Two-Photon Excited Fluorescence Detection Technology in Screening for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Turun Yliopisto University of Turku 2012.

Şahin R. *Staphylococcus aureus* suşlarında biyofilm üretimi, biyofilm pozitif ve negatif suşların genotipik ve fenotipik karakterlerinin karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi. Pamukkale Üniv.Tıp Fak. Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji A.B.D. Denizli. 2007

Tarıbuyurdu E. Sığır Mastitislerinden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarında Biofilm Oluşumu ve Antibiyotiklere Dirençliliğinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Aydın. Türkiye. 2014.

Taponen S, Pyorala S. Coagulase-negative Staphylococci as cause of bovine mastitis not so different from *Staphylococcus aureus* Veterinary Microbiology, 2009; 134:29-36.

Tekeli T, Baysal T, Gökçay Y. İneklerde Subklinik Mastitislerin Kuru Dönemde Penisilin-Streptomisin Kombinasyonu ile Sağıtım Üzerinde Araştırmalar. Selçuk Üniversitesi Vet. Fak. Dergisi 1985, 1. Sayı (71-79)

Thien-Fah C. Mah, George A. O'Toole. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. TRENDS in Microbiology. January 2001. Vol.9 No.1

Todar K. Staphylococcus Todar's Online Textbook of Bacteriology. Erişim Adresi; <http://www.textbookofbacteriology.net/staph.html>. Erişim Tarihi: 22 Haziran 2015

Tompkins L.C. Molecular epidemiology in infectious diseases. Infectious Diseases, 1998,(2); 28-35.

Topuzoğlu B. Sütçü İneklerde *Staphylococcus aureus*'a Bağlı Subklinik Mastitislerde Uzun Süreli Antibiyotik Tedavisinin Bakteriyojik İyileşme ve Somatik Hücre Sayısı Üzerine Etkisi. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Ankara. Türkiye. 2011

Tünger A. Staphylococcus aureus, mikrobiyoloji, patogenez ve epidemiyoloji. In: Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. Gram pozitif bakteri infeksiyonları. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2004; 9-68.

Türkel C.Ş. Köpeklerin Derilerinden Stafilokok Türlerinin İzolasyonu ve Eksfoliyatif Toksin Varlığının Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Aydın. Türkiye. 2012

Uçan N. Subklinik Mastitisli Keçilerdeki Koagülaz Negatif Stafilokokların Saptanması ve Antibiyotik Dirençliliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Aydın. Türkiye. 2014.

Uludağ Altun H, Şener B. Biyofilm infeksiyonları ve antibiyotik direnci. Hacettepe Tıp Dergisi 2008; 39: 82-88

Vancraeynest D, Hermans K, Haesebrouck F. Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits for biofilm formation and MSCRAMMs. Veterinary Microbiology 103 (2004) 241-247

Vuong C, Otto M. Staphylococcus epidermidis infections. Microb Infect 2002; 4: 481–489.

Wolcott J.M. Advances in nucleic acid-based detections methods. Clinical Microbiology Rev, 1992, (5); 370-386.

Xu Wei, GUAN Ran, Lu Yisong, Su Xiaoyan, Xu Ye, Du Aifang ve Hu Songhua. Therapeutic effect of polysaccharide fraction of Atractylodis macrocephalae Koidz. in bovine subclinical mastitis. BMC Veterinary Research 2015: 11-165

Yeşilmen S, Özyurtlu N, Bademkiran S. Diyarbakır Yöresinde Subklinik Mastitisli İneklerde Etken İzolasyonu ve Duyarlı Antibiyotiklerin Belirlenmesi. Dicle Üniv Vet Fak Derg 2012: 1 (4):24-29

Yılmaz S, Devran Z. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Bitki Biyoteknolojisinde Yaygın Uygulamaları. Narenciye ve Seracılık Araştırma Enstitüsü, Antalya

Zafer Ç. Kronik tonsillitte biofilmin rolü. Uzmanlık Tezi. T.C.Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi KBB Kliniği. İstanbul. 2005

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Aydın'da doğdu. 2004'de girdiği Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2008'de mezun oldu. 2013'den bu yana Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimini sürdürmektedir. 2008 yılından itibaren çeşitli dershanelerde ve 2011 yılından bu yana Aydın Özel Değişim Dershanesi bugünkü adıyla Özel Değişim Koleji'nde biyoloji öğretmeni olarak mesleğini sürdürmektedir. Evli olup, yabancı dil olarak "İngilizce" bilmektedir.

TEŞEKKÜR

Tez çalıŐmalarım boyunca ilgi, yardım ve hoŐgörülerini benden esirgemeyen ADÜ Veteriner Fakóltesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi danışmanım Doç. Dr. Serap SAVAŞAN'a ve Mikrobiyoloji Anabilimdalı BaŐkanı Prof. Dr. Őükrü KIRKAN'a, Prof. Dr. Osman KAYA'ya; Doç.Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ'a, Yard. Doç.Dr. Göksel ERBAŐ'a, Yard. Doç. Dr. Uğur PARIN'a, ArŐ. Görevlisi Hafize Tuđba YÜKSEL'e, eğitimim konusunda her zaman yanımda olan annem Nuray KOÇ ve babam Behçet KOÇ'a ve her konuda beni destekleyen eŐim Burak BÜYÜKTARAKÇI 'ya sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.