

1. GİRİŞ

Mastitisler, yaygınlıkları ve işletmelerde süt verimindeki düşüşe bağlı olarak meydana getirdiği ekonomik kayıplar açısından önemli hastalıklardandır. Bu nedenle tüm hastalıklarda olduğu gibi klinik mastitislerin erken teşhisi de oluşturacağı zararların önüne geçilmesi açısından önemlidir. Sığır mastitislerine sebep olan bakteriyel etkenlerin başında Stafilokokal etkenler gelmektedir. Bu etkenler çok yaygın olarak görülerek, özellikle eller ve süt sağma üniteleri ile yayılmaktadır. Stafilokoklar subklinik ve klinik tipteki mastitis vakalarında baskın patojenlerdir. Stafilokoklardan kaynaklanan mastitis olgularında çok ciddi meme dokusu hasarları ve fazla miktarda süt üretimi azalması görülmektedir. Stafilokokların çevresel, konakçı, mastitis kontrolü ve bakımı üzerindeki değişimlere çok hızlı bir şekilde uyum sağlayabileceği gösterilmiştir. Stafilokok kaynaklı klinik vakalar, uzun süreli ancak nispeten az sıklıkla ortaya çıkan şekilde karakterize edilirler. Stafilokoklar, çeşitli patojenik faktörler ile karakterize edilmektedir. Bu faktörler meme dokularında oluşan hasarı tetikleyen ve bağışıklık savunmasından kaçabilen ya da dışarıdan uygulanan antimikrobisidalleri etkisiz hale getirenlerdir (Waldvogel ve ark, 2000; Tünger, 2004; Tünger ve ark, 2005).

Stafilokoklardaki hastalık yapıcı (virulans) faktörler yoğun bir şekilde araştırılmıştır. Sığır mastitis vakalarından izole edilen *Staphylococcus aureus* suşları alfa, beta, gama, delta toksinlerine ilaveten lökositin, enterotoksin ve koagülaz içermektedir. KNS suşları da hastalık oluşturmada etkili olabilecek bazı toksinler ve enzimler (hemolizin, lökositin, lipaz, proteaz, DNaz) üretmektedir. Mastitisli örneklerden izole edilen çok sayıda *Koagülaz Negatif Stafilokok* (KNS), normal ineklerden izole edilen KNS'lerden farklı olarak fazla miktarda proteaz, DNaz, ve lesitinaz aktivitesi göstermektedir. *S. aureus*'un ülkemizde yapılan önceki çalışmalarda izolasyon oranı Aydın ilinde %28,3, Afyon ilinde %40,1, Burdur ilinde ise %43 olmuştur (Kırkan ve ark, 2005; Kuyucuğlu ve Uçar, 2001; Türütöğlu ve ark, 2006).

Mastitis mikroorganizmaların sebep olduğu önemli bir meme bezi hastalığıdır. Mastitis ile ortaya çıkan ekonomik kayıplar sadece süt veriminde azalma ile sınırlı olmayıp, hastalığın tedavisi, sürüden hastalıklı hayvanların çıkarılması gibi harcamaları da kapsamaktadır. Ayrıca önemli bir gıda kaynağı olan sütün kalitesindeki bozulma halk sağlığı açısından da olumsuz sonuçlara sebep olmaktadır (Kırkan ve ark, 2005).

Araştırmamızda, süt üretimi için oldukça önem taşıyan mastitis olgularındaki sık

rastlanan Stafilokok etkenlerinin izolasyonu ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi, izole edilen suşların API, VITEK, MALDI-TOF MS gibi ticari identifikasyon metodlarıyla tiplendirilmeleri ve sonuçların karşılaştırılması, tiplendirmenin ardından 16S rRNA primerleri ile yapılacak olan PCR sonucu Stafilokokkal etkenlerin sekans analizi ile birlikte doğrulanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mastitis

Mastitis, meme dokusundaki patolojik değişiklikler ve sütteki somatik hücre sayısının artışı ile karakterize, meme bezlerinde oluşan yangısal değişiklikler olarak tanımlanır (Aydın, 2006). İnsan ve hayvan sağlığı, beslenmesi ve ulusal ekonomide çok önemli olan süt ve süt ürünleri, ancak sağlıklı hayvanlardan elde edilebilir. Meme bezinin yangısal durumuna bağlı olarak oluşan patolojik değişikliklerin sonucunda sütte bir takım fiziksel ve kimyasal değişimler de meydana gelir. Meydana gelen bu değişimler süt ve süt ürünlerinin kullanılabilirliğini sınırlar ve bu nedenle mastitis, üzerinde dikkatle durulması gereken önemli bir problemdir (Awale ve ark, 2012).

İşletme düzeyinde etkin kontrol programlarının uygulanması ile mastitis nedenli kayıpların azaltılması mümkün olabilmektedir. Mastitis kontrol programlarının uygulanması ve bu programların devamlılığının sağlanması, özellikle kapasiteleri büyük olan süt işletmelerinde, ekonomik verimliliğin en önemli göstergesidir. Ancak ülkemizde özellikle süt yönlü yetiştiricilikte işletme kapasitelerinin küçük olması ve henüz verimlilik merkezli mastitis kontrol programlarının oluşturulamaması nedeniyle, süt üretiminde büyük ekonomik kayıplar ortaya çıkmaktadır. Sağlıklı süt, sağlıklı hayvanlardan elde edildiği için, hayvan sağlığını korumak ve mastitis olgularını erken teşhis etmek temel hedeftir. Süt endüstrisinde mastitis nedenli ekonomik kayıplar, süt kalitesinin ve süt veriminin azalması, buna bağlı olarak da ilaç ve veteriner hizmet kullanımının artması ve yem giderlerinin artışı sonucunda ortaya çıkmaktadır. Aynı zamanda, infeksiyonun tedavisi için kullanılan antibiyotiklerin sütte kalıntı bırakması, bilinçsiz olarak ilaç kullanımına bağlı gelişen antibiyotik dirençli bakteriler, tedavi olanaklarının sınırlanması gibi olumsuz etkiler. Düzenli ve bilinçli kontrol programlarının uygulanması, klinik mastitis olgularının azaltılmasını ve infeksiyonların da erken teşhis edilmesini sağlamaktadır (Virdis ve ark, 2010).

Süt sığırı yetiştiriciliğinin en önemli hastalığı olan mastitis, meme bezlerinin travmatik etkilere ve meme içerisine ekzojen veya endojen olarak giren mikroorganizmalara karşı bir tepkisidir. Mastitis, klinik seyirlerine göre klinik ve subklinik mastitisler olarak sınıflandırılmaktadır. Meme dokusunda ve sütte değişikliklerin görüldüğü klinik mastitisler, memede şişme, ağrı, kızarıklık, sıcaklık ve duyarlılık gibi lokal belirtilerin yanında ateş, halsizlik, iştah ve kilo kaybı gibi sistemik hastalık belirtileri

ile karakterizedir. Mastitisin, ikinci formu olan subklinik mastitisler meme dokusunu, süt verimini ve bileşimini etkilemesi nedeniyle daha fazla önem arz etmektedir. Subklinik mastitisler klinik semptom göstermeden seyrettiği için gözden kaçmakta ve kolaylıkla yayılabilmektedir. Süt veriminin azalması, sütün kalitesinin bozulması, tedavi süresince sütün atılması, tedavi ve veteriner hekim giderleri nedeniyle süt sığırcılığı işletmelerinde büyük ekonomik kayıplara neden olan mastitislerin % 70'ni subklinik mastitisler oluşturmaktadır. Mastitislerin ortaya çıkışında konağa, çevreye ve mikroorganizmalara ait determinantlar önemli rol oynamaktadır. Konağa ait determinantlar arasında ırk ve kalıtım, yaş ve laktasyon sayısı, laktasyon dönemi, memenin doğal savunma mekanizmaları ve immun sistemin gücü sayılabilir. Çevresel determinantlara ise hava koşulları, mevsim, beslenme, sağım ile ilgili faktörler ve barınak koşulları örnek verilebilir. Mastitis vakalarının büyük çoğunluğu mikroorganizmalar (bakteriler, viruslar ve mantarlar) tarafından oluşturulmaktadır. Sığırlardaki mastitis vakalarından 135'ten fazla mikroorganizma izole edilmesine rağmen infeksiyonların çoğunluğu Stafilokoklar, Streptokoklar ve Gram negatif bakteriler tarafından oluşturulmaktadır. Bu etkenlerden bazıları bulaşıcı bazıları ise çevresel mastitis etkeni durumundadır (Feßler ve ark, 2010).

2.2. Bulaşıcı ve Çevresel Mastitis

Mastitise neden olan etkenler arasında bakteriler önemli bir yere sahiptir. Memelerdeki anatomik bozukluklar ve travmalar da infeksiyonun yerleşimini ve oluşumunu hızlandırmaktadır. Anatomik bozukluklara bağlı mastitis olgularında; memelerin doğmasal olarak bozuk anatomik yapısı, hayvanın yaşı, ırkı gibi etkiler, süt veriminin fazla olması, laktasyonun dönemi (aktif involusyon, peripartum periyot, erken laktasyon vb.), beslenme durumları (Selenyum ve Vitamin E eksiklikleri), süt ineklerini infeksiyona duyarlı kılmaktadır (Cervinkova ve ark, 2013).

Çevresel faktörler arasında, uygun olmayan çevre koşulları, ahır ve barınakların sağlık yönünden uygun olmaması, yetersiz havalandırma koşulları, altlıkların sert ve kirli olması sayılabilir. Süt verimini arttırmak amacıyla protein yönünden zengin besleme mastitise yakalanma olasılığını arttırmaktadır. Sağımcıların temizlik ve dezenfeksiyona dikkat etmemeleri de hayvanlar arasında infeksiyonun yayılmasını hızlandırmaktadır. Mikrobiyel nedenlere bakıldığında; pek çok bakteri, mantar ve viral etken mastitisin oluşumuna neden olmaktadır. Mastitis etkenleri, meme ve meme kanalıyla ilişkileri yanında, özellikleri de dikkate alınarak bulaşıcı ve çevresel patojenler olarak ayrılmıştır.

Mikrobiyel patojenler, sığır meme bezine yerleşerek çoğalır ve hayvandan hayvana sağım sırasında bulaşır. Çevresel patojen olan *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* ve *Escherichia coli* çevresel mastitis infeksiyonlarına da neden olmaktadır. Bulaşıcı patojenler olarak *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma* türleri ve *Corynebacterium bovis* bulunmaktadır. Ayrıca tüberküloz etkenleri, *Proteus*, *Leptospira*, *Listeria* ve *Brucella* türleri de mastitise neden olmaktadır. Çevresel patojenlerin infeksiyon oluşturması hayvanlar arasında sağım esnasında ya da sağım aralarında çevre teması ile meydana gelir. Çoğunlukla kuru dönemde, laktasyonun erken evresinde ve hayvan sıklığının arttığı durumlarda, serbest hayvancılıktan ziyade ahır işletmelerinde, çevresel patojenlerin oluşturduğu infeksiyonlara daha sık rastlanır. Bakım ve beslemenin iyi yapıldığı durumlarda, koliform mastitisleri nadiren ortaya çıkar ve oranı %1-2'de kalırken, streptokokkal nedenli mastitis oranı %5'den daha az seyreder, ancak sürüde mevcut herhangi bir problemde bu oran %10 'u aşar. Çevresel streptokokların oluşturduğu mastitis infeksiyonlarının %49-50'sin de klinik semptomlar kendini gösterir. Klinik mastitislerin sonucuna bağlı olarak da süt üretiminde, reproduktif aktivitede azalma ve işletme giderlerinin artışı ile ekonomik kayıp şekillenir. Bulaşıcı mastitis infeksiyonları ise, bir meme bezinin infeksiyon kaynağı olması ve bu infekte meme bezine sahip hayvandan, sağlıklı başka bir hayvana etkenin taşınması ile gerçekleşir. Meme başı lezyonları, yetersiz bakım koşulları etkenlerin yerleşimini kolaylaştırır. Bulaşıcı mastitis olguları sıklıkla akut, kronik veya subklinik formlarda görülebilir. Mikroorganizmanın geçişi sağımçıların elleri, sağım makineleri gibi sağım esnasında yayılma gösterir. Bu şekilde infekte hayvanlardan sağlıklı hayvanlara mikroorganizmaların geçişi gerçekleşir (Frey ve ark, 2013).

2.3. İnfeksiyonun Klinik ve Subklinik Formları

İnfeksiyonun klinik formlarına bakıldığında; mikroorganizma meme bezini enfekte ettikten sonra buraya yerleşerek hızlı bir şekilde çoğalmaya başlar ve bunu konak-patojen ilişkisine bağlı olarak çeşitli klinik bulgular takip eder. Konak immun cevabının başarısız, antibiyotik tedavisinin yetersiz olduğu durumda etken meme bezine kolonize olur ve mastitis şekillenir. Sonuç olarak da yangının klinik bulguları olan şişkinlik, renk değişimi, ısı artışı ve ağrı gelişir. Klinik semptomlar perakut, akut, subakut ve kronik formlar halinde karakterize edilir. Klinik mastitis durumlarında sütteki değişimler (pıhtı, renk değişimi, kan görülmesi vb.) açığa çıkar. Ateş, anormal sekresyon, iştah kaybı, süt üretiminin azalması

akut mastitis durumlarında görülen ilave klinik bulgulardır. Klinik mastitis bulgularının tersine subklinik infeksiyonlarda meme bezi ve sütteki değişimlere nadiren rastlanır ya da hiç rastlanmaz. Semptom göstermeyen hayvanlar sağlıklı kabul edilir, bu nedenle subklinik infekte hayvanların teşhisi zordur. Klinik belirti göstermeyen infekte hayvanlar diğer sağlıklı hayvanlar için bir rezervuar görevi görür ve sağlıklı hayvanlar arasında infeksiyonun yayılımına neden olurlar (Zhang ve ark, 2010).

Ekonomik yönden mastitis infeksiyonları, süt veriminin ve kalitesinin azalması, tedavi masraflarına ek olarak somatik hücre sayısının artışı ve sütün kullanılamaması, laboratuvar hizmet alımları, toksemiye bağlı şekillenen hayvan ölümleri ile üretim maliyetlerini arttırmakta ve yetiştiricilik yönünden önemli problemlere neden olmaktadır (Kalmus, 2011).

Mastitis infeksiyonlarının gelişebilmesi için, mikroorganizmaların meme kanalına girmesi, infeksiyonun başlaması ve yangısal reaksiyonların oluşması gerekmektedir (Aydın ve ark, 2006).

2.4. Mastitis İnfeksiyonlarında Tanı

Mastitislerin tanısı klinik, kimyasal, fiziksel, hücresel ve bakteriyolojik muayeneler ile yapılmaktadır. Klinik olgularda meme ve sütteki nitelik ve niceliksel değişiklikler belirgin iken, subklinik mastitislerin tanısında meme ve sütte değişiklikler gözle izlenemediğinden sütteki değişiklikleri belirlemeye yönelik testlerden yararlanılmaktadır (Baştan, 2009). Bu amaçla uygulaması en pratik olan ve sütteki somatik hücre sayısını belirlemeye yönelik olan California Mastitis Testi (CMT)'dir. Bunun dışında artan SHS'nı belirlemeye yönelik Whiteside ve Wisconsin mastitis testleri ile sütteki kan, kıvam ve pıhtı varlığını incelemeye yönelik Strip Cup Testleri bulunmaktadır. CMT ile saptanan pozitiflik incelenen hayvanın mastitisli olması yönünden bir ön fikir oluşturur. Ancak mastitise neden olan etkenin identifikasyonu amacıyla laboratuvar tanısı gereklidir. Bu amaçla kültür ve biyokimyasal testlerden yararlanılmaktadır (Riffon ve ark, 2001). Kültürel yoklamalar sürü düzeyinde infeksiyonun izlenmesi, antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi ve kontrolü yönünden de önemlidir (Milner ve ark, 1996).

2.5. Stafilokok Kaynaklı Mastitis

Stafilokoklar ilk defa 1884 yılında Rosenbach tarafından irinli yaralardan izole edilmiştir. Önceki yıllarda Micrococcaceae familyası içinde yer alan Stafilokok cinsi, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'nin son baskısında Bacilli sınıfında Bacillales takımında yer almaktadır. Stafilokok cinsi içerisinde yer alan türler, patojenite kriteri olarak kabul edilen koagulaz enzimi sentezleme yeteneklerine göre koagulaz pozitif stafilokoklar (KPS) ve koagulaz negatif stafilokoklar (KNS) olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. KPS'lar *S. aureus*, *S. intermedius* ve *S. hyicus* türlerini içine almaktadır. Stafilokoklar, Gram pozitif, hareketsiz, sporsuz, katalaz pozitif, oksidaz negatif ve üzüm salkımı şeklinde kümeler tarzında 0.5-1.5 µm çapında koklardan oluşmaktadır. Laboratuvarlarda rutin amaçla kullanılan besiyerlerinde kolayca ürer ve 37°C'de 24-48 saat içinde 2-4 mm çapında düzgün koloniler oluştururlar. Stafilokoklar karotenoidlerden dolayı pigment meydana getirirler. *S. aureus* altın sarısı, *S. epidermidis* ise beyaz renkte koloni oluşturur. Ancak anaerobik koşullarda pigment oluşturma yeteneği ortadan kalkar. Laboratuvarında 10-42 °C'de üreyebilmelerine rağmen optimum üreme sıcaklığı 37 °C'dir. Sporsuz olmasına rağmen dış etkilere ve dezenfektanlara karşı oldukça dayanıklıdır. Kültürlerde +4 °C'de 2-3 ay, -20 °C'de 3-6 ay canlılıklarını koruyabilirler. Stafilokoklar 60 °C'lik ısıya 30 dk dayanabilirler. Fenolde (% 2) 15 dakikada inaktive olurken, % 9'luk NaCl ve sakkarozaya tolerans gösterebilmektedir (Aydın ve ark, 2006).

2.6. Stafilokok Kaynaklı Mastitislerinin Patogenezi ve Tanısı

Stafilokokların sahip olduğu toksinler, enzimler, yüzey proteinleri, kapsül ve slime gibi virulans faktörleri mastitislerin patogenezisinde önemli bir yere sahiptir. Bu faktörler konak savunma mekanizmalarından etkenin korunmasına, memede infeksiyon başlatmasına ve invazyonuna yardımcı olurlar. Akut inek mastitislerinde küçük meme kanallarının fibrin pıhtılarıyla hızlı bir şekilde tıkanması, irinli bir sekresyon, fibrin birikimi, etkilenen dokuların ödematöz şişkinliği görülür. Yangının şiddeti birkaç gün içinde azalmaya başlar ve meme kanallarının etrafında meydana gelen doku üremesine bağlı olarak meme dokusunda atrofi meydana gelir. Kronik ve subklinik mastitiste, somatik hücre sayısında artış ve bakterilerin etkilenen meme loblarına invazyonu söz konusudur. Bakterilerin üremesi genellikle sütün toplandığı kanallarda ve daha az olarak alveollerde meydana gelir. Yangısal tabloya bağlı olarak alveollerde atrofi ve süt kanallarında tıkanma şekillenir. Fagositik hücrelerin göçü sonucu yangının geliştiği bölgelerde apse odakları ve

fibrozis gelişir. Fibrozis antibiyotiklerin penetrasyonunu sınırlandırdığı gibi fagositozu da önemli düzeyde engeller. Akut, kronik ve subklinik mastitis tablolarının dışında bakterilerin sentezlediği toksinler ve doku yıkımı sonucu ortaya çıkan ürünlere bağlı toksemi tablosu ve ölüm de görülebilir (Karahana, 2005).

Mastitisli sütlerden izole edilen stafilokokların koagulaz özelliğine bakılarak bakterinin *S. aureus* olarak isimlendirilmesi birçok mikrobiyoloji laboratuvarı tarafından yeterli olarak görülmektedir. Ancak *S. aureus* dışında koagulaz pozitif özellik gösteren diğer Stafilokok türlerinin de varlığı da göz önüne alındığında koagulaz testinin dışında *S. intermedius* ve *S. hyicus* gibi koagulaz pozitif türlerin *S. aureus*'tan ayrımı için DNaz ve Clumping faktör testlerinin de yapılmasının gerekliliği vurgulanmıştır (Yavuz ve ark, 2002). Stafilokokların laboratuvarlarda hızlı identifikasyonuna yönelik ticari StaphTrac, Minitek Gram-Positive Set ve Api-STAPH gibi kitler geliştirilmiştir. Stafilokokların identifikasyonuna yönelik kısa sürede sonuç veren, sensitivite ve spesifitesi yüksek olan moleküler tekniklerden de yararlanılmaktadır. *S. aureus*'un 16S ve 23S rRNA bölgelerine spesifik primerlerin kullanıldığı polimeraz zincir reaksiyonu ile kısa sürede çok sayıda numunenin identifikasyonu yapılabilmektedir (Riffon ve ark, 2001).

2.6.1. Katalaz Testi

Lama bir damla hidrojen peroksit solusyonundan damlatılır ve üzerine kolonilerden bir miktar konulur. Kabarcık oluşumu hidrojen peroksitin su ve oksijene ayrıldığını, yani testin pozitif olduğunu gösterir (Brooks ve ark, 1997).

2.6.2. Koagulaz Testi

Lam ve tüp koagulaz testi olmak üzere 2 yöntemi vardır. Bu testlerde Stafilokok süspansiyonu tavşan plazması ile lamda veya tüpte karıştırılır ve tavşan plazmasındaki fibrinojen koagulaz ile fibrine çevrilir. Lam testi; bağlı koagulaz veya clumping faktörün varlığı belirlenir. Bu test kanlı agar, Columbia Colistin Nalidixic Agar ya da diğer nonselektif nutrient besiyerinde üreyen kolonilerden yapılabilir. Mannitol salt agar gibi yüksek tuz içeriği olan besiyerinde üremiş koloniler kullanılmamalıdır. Çünkü yüksek tuz konsantrasyonu *S. aureus*'un bazı suşlarında otoaglutinasyona neden olmaktadır. Clumping faktörü eksik olan suşlar genellikle serbest koagulaz ürettiklerinden dolayı, lamda negatif çıkan suşlar tüp koagulaz yöntemiyle doğrulanmalıdır. Ayrıca *S. lugdunensis* ve *S.*

schleiferi gibi bazı koagulaz negatif suşlar clumping faktör üretirler ve lam testi pozitif çıkabilir. Tüp testi; serbest koagulaz veya plazmaya bakteri tarafından salınan koagulazı saptar. Bu metot ile saptanan koagulaz ekstrasellüler olarak salınır ve bir kompleks oluşturmak için plazmadaki Coagulase-Reacting Factor (CRF) ile reaksiyona girerek stafilotrombin oluşturur. Stafilotrombin de fibrinojenle reaksiyona girerek fibrin oluşumunu tetikler. Bazı suşlar, 35°C’de uzayan inkübasyon periyodunda pıhtının çözülmesine sebep olan fibrinolizin üreteceği için testler 35°C’de 4 saat inkübasyondan sonra oda ısısına alınmalıdır ve 18–24 saat sonra tekrar okunmalıdır. Tüp koagulaz testi *S. aureus* identifikasyonu için referans testidir. Bu test, pozitif sinyal veren kan kültüründen doğrudan tavşan plazması içerisine inokule edilerek de yapılabilir. Nadir *S. aureus* suşları koagulaz negatif olabilir ve bazı hayvan izolatları (*S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. dephini* ve *S. schleiferi subsp coagulans*) tüp koagulaz pozitif olabilir. *S. schleiferi subsp. schleiferi*'nin hem clumping faktör hem de tüp koagulaz testi pozitif olduğu gösterilmiştir. Bu izolat aynı zamanda ısıya dirençli DNAz ürettiğinden dolayı *S. aureus* olarak yanlış tanımlanabilir. Bu KNS, *S. aureus*'tan maltoz, laktoz, mannitol, sukroz ve trehalozdan asit üretmemesi ile ayrılabilir. Hem tüp hem de lam koagulaz testi için önerilen ortam EDTA’lı tavşan plazmasıdır. Sitratl plazma kullanılmamalıdır, çünkü enterokoklar gibi bazı bakteriler sitratı kullandığından testin pozitif sonuçlanmasına ve Stafilokok olarak tanımlanmasına neden olabilir. Bu hata her zaman önce katalaz testi uygulanarak önlenabilir. İnsan plazması çeşitli miktarda CRF ve antiStafilokokal antikorlar içerdiğinden koagulaz testi yapmada kullanılmamalıdır. Lateks aglütinasyon; bu yöntemde plazma ile kaplanmış lateks parçacıkları kullanılır. Fibrinojen latekse bağlanarak clumping faktörü tespit eder. Ek olarak Stafilokok hücre duvarı proteini olan IgG moleküllerinin Fc bölgelerine bağlanabilen Protein A'da, parçacıkta bulunan immunglobulin molekülleri ile tespit edilebilir. Bir agar plağından alınan kolonilerin test materyali ile karışması sonucu lateks-mikroorganizma süspansiyonu hızlı bir kümeleşme gösterir. Ayrıca *S. lugdunensis* ve *S. schleiferi*'nin bazı suşları da clumping faktör üretir ve bu test ile pozitif reaksiyon verebilir. Pasif hemaglütinasyon; eritrositler ya da sentetik olarak hazırlanmış polistiren lateks gibi parçacıklar, çeşitli yöntemlerle çok çeşitli antijenlerle kaplanabilirler. Bu şekilde kaplanmış olduğu antijenin taşıyıcısı durumuna gelen eritrosit ya da parçacıklar, elektrolitli ortamda bu antijenlerin antikorları ile karşılaştıklarında aglütinasyon verirler. Dolaylı hemaglütinasyon denilen bu testler çok duyarlı olup, ortamda çok az antikor bulunması bile sonuç vermek için yeterlidir. *S. aureus* hücrelerinin yüzeyindeki clumping faktörü saptamak için fibrinojen ile sensitize edilmiş koyun eritrositleri bu amaçla kullanılır. Bazı *S.*

saphyticus suşları lateks veya hemaglutinasyon koagulaz testinde yanlış pozitif sonuç verirler. Bu *S. saphyticus* suşlarının yüzeyinde bulunan hemaglutinin varlığı ile açıklanabilir. Florejenik koagulaz testi; substrat içeren küçük bir kupulu inokule ederek gerçekleştirilen bu test, üretici firmanın “aurase” olarak isimlendirdiği maddeyi tespit eder. Aurase, koagülasyonun proteolitik enzimidir; protrombin ile raksiyona girer ve stafilotrombin ile kompleks oluşturur. Stafilotrombin daha sonra test kupulunda bulunan florejenik peptide enzimatik olarak bağlanır, böylece ultraviyole ışık altında floresans veren radikal ve peptid salınır. Substratı olmayan kompleks kuplesi ile karşılaştırıldığında test kuplesindeki yüksek floresans *S. aureus*'un tanımlanmasını sağlar. Bu testin özgüllük ve duyarlılığının yüksek olduğu saptanmıştır (Winn ve ark, 2006; Brown, 2005).

2.6.3. Doğrulayıcı Testler

Bazı *S. aureus* suşları zayıf ya da şüpheli tüp koagulaz reaksiyonu oluşturabilirler ve nadiren gerçekten koagulaz negatif olabilirler. Bu vakalarda koagulaz ile çok iyi uyum gösteren ek testler yapmak gerekebilir. *S. aureus* endonükleolitik ve ekzonükleolitik aktiviteye sahip olan DNAz ve termostabil nükleaz üretir. Bu enzimlerin her ikisi de nükleik asiti hidrolize eder (Brakstad ve ark, 1995).

2.6.3.1. Deoksiribonükleaz (DNAz) Testi

DNAz içeren bakteriler, DNA içeren besiyerinde DNA'yı parçalayıp oligonükleotidler oluştururlar. Bu deneyde DNA'lı plak besiyerine saf kültürden çizgi ekimi yapıp 35°C'de 18-24 saat bekletildikten sonra plak yüzeyine 1 N HCl damlatılmasına dayanır. Bakteri DNAz üretiyorsa ekim çizgisinin çevresinde saydam bir zon oluşur. İndikatör olarak besiyerine toluidin mavisi konulmuş ise DNAz varlığında bakteriler ekim çizgisi çevresinde parlak pembe bir zon oluştururlar. İndikatör olarak Methyl green konmuş besiyerinde ekim çizgisi etrafında besiyerinin yeşil rengi açılır (Brakstad ve ark, 1995). Besiyerine katılan toluidin mavisi DNAz aktivitesini maskeleyebildiği için % 0,005'i aşmamalıdır. Bu test *S. aureus*'un identifikasyonunda ek bir test olarak yardımcı olmakla birlikte başka Stafilokoklar da pozitif DNAz reaksiyonu verebilir (Winn ve ark, 2006; Brown ve ark, 2005).

2.6.3.2. Termostabil Endonükleaz Testi

Bu test için yine aynı DNAz test besiyeri kullanılır. Sadece agar içerisinde 3 mm çapında çukur açılır ve 15 dakika su banyosunda kaynamış 24 saatlik sıvı kültür ile bu kuyucuklar doldurulur. Plaklar 35°C’de 1 gece inkübe edilerek çukurların çevresinde pembe bir hale oluşup oluşmadığı izlenir. Bazı hayvan izolatları (*S. caprae*, *S. schleiferi*, *S. intermedius* ve *S. hyicus* gibi) ısıya dirençli termonükleaz üretir. Bazı koagulaz negatif Stafilocoklar (*S. epidermitis*, *S. simulans*, *S. capitis*, *S. carnosus* gibi) zayıf pozitif reaksiyon verebilirler. *S. aureus* endonükleaz testinin özgülüğü, *S. aureus* enzimlerine karşı hazırlanmış monoklonal veya poliklonal antikorlarla seroinhibisyon reaksiyonu veya *S. aureus* ısı stabil endonükleazını kodlayan *nuc* geni PCR ile gösterilerek doğrulanabilir (Mason ve ark, 2001).

2.6.3.3. Mannitol Fermentasyonu

S. epidermidis ve diğer koagulaz negatif türlerin aksine, *S. aureus* mannitolü fermente edebilir. *S. aureus*’un dışkı, çevre ve nasal taşıyıcılarda taranmasında bu özelliği kullanılır. Kullanılan besiyeri “Mannitol Salt Agar”dır. Bu besiyeri mannitol (% 1), NaCl (% 7,5), fenol kırmızısı ve peptonlar içerir. Bu yüksek tuz konsantrasyonu, enterekoklar dışındaki diğer mikroorganizmaların üremesini engeller ve seçici olarak Stafilocoklar ürer. İzole edilen *S. aureus* kolonileri, çevresinde mannitolden asit oluşumunu gösteren sarı bir zon varlığı ile saptanabilir. Nadiren başka Stafilocok türleri de mannitolden asit üretebilir. Bu sebeple bu besiyerinde üretilen mannitol pozitif organizmalar kanlı agar besiyerine pasajlanıp koagulaz üretimi açısından test edilmelidir (Winn ve ark, 2006).

S. aureus’un identifikasyonunu sağlayan moleküler yöntemlerin çoğu Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) bazlıdır. İlk testlerde identifikasyonu doğrulamak için amplifikasyon ürünlerinin Southern blotlama tekniği ile değerlendirilmesi gerekmekteydi (Brown ve ark 2005). Fakat daha sonra, türe spesifik hedef bölgelerin amplifikasyonu için düzenlenmiş, protein genleri gibi hedef bölgeler içeren primer aralığı geliştirildi. Nükleaz (*nuc*), koagulaz (*coa*), protein A (*spA*) ve yüzey-ilişkili fibrinojen-bağlayan protein genleri gibi genler de *S. aureus*’un tanımlanmasında önemlidir. Ayrıca Stafilocokal Metisilin direncinin tespiti için *mecA* ve 16S rRNA gibi spesifik gen bölgelerini değerlendiren multipleks PCR yöntemi de mevcuttur (Grisold ve ark, 2002). Ticari olarak bulunan real-time PCR ile başarı sağlanmıştır. Real-time PCR, ekipmanı olmayan rutin laboratuvarlarda

PCR'ye alternatif sunmak için bir kolorimetrik mikrokuyucuk formatında, *coa* geninden mRNA transkripsiyonunun izotermal sinyal aracılı amplifikasyonu kullanan yeni moleküler bir yöntem de gösterilmiştir (Levi ve ark, 2003).

2.6.3.4. Diğer Testler

İzole edilen Stafilokok suşlarının tiplendirilmesinde, epidemiyolojik yönden yararlı bilgiler sağlayan bakteriyofajlardan yararlanılmaktadır. Faj tiplendirme setleri insan, sığır ve kanatlı *S. aureus* suşları için geliştirilmiştir. Genel olarak fajla tiplendirmede, konakçı spesifik suşlar farklı gruplarda yer almaktadır ve insan ile hayvan orjinli suşlar fajlarla ayrılabilir. Ancak hayvansal kaynaklardan izole edilen suşların farklı gruplarda yer alması ve değişken olması nedeniyle fajla tiplendirme bu suşlar için sınırlı düzeyde bilgi sağlamaktadır (Aydın ve ark, 2006).

2.6.3.5. Slaym Oluşumu

2.6.3.5.1. Christensen Yöntemi (Kalitatif Tüp Testi, TT)

Tüpteki 5 ml soy buyyon besiyerine, incelenecek bakteriden öze ile birkaç koloni alınarak inoküle edilir ve 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılır. Bakteri üremesini takiben tüpteki besiyeri boşaltılır ve boşaltılan her tüpe aynı miktarda 0,4'lük trypan blue konur, elle yavaşça karıştırılır ve boya dökülür. Tüpler kurutma kâğıtları üzerine ters çevrilerek kurumaları sağlanır. Tüp çevresinde oluşan mavi rengin koyuluk ve kalınlığına göre slaym oluşumu +, ++, +++ pozitif, renk oluşmaması ise negatif olarak değerlendirilir. Tüp testi değişken ve subjektiftir (Bilgehan, 2000).

2.6.3.5.2. Kantitatif Mikrodilüsyon Plak Testi (MT)

Plastik mikropalakların çukurlarına bakteri suspansiyonu konarak inkübasyona bırakılır. Bu çukurların içi, daha sonra, mikropalaklar ters çevrilerek boşaltılır. Fosfat tampon eriyiği (PBS) ile yıkandıktan sonra, her bir çukura metilen mavisi konur. Boya dökülür, PBS ile yeniden yıkama işlemi yapılır ve oda ısısında kurutulur. Mikropalaklar mikro ELISA ile 490–492 nm dalga boyunda okunur. Beş kuyucuğa sadece steril buyyon konarak, optik yoğunluk ölçümlerinin ortalaması alınır. Bu değer üstünde olan

kuyucuklar slaym “pozitif” olarak değerlendirilir. Plastik doku kültür plakları ile slaym oluşumunu kantitatif olarak inceleyen bir yöntemdir (Bilgehan, 2000).

2.6.3.5.3. Kongo Kırmızılı Agar Yöntemi (KKA)

Stafilokokların KKA’ya tek koloni ekimleri yapılır. 35°C’de 24 saat inkübasyonun sonunda pembe koloni oluşturan suşlar slaym faktör negatif; koyu kırmızı, kahverengimsi ya da siyah koloni oluşturanlar ise slaym faktör pozitif olarak değerlendirilir. Slaym oluşumunun gözlenmesini teknik koşullar büyük ölçüde etkilemektedir. Slaym oluşumu:

—Besi yerinin yapısı, pH, ısı, Ca ve Mg, fosfat, protein ve agar yoğunluğu,

—Karbonhidrat ve demir varlığı,

—CO₂ içeriği ve oksijenizasyon, gibi çeşitli faktörlere bağımlı olarak, değişiklik gösterebilmektedir (Christensen ve ark, 1994).

Bazı araştırmacılar anaerop ortamda slaym üretimini göstermişlerdir. (Songür ve ark, 1998). Kaleli ve Demir (1999), 100 adet *Koagulaz Negatif Stafilokok* (KNS) suşunda slaym üretiminin, aerop, anaerop ve % 5–10 CO₂’li ortamlarda KKA ve KKT ile araştırmışlar ve slaym faktör pozitifliğini en iyi aerop ortamlarda gözlemişlerdir. Aerop ve anaerop ortamlarda KKA’da slaym oluşumunun, KKT yöntemine göre daha yüksek oranlarda olduğunu belirlemişlerdir. % 5–10 CO₂’li ortamlarda slaym oluşumu bakımından yöntemler arasında bir önemli bir farklılık olmadığını saptamışlardır. KNS’ler içinde en fazla *S. epidermidis*’in slaym ürettiği de bildirilmiştir.

Koagulaz Negatif Stafilokoklarda slaym faktör pozitifliği ile ilgili çok sayıda araştırma vardır. Delialioğlu ve Gedikoğlu (2001), çeşitli klinik örneklerden izole edilen 327 KNS suşunun slaym faktör oluşturup oluşturmadıklarını değerlendirmişler; *S. epidermidis*’in 185 suş (% 56,5) ile slaym faktör oluşturma açısından ilk sırada yer aldığını bildirmişlerdir. Bunu % 25 ve % 17 oranları ile *S. simulans* ve *S. haemolyticus* izlemiştir. Aydın ve ark. (1997), 131 *S. epidermidis*’ten 62’sinde slaym faktör pozitifliğini bildirmişlerdir. Stafilokoklarda slaym oluşumu, genotipik olarak da belirlenebilmektedir. Polisakkarit sentezi genetik kontrol altındadır ve spesifik intersellüler adezyon (*ica*) bölgelerini ve özellikle de *icaA*, *icaB*, *icaC* ve *icaD* genlerini içerir (Arciola ve ark, 2002).

2.7. *S. epidermidis* İdentifikasyonunda Fosfataz Üretimi

Koagulaz Negatif Stafilokok identifikasyonunda geleneksel yöntem olan fosfataz aktivitesi, *S. epidermidis* ve *S. xylosum* suşlarında pozitif, diğer *Koagulaz Negatif*

Stafilokoklarda negatif olarak rapor edilmiştir. Bununla birlikte, diğer *Stafilokok* türleri de fosfataz enzimi üretebilmektedir. 4 farklı metot kullanılarak tüm *S. aureus*, koagulaz pozitif *S. hyicus* ve *S. intermedius* suşları ve en çok karşılaşılan suşlardan olan *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, koagulaz negatif *S. hyicus*, *S. sciuri*, *S. simulans*, *S. xylosus* ve *S. warneri/hominis* suşlarında 24-48 saat inkubasyondan sonra fosfataz aktiviteleri tespit edilmiştir. Fosfataz üretimi besiyerindeki inorganik fosfatın (P_i) varlığından ve pH değerinden etkilenmektedir. Soro ve arkadaşları, üreme besiyerinde P_i yokluğu ve pH 8'de yapılan bir testte çeşitli *Stafilokok* türlerinde fosfataz tespit etmiştir. %3 P_i eklenmiş besiyeri kullanıldığında, sadece *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *S. xylosus* suşlarında fosfataz pozitif çıkmıştır. Bu çalışmalar fosfataz aktivitesinin daha önce düşünülenlerden daha yaygın bir özellik olduğu, bu aktivitenin bazı türlerde esas olabildiği ve diğerlerinde fosfataz ile bastırılmış olabilmektedir. Birçok ticari kit sistemleri biyokimyasal test bünyesinde fosfataz testi (API Staph-IDENT, API Staph, ID32 Staph, RapiDEC Staph) içerdiği halde, *Stafilokoklarda* fosfataz aktivitesinin belirlenmesi için bağımsız testler yoktur. Ayrıca pH 5.6-5.8 arasında p-nitrofenil fosfat (0.495mg/ml) içeren Mueller-Hinton agar olarak tek agar metodu bildirilmiştir. Besiyeri 18-24 saat inkubasyondan sonra değerlendirilir. İnokulum altında parlak sarı renk varlığı fosfataz pozitif olduğunu gösterir (Winn ve ark, 2006).

2.8. *S. epidermidis* ve *S. hominis*'in İdentifikasyonunda Desferrioksamin Duyarlılığı

Lindsay ve arkadaşları *S. epidermidis* ve *S. hominis*'in spesifik identifikasyonu için bir test rapor etmişlerdir (Lindsay ve ark, 1993). Test, akut ve kronik demir yüklenmesinin tedavisinde kullanılan ve *Streptomyces pilosus* tarafından üretilen desferrioksamine duyarlılığı belirlenir. Test, furozolidon ve basitrasin duyarlılık testlerine benzer disk difüzyon testi gibi uygulanır. 0,5 McFarland türbidite standardı ile aynı organizma süspansiyonu hazırlandıktan sonra, BHI agar pleyti inokulum üzerine yerleştirilen süspansiyon ve 1 mg desferrioksamin diski ile birlikte inokule edilir. 35°C'de 1 saat inkübasyondan sonra, pleyt diskin etrafındaki zon incelenir. Lindsay ve ark. (1993) çalışmalarında 95 KNS'un 57'si *S. epidermidis* ve 4 *S. hominis* izolatları desferrioksamine duyarlı, kalan 34 izolat ise dirençli bulunmuştur. Desferrioksamin ticari olarak uygun olmasına rağmen, standardize edilmiş duyarlılık test diskleri kurum içi hazırlanmış olmalıdır (Lüthje ve Schwarz, 2006).

2.9. *S. saprophyticus*'un İdentifikasyonu İçin Novobiosin Duyarlılığı

11 Stafyokok türü (*S. saprophyticus*, *S. cohnii subsp.*, *S. xylosus*, *S. pulvereri*, *S. sciuri*, *S. lentus*, *S. gallinarum*, *S. kloosii*, *S. equorum*, *S. arlatae* ve *S. vitulus*) 1,6 µg/ml veya daha fazla MIC değeri ile novobiosine dirençlidir. *S. saprophyticus* dışındaki novobiosin dirençli türlere nadir rastlanıldığı için, novobiosin duyarlılık testi *S. saprophyticus* identifikasyonu için kullanışlı bir metottur. Novobiosine dirençli türlerde 6 mm (hiç zon yok)-12 mm, duyarlı türlerde ise 16-27 mm zon oluşur. Bu test P agar adında besiyeri kullanılarak hazırlanır (Marshall ve ark, 1998; Lowy ve ark, 2003).

2.10. *S. saprophyticus* ve *S. epidermidis* İdentifikasyonunda Trehaloz-Mannitol-Fosfataz Agar

Trehaloz-mannitol-fosfataz agar (TMPA) *S. saprophyticus* ve *S. epidermidis*'in belirlenmesinde yardımcı olması için formüle edilmiştir. *S. epidermidis* trehaloz ve mannitolden asit üretmez ve çoğu suşu (% 90-96) fosfatazn pozitifdir. *S. saprophyticus*'un trehaloz ve mannitolden asit üretimi değişkendir ve fosfataz negatiftir. TMPA'da asit üretimi, besiyerinde mordan sarıya renk değişimi ile belirlenir ve alkalın fosfataz aktivitesi 1N amonyum hidroksit ile nemlendirilmiş filtre kağıdı üzerine besiyerinden (fenolfitaleyn difosfat içerir) taranan koloniler ile belirlenir. Fosfataz pozitif koloniler filtre kağıdı üzerinde pembe renk üretir. Bu besiyeri ile birlikte novobiosin disk duyarlılık testi birleştirildiğinde *S. saprophyticus* ve *S. epidermidis* identifiye edilebilir. Ayrıca Knapp ve Washington tarafından tasarlanmış trehaloz ve mannitol broth, 2 saat içinde *S. epidermidis*'i diğer KNS'lardan ayırabilir (Knapp ve ark, 1989).

2.11. *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus*'un İdentifikasyonunda Florojenik/Kromojenik Metotlar

2.11.1. Rapidec Staph

Bu yöntem *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus*'u 2 saat içinde identifiye eden kit sistemidir. İdentifiye edilecek izolat suda emülsiyon haline getirilir ve süspansiyon 4 kuyucuğa dağıtılır. İlk kuyucuk kontroldür, diğerleri sırasıyla floresan koagülaz substratı, alkalın fosfataz substratı (PAL) ve β-galaktosidaz substratıdır (BGAL). 2 saatlik inkubasyondan sonra, kuyucuklar ultra viole ışık altında incelenir. Eğer ilk kuyucuğa göre 2. Kuyucukta daha fazla floresan belirlenirse, izolat *S. aureus* olarak identifiye edilir. Eğer

bu test negatifse, diğer kuyucuklar ya direkt olarak (kuyucuk 3) ya da reaktiflerin tespiti için gerekli ilavelerden sonra (kuyucuk 4) incelenir. Kuyucuk 3'teki pozitif reaksiyon izolatin *S. epidermidis* (alkalin fosfataz pozitif), kuyucuk 4'teki pozitif reaksiyon ise izolatin *S. saprophyticus* (β -galaktosidaz pozitif) olduğunu gösterir. Hem PAL hem de BGAL'da oluşan pozitif sonuç, *S. xylosus* veya *S.intermedius*'un olası identifikasyonunu sağlar. Son zamanlarda yayınlanan ölçümlerde, RapiDEC STAPH, 130 *S. aureus* suşunun % 100 doğru identifiye etmiştir; ancak 74 *S. epidermidis* suşunun % 70'ini ve 32 *S. saprophyticus* suşunun % 81'ini doğru identifiye etmiştir. Diğer koagulaz negatif 62 izolatin testinde, 4 *S. sciuri* suşu *S. epidermidis* olarak, 8 izolat (1 *S. hominis*, 3 *S. cohnii*, 3 *S. simulans* ve 1 *S. kloosii*) *S. saprophyticus* olarak yanlış identifiye edilmiştir. RapiDEC STAPH'daki PAL testi *S. epidermidis*'de fosfataz varlığını belirlemede oldukça spesifik olduğu gösterilmiştir; ancak fosfataz negatif veya düşük oranda enzim üreten bu türlerin suşları bu yöntemle *S. epidermidis* olarak identifiye edilemez. Dolayısıyla, *S. epidermidis* identifikasyonunda RapiDEC STAPH'ın sensitivitesi ve verimliliği popülasyondaki PAL pozitif ve negatif suşların prevalansına bağlıdır (Winn ve ark, 2006).

2.12. Konvansiyonel İdentifikasyon Prosedürleri

Stafilokokların identifikasyonundaki biyokimyasal reaksiyonlar bulunmaktadır. Kısaca, biyokimyasal testler nitrat broth, üreaz agar ve arjinin dihidrolaz besiyeri gibi enterik besiyeri kullanarak gerçekleştirilir. Karbonhidrat kullanma testleri % 1 steril karbonhidrat içeren purple broth agarda gerçekleştirilir. Maya özütü ilavesi (% 1-2) geç üreyen suşların daha fazla üremesi için gerekli olabilir. Biyokimyasal testler ve karbonhidratlardan asit üretim testlerine ek olarak, Enterokokların ve KNS'ların identifikasyonuna yardımcı olan polymyxin B (300 U disk), basitrasin (10 U disk) ve pyrolidonyl arylamidase (PYR) testleri gibi antimikrobiyal ajanlara duyarlılığı bildirilmiştir (Hebert, 1988). Son zamanlarda, Rhoden ve arkadaşları, API-Staph-IDENT sisteminden kromojenik enzim substrat seçme testleriyle birlikte Mikrokokların karbonhidrat kullanımı ve biyokimyasal testlerin kullanımı ile değiştirilmiş yeni bir formülasyon yapmıştır. Bu formülasyon önceki referans identifikasyon metodu ile ters düşmektedir. Tarama testleri morfoloji (Gram boyama), familya belirlenmesi (katalaz testi), cins gruplaması (glukoz fermentasyonu) ve bağlı ve serbest koagulazın (lam ve tüp koagulaz, Staph Aurex lateks aglütinasyon testi) varlığını belirlemede kullanılır (Rhoden ve ark, 1993).

2.13. Ticari İdentifikasyon Sistemleri

Çeşitli ticari kitler KNS'ların identifikasyonu için uygundur. Bu kriterlerin tümü organizmanın identifikasyonu için karbonhidrat fermentasyon testleri, nitrat redüksiyonu, üreaz, Voges Proskauer ve kromojenik enzim substrat testleri kullanılır. Bu sistemler üretici tarafından belirli formatlar kullanılarak uyarlanmıştır (Rhabadan ve ark, 2000).

2.13.1. API Staph-Ident

Bu yöntem identifikasyon için organizmanın yoğun süspansiyonu ile inokule edildiği 10 kısaltılmış biyokimyasal testleri içerir. Sistemin veri tabanı *Stomatococcus mucilaginosus*'un ve Stafilocokların 17 tür veya alttürlerini içerir. Staph-IDENT'de *S. mucilaginosus*'un doğrulanmasına ihtiyaç vardır; öneriler, *Micrococcus kristinae*'den organizmayı ayırmak için tuz buyyonda üretme, katalaz varlığı ve Stafilocoklardan ayırmak için lizostafin duyarlılığını belirlemeye yöneliktir. Staph-IDENT kapsamlı olarak değerlendirilmiş ve ticari prosedürlerle uyuma tür testlerine bağlı olarak % 43-95 aralığında bulunmuştur. Rhoden ve ark, Staph-IDENT sistemin *Micrococcaceae* familyasının hem yaygın olarak karşılaşılmış hem de yaygın olmayan türlerde identifikasyonun yetersiz olduğu sonucuna varmıştır (Rhoden ve ark, 1993).

2.13.2. API Staph

Bu yöntem hem Mikrokoklar hem de Stafilocoklar için 18-24 saatlik bir identifikasyon sistemidir. Bu sistem bant formatında, 19 dizili testi içerir ve kit ile birlikte konulan pepton-maya özütü broth besiyerinde hazırlanan organizma süspansiyonu inokule edilirdi veri tabanı 25 sıradan oluşur, insan ve veteriner orjinli Stafilocokları, Mikrokokları ve *S. muclaginosus*'u içerir. API STAPH'ın 277 KNS'dan % 73'ünü doğru olarak identifiye ettiğini bulmuştur. Burada *S. aureus*'u % 100 olarak tespit etmişken, diğer izolatlarda yetersiz kalmıştır (Winn ve ark, 2006).

2.13.3. ID32 Staph

Bu yöntem Mikrokokların identifikasyonu için 24 saatlik bir bant sistemidir ve 26 biyokimyasal test içerir. ID32 Staph tüm sistemlerden en kapsamlı veri tabanına sahiptir ve tüm insan ve hayvan Stafilocok türlerini (*S. saccharolyticus* hariç) kapsar. Sistem ayrıca 6

Mikrokok türü ve *S. mucilaginosus*'u tanımlar. 8 laboratuvarında 792 suşla yürütölmüş uluslararası bir çalışmada ID32 Staph'in % 95,5 izolatu doğru tanımlar ettiği tespit edilmiştir (Stapleton ve ark, 2002).

2.13.4. MicroScan Rapid Pos Combo Paneli

Bu sistem çeşitli test substratları ve karbonhidratlarla fikze edilmiş filtre kağıdı diskleri kullanılır. Mikrokok, Stafilokok ve Streptokok tanımlasyonu için tasarlanmıştır. KNS'ların % 86'sını tanımlar ettiği tespit etmiştir. *S. epidermidis* türlerinden ise % 96'sını tespit etmiş, diğer türlerin tespitinde ise testin doğruluğu izin vermemiştir. Sonuç olarak sistem Stafilokok türlerinin çeşitliliğinde testin seçiciliği optimal değildir (Winn ve ark, 2006).

2.13.5. Staph-Sistem 18-R

Bu sistem 18 modifiye geleneksel substrat içeren plastik tabakadan oluşmaktadır. Kuyucuklar organizma süspansiyonu ile birlikte inokule edilir, panel inkube edilir ve 18-24 saat sonra değerlendirilir. Bu kit sistemlerinin birçoğunda olduğu gibi, *S. lugdunensis* ve *S. schleiferi* gibi önemli izolatların tanımlasyonu için veri tabanının düzenlenmesine ve daha fazla teste gereksinim duyulduğu belirtilmiştir (Winn ve ark, 2006).

2.13.6. VITEK Gram Pozitif İ tanımlasyon (GPI) Kartı

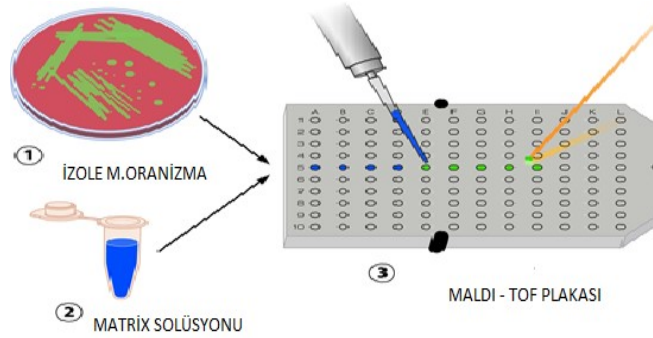
Bu sistem otomatik Vitek bakteriyel tanımlasyon duyarlılık test sistemi ile birlikte kullanmak üzere tasarlanmış, Gram pozitif organizmaların tanımlasyon kartıdır. Kart Stafilokok, Streptokok ve birçok Gram pozitif basil türlerinin tanımlasyonu için substrat içeren 30 mikropleyt içerir. KNS'ların tanımlasyonu genel olarak 10-13 saat sürer. Ancak şu anda veri tabanında bulunmayan *S. lugdunensis* gibi organizmalar ya yanlış tanımlar edilmekte ya da hiç tanımlar edilmemektedir (Winn ve ark, 2006).

2.13.7. MALDI-TOF MS Yöntemi

MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization with Time-of-Flight Mass Spectrometry) yöntemi ile her organizma için özgül olan proteinlerden kütle

spektrometresine dayalı mikroorganizma için özgün bir çeşit parmak izini çıkarmakta, bu sayede bakteri, mantar ve virüs tanımlaması yapılabilmektedir (Holland ve ark, 1996).

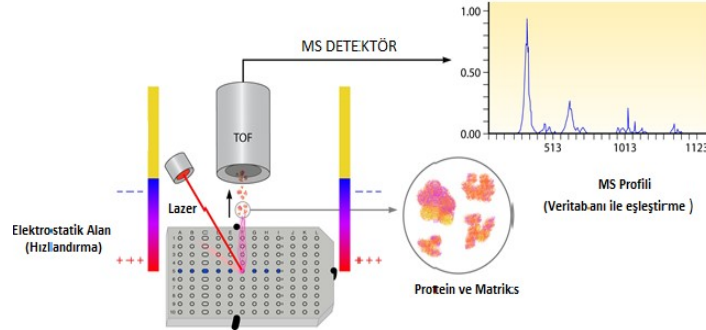
MALDI-TOF MS analizinde örnek hazırlamak için mikroorganizmanın matriks solüsyonu ile karıştırılarak kristalize hale getirilmesi gerekmektedir. MALDI'nin hafif iyonizasyon mekanizması olarak değerlendirildiği bir MS analizinde, matriks denilen küçük kütleli organik bileşimin doygun solüsyonu numuneye eklenir ve karışım analiz için metal hedef plakasında görülür (Şekil 1). MALDI-TOF MS analizinde örnek hazırlamak için mikroorganizmanın matriks solüsyonu ile karıştırılarak kristalize hale getirilmesi gerekmektedir. Çok az miktardaki (10^4 ila 10^6 CFU) mikrobiyal biyokütle analiz için yeterlidir. Bakteri veya mantar çalışılması durumunda bir mikrobiyal koloni analiz edilir. Bazı durumlarda direkt kan kültürü, idrar, omurilik sıvısı ya da protein ekstraktı kullanılabilir. Kurutma ile analiz edilecek materyal ve matriks solüsyonu kristalize edilir. Matriks, hem iyonizasyonun oluşabileceği bir ortam olarak hemde materyalin iyonizasyonu için proton sağlayıcısı olarak çalıştığı için, materyalin başarılı iyonizasyonu açısından gereklidir. Metal plakanın yüzeyinde bulunan numune-matrix kristali, UV lazer ışını kullanılarak ışınlanır. Işınlama aşırı ısınmanın sebep olabileceği bozunmadan kaçınmak için kısa bir zamanda gerçekleşir (Wieser ve ark, 2012).



Şekil 1. İzole kültürden identifikasyon yöntemi kullanan MALDI-TOF MS tarafında yapılan bakteri ve maya saptanmasının genel şeması. Numuneler matrixle kaplanıp ve kurutulur. Plaka sonradan MALDI-TOF MS sistemine yüklenir ve yazılım tarafında analiz edilir (Andrew ve ark 2013)

Lazer ışını matriks-materyal kristalinde küçük bir noktaya odaklanır ve ışın azaltıcısı lazer optiklerinde ışınlanmayı ayarlamak için kullanılır. Lazerden gelen fotonlarla, matriks molekülleri arasındaki ışınlardan gelen enerji arasında olan etkileşim, numunenin iyonizasyonunun olduğu matriksin gaz fazına geçtiği sublimasyonu tetikler. Genellikle UV Lazerleri kullanılmakla birlikte UV'den kızılötesine diğer lazer

mesafelerinin dalgaboyları da MALDI deneylerinde kullanılmaktadır (Şekil 2) (Andrew ve ark, 2013).



Şekil 2. İyonize edilmiş mikrobiyolojik izolatların ve klinik numunenin MS analizinin genel şeması. Uygun bir şekilde işlemde geçirilen numuneler MALDI plakasına eklenir, matrixle kaplanır numune lazer tarafından bombardımana tutulur. Bombardıman hem numunenin hemde matrixin sublimasyonu ve iyonizasyonu sonucunu verir. Bu oluşan iyonlar kütle yüklenme oranlarına göre ayrılır ve bu iyonların spektrum representasyonu oluşturulur ve MS yazılımı tarafından MS profili oluşturularak analiz edilir. Bu profil sonradan referans MS spektrumunun veri tabanı ile karşılaştırılır ve numunede bulunan bakteri veya maya için bir saptama yapılarak kimlikle veya veri tabanındaki en çok ilişkili yakın spektrumla eşleştirilir (Andrew ve ark, 2013)

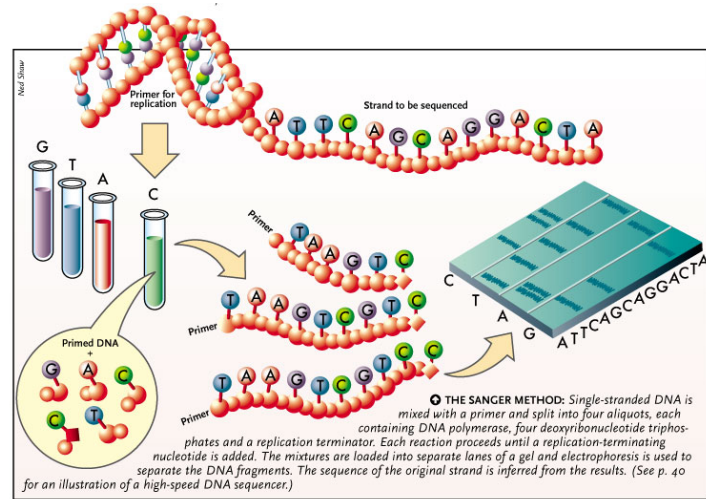
Kültürde üremiş bakterilerin konvansiyonel yöntemlerle tanımlama işlemi 1-2 gün sürebilmektedir. MALDI-TOF MS yöntemi ile doğru şekilde tanımlayabilme oranında bir değişiklik olmadan bu süre 1 saate kadar inebilmektedir. Ayrıca MALDI-TOF MS yöntemi daha önceden 16S rRNA gen sekansı ile ayrılabilen yakın türlerin bile ayrımını başarıyla yapabilmektedir. Günümüzde kullanılan MALDI-TOF MS teknikleri kültür için kullanılan besiyerlerinden ve üreme koşullarından etkilenmeden çalışmaktadır fakat analiz için alınacak koloninin 48 saatten daha yaşlı olmaması tercih edilmektedir. Eskiyen kültürlerde ayırt edici pik sayısı ve bu piklerin yoğunluğu düşmektedir. Buna neden olarak ise eskiyen kültürlerde meydana gelen ribozomal proteinlerin parçalanması gösterilmektedir (Wieser ve ark, 2012).

Bakteriyel tanımlama işlemi örnekten elde edilen bilgilerin veritabanındaki bilgilerle karşılaştırılması sonucunda yapılmaktadır. Direkt olarak koloniden yapılan çalışmada tanımlama yapılamadıysa mikroorganizmaya protein ekstraksiyon protokolleri uygulanarak yöntem tekrarlanmalıdır (Van Veen ve ark, 2010). MALDI-TOF MS yöntemi mikrobiyolojik tanımlama için nispeten yeni bir yöntem olduğundan yanlış tanımlama yapılan ya da tanımlama yapılamayan mikroorganizmaların nedeni genellikle veritabanında o mikroorganizma için yeterli referans spektrumlarının olmamasıdır

(Mellman ve ark, 2008). Bu eksikliğin veritabanının gün geçtikçe gelişmesi ile beraber yakın bir gelecekte aşılacağı düşünülmektedir. Rutin bakteri izoatlarında MALDI-TOF MS'in tür bazında doğru tanımlama oranının % 84,1 ile % 95,2 arasında değiştiği bildirilmiştir (Eigner ve ark, 2009; Seng ve ark, 2009).

2.14. Sanger Sekans Yöntemi

Bu yöntem, DNA polimerazın dNTP'lerin (deoksiribonükleozit trifosfat) yanısıra deoksiribozun 3' pozisyonunda OH grubu taşımayan ddNTP'leri de (dideoksiribonükleozit trifosfat) substrat olarak kullanabilmesine dayanmaktadır. Sentezlenen DNA'ya bir ddNTP'nin katılması ile 3' pozisyonunda OH grubu olmadığı için kendisine nükleotid ilave edilemez ve zincir sentezi sonlanarak bir DNA parçacığı elde edilir. Deneyde, dört reaksiyon karışımı hazırlanır. Her bir reaksiyon karışımı kalıp DNA zinciri, uygun primer, radyoaktif nükleotid trifosfatların dördü ve az miktarda ddNTP'den sadece birini içerir. Zincir sonlanması için dört reaksiyon tüpünde farklı bir ddNTP bulunur. Elektroforez sonrası DNA bantları otoradyografi ile görüntülenir. Bu bantlar yukarıdan aşağıya doğru okunarak dizi saptanır (Şekil 3).



Şekil 3. Sanger sekans yöntemi

2.15. *Staphylococcus aureus* Kaynaklı Mastitislerin Tedavisi, Koruma ve Kontrol

Stafilokokkal mastitislerinin tedavisinde meme içi veya parenteral yolla farklı antibiyotik uygulamalarından yararlanılmaktadır. Akut mastitis olgularında hızlı tedaviye başlamak esas olduğundan, kültür sonuçları beklenmeden geniş spektrumlu bir antibiyotik

ile yüksek dozlarda tedaviye başlanır. İlacın 24 saat aralıklarla üç kez tekrar uygulanması tedavi şansını artırır. Ancak, laktasyon dönemindeki mastitis olguları antibiyotik uygulaması ile tümüyle sağaltılamaması nedeniyle kuru döneme geçildikten sonra da sağaltıma devam edilmesi tavsiye edilmektedir. Perakut mastitis olgularında öncelikle memenin tamamen boşaltılması esastır. Parenteral ve meme içi antibiyotik uygulaması ile infekte meme bölümü ve hayvan kurtarılabilir. Antibiyotik tedavisine paralel olarak toksemiye karşı antihistaminik ve elektrolit tedavisi de uygulanır. Mastitislerin kontrolünde en etkin yöntem uygun ve hijyenik sağım prosedürleri ve meme sağlığı kontrol programlarının uygulanmasıdır. İnfekte hayvanların izolasyonu da yeni mastitis vakalarının sayısını azaltmak için başvurulan bir diğer yöntemdir. Mastitislerin aşılama ile eradikasyonu ve kontrolü ulaşılması güç bir hedef olmakla birlikte, mastitis oranının azaltılması, şiddetinin hafifletilmesi ve kendiliğinden iyileşme süresinin kısaltılmasına yönelik yararlanılmaktadır (Moon ve ark, 2007).

2.16. Koruma ve Kontrol

Mastitisli bir ineği tedavi etmek yerine o ineği mastitise karşı korumak çok daha ekonomiktir. Bu nedenle işletmelerdeki inekleri koruma altına alan bir program uygulanmalıdır. Bu programlar ile daha az mastitis olgusu, daha az süt kaybı, daha az iş gücü olmakta ve tedavi masrafları asgariye inmektedir (Baştan, 2009). Streptokok infeksiyonlarının kontrol edilmesi içinde belirli kritik kontrol noktaları oluşturulmuştur. Sağım sırasındaki hijyen kuralları, kuru dönem tedavisi, sağım öncesi ve sonrası meme dezenfeksiyonu, kronik infekte hayvanların sürüden uzaklaştırılması, sağım makinelerinin optimum şartlarda kullanımı bu kontrol noktalarını oluşturur (Huber ve ark, 2011).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Çalışma, Aydın ilinde yer alan, özel sektöre ait süt sığır yetiştiriciliği yapılan çiftliklerinde 2017 yılı Mart ve Ağustos ayları arasında gerçekleştirilmiştir. Bu çiftlikler hayvan başına günlük ortalama en az 22 litre süt verimine sahiptir. Serbest sistem yarı açık yapıdaki çiftliklerin rasyonlarında süt yemi, kepek, mısır silajı, saman ve yonca bulunmakta ve makine ile sağım yapılmaktadır. Araştırmamızda, 25-250 başlık hayvan kapasitesine sahip 8 çiftlikteki akut klinik mastitisli ineklerden, uzman veteriner hekim tarafından alınmış 100 süt örneği kullanılmıştır. Çalışmaya hepsi laktasyon döneminde olan, son bir ayda antibiyotik tedavisi uygulanmamış, en az bir doğum yapmış, 2-8 yaşlı, Holstein ırkı hayvanlar dahil edilmiştir. Akut klinik mastitisin belirlenmesinde son 3 gün içinde meme bölgesinde görülen yangı semptomlarıyla (ağrı, hassasiyet, kızarıklık, sıcaklık artışı ve fibrinöz doku oluşumu), sütte görülen değişiklikler (süt veriminin azalması, sütte kötü koku, sütün kanlı, irinli, pıhtılı olması) dikkate alınmıştır. Ayrıca klinik mastitis tanısı CMT (California Mastitis Test) ile doğrulanmıştır. Toplanan sütlerin *Staphylococcus* sp. yönünden mikrobiyolojik analizleri, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Teşhis ve Analiz Laboratuvarında yapılmıştır. Araştırmanın gerçekleştirilmesinde, Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyle Yere Etik Kurulunun 25.08.2016 tarihli VII. Oturumu 64583101/2016/140 sayılı karar numarası ile etik açıdan sakınca bulunmadığı bildirilmiştir.

3.1.2. Besiyerleri ve Ayıraçlar

3.1.2.1. Besiyerleri

3.1.2.1.1. Blood Agar (Merck 1. 10886)

Blood Agar	40 g
Distile su	1000 ml

Karışımın pH'sı 7,2-7,4'e ayarlanmış, onbeş dakika otoklav edildikten sonra, 50°C'ye kadar soğutulup, içine % 7 oranında steril insan kanı ilave edildi.

3.1.2.1.2. Mannitol Salt Phenol Red Agar (MSA) (Merck 1.05404)

MSA ayırt edici ve seçici bir besi yeridir. Stafilokokların saf olarak elde edilmesi ve laboratuvarında tanımlanabilmesi açısından önemli olan mannitol fermantasyonunun gözlenebilmesi için MSA kullanıldı.

Mannitol Salt Phenol Red Agar 108 g

Distile su 1000 ml

Karışımın pH'sı 7,2–7,4'e ayarlanıp, onbeş dakika otoklavda sterilize edildikten sonra, 50°C'ye kadar soğutulup petrilere döküldü.

3.1.2.1.3. Mueller-Hinton Agar (MHA) (Oxoid CM 129)

Mueller-Hinton Broth 38 g

Distile su 1000 ml

pH: 7,3±0,2

Besiyeri 38 g olacak şekilde distile su içinde kaynatılarak eritilip 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi. 45–50 °C'a soğutulup steril petri kutularına 12,5 ml döküldü.

3.1.2.1.4. Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (% 20 Gliserinli) (Oxoid CM 0225)

BHIB 8 g

Gliserin 20 ml

Distile su 80 ml

Karışımın pH'sı 7,2–7,4'e ayarlanıp, 0,5 ml miktarda ependorf tüplere dağıtıldıktan sonra 121°C'de onbeş dakika otoklavda sterilize edildi.

3.1.2.1.5. Trypton Soya Broth (TSB) (% 7,5 Tuzlu) (Oxoid CM 129)

TSB 8 g

NaCl 75 g

Distile su 1000 ml

Karışımın pH'sı 7,2–7,4'e ayarlandı. 5 ml miktarda tüplere dağıtıldı. 121°C'de onbeş dakika otoklavda sterilize edildi.

3.1.2.1.6. DNase Test Agar (Merck 1.10449)

Triptoz	20 g
NaCl	75 g
Deoksiribonükleik asit	2 g
Agar agar	15 g
Distile su	1000 ml

Karışımın pH'sı 7,2–7,4'e ayarlandı. 121°C'de onbeş dakika otoklavda sterilize edildi. 12.5'er ml miktarda steril petrilere döküldü.

3.1.2.2. Kaliforniya Mastitis Test Ayracı (Immucell®)

Alkil Benzen Sülfonat

pH indikatörü

Ayraçlar, süt ile karıştırılarak enfeksiyonun derecesine göre klinik mastitis şüphesi taşıyan hayvanların sütleri toplandı.

3.1.3. Primerler

Staphylococcus sp. identifikasyonu için araştırmamızda kullanılan fD1 ve Rs16 universal primerler Tablo 1.'de verilmiştir.

Tablo 1. *Staphylococcus* sp. identifikasyonu için kullanılan universal primerler

Primer	Oligonükleotiddizisi (5'-3')	Referans
fD1	5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3'	Guendouzi ve ark 2013
Rs16	5' TACGGCTACCTTGTTACGACTT 3'	Guendouzi ve ark 2013

3.2. Yöntem

3.2.1. Örneklerin alınması

Her süt örneği alınırken, meme başları su ve sünger yardımı ile temizlenip kurulanmış ve % 70'lik alkol ile silinmiştir. Meme başındaki saprofit bakterileri uzaklaştırmak için ilk birkaç ml süt atıldı. Steril enjektörler içine 10 ml miktarda alınmıştır. Alınan tüm örnekler soğuk zincir altında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına aynı gün getirilip laboratuvar çalışmalarına başlanmıştır.

3.2.2. *Staphylococcus* sp. İzolasyonu

Laboratuvara getirilen süt örnekleri doğrudan MSA'ya ekilmiştir. 37 °C'de 24 saat inkubasyondan sonra üreyen koloniler % 7 koyun kanı içeren Kanlı agar ekilmiş ve 24 saat inkubasyondan sonra gram boyama yapılarak gram pozitif kok olarak değerlendirilen suşların biyokimyasal özellikleri standart laboratuvar işlemleri uygulanarak değerlendirilmiştir.

3.2.3. *Staphylococcus* sp. Mikroskopisi

Elde edilen örneklerin Gram (+) *Staphylococcus* cinsine ait olup olmadığının tespiti amacıyla Gram boyama uygulanmıştır. Gram boyama için, örnekten temiz bir lam üzerine steril öze ile 2-3 öze dolusu su konulmuş ve 24 saatlik bakteri kültüründen de öze ile alınarak su ile karıştırılarak lam üzerine yayılmıştır. Lam havada kurutulduktan sonra alevden geçirilerek fikse edilmiş ve kristal viyole ile 1 dk boyanmıştır. Bu süre sonunda boya dökülmüş ve lam üzerine lugol çözeltisi damlatılarak 1 dakika beklenmiş ve bu süre sonunda lügol çözeltisi dökülerek kurutma kâğıdı ile kurulanmıştır. Lam % 96'lık etil alkole daldırılıp çıkarılarak 10-15 saniye süreyle alkol ile yıkanmış daha sonra ise saf su ile yıkanarak kurutma kâğıdı ile kurulanmıştır. Son olarak lam üzerine safranin damlatılarak 30 saniye süreyle boyanmış ve örnek saf su ile yıkanarak kurulandıktan sonra mikroskopta incelenmiştir. Mikroskopta Gram (+) özellik gösteren yuvarlak biçimli bakteriler aranmıştır (Winn ve ark, 2006).

3.2.4. *Staphylococcus* sp. Konvansiyonel İdentifikasyonu

İzolatların fenotipik identifikasyonlarında kullanılan katalaz, novobiocin ve bacitracin duyarlılık, DNase ve tüp koagulaz testleri aşağıdaki anlatıldığı şekilde yapılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.1. Katalaz Testi

Bu test için besiyerinde üreyen kolonilerden steril öze ile alınıp temiz bir lam üzerine aktarıldıktan sonra üzerine 1–2 damla % 3'lük hidrojen peroksit damlatılmıştır. Katalaz enzimi oluşturan bakteriler hidrojen peroksiti su ve oksijene ayrıştırdığı için ortamdaki oksijen çıkışı kabarcık oluşumu ile belirlenmiştir. Bu nedenle test sonucu kabarcıklar meydana geldiğinde katalaz pozitif, kabarcıklar oluşmadığında ise katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir. *Streptococcus* sp. katalaz negatif, *Micrococcaceae* familyasındaki *Micrococcus* sp. ve *Staphylococcus* sp. ise pozitiftir (Bilgehan, 2000).

3.2.4.2. Basitrasin Duyarlılığı

Katalaz pozitif suşlardan tek bir koloni Tripttik Soy Broth'da üretildikten sonra Mueller Hinton Agara ekim yapılmıştır ve ekim hattı üzerine basitrasin diski (Oxoid 0,04U/ml) yerleştirilmiştir. 37°C'de 24 saat inkube edildikten sonra basitrasine dirençli suşlar *Staphylococcus* sp. olarak ayrılmıştır.

3.2.4.3. Koagulaz Testi

Çalışmada, kullanılan bakterilerin koagulaz testleri tüpte gerçekleştirilmiştir. Bunun için incelenecek koloni, içerisinde 0,8 ml serum fizyolojik ve 0,2 ml EDTA'lı tavşan plazması (Bactident Coagulase, 1.13306.0001 Merck®) bulunan bir tüpe ekilmiştir. 37°C'deki benmaride bırakılarak 1, 2, 4, 8 ve 24. saatlerde pıhtının oluşması gözlemlenmiştir. Koagulaz enzimine sahip türlerin kan plazmasını koagüle etmesi sonucunda test tüpünde katılaşma meydana gelirse, test sonucu pozitif, katılaşma meydana gelmiyorsa negatif olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen tüm koagulaz pozitif ve negatif suşlar daha sonra kullanılmak üzere, % 20 gliserinli BHIB içerisinde -80°C'de saklanmıştır.

3.2.4.4. Mannitol Fermentasyonu

Katalaz pozitif ve koagulaz negatif olan suşlar bakterilerin mannitol salt agara ekimleri yapıldı. 37 ° C'de 24 saatlik inkubasyondan sonra izole edilen *Staphylococcus* kolonileri çevresinde mannitolden asit oluşumunu gösteren sarı bir zon varlığı ile değerlendirilmiştir.

3.2.4.5. DNAz Testi

DNA'lı besiyerine Stafilokok izolatlarından çizgi ekimi yapıp 35°C'de 24 saat bekletilmiş, daha sonra agar yüzeyine 1 N HCl damlatılmıştır. Ekim çizgisinin çevresinde saydam bir zon oluşması ile test değerlendirilmiştir.

3.2.5. *Staphylococcus* sp. API Staph ile İdentifikasyon

Kanlı agarda üreyen 18-24 saatlik taze kültürlerden öze vasıtası ile alınarak 5ml'lik steril süspansiyon sıvısında 0.5 McFarland'a eşit türbiditede bakteri süspansiyonu hazırlandı. McFarland ölçümünde bioMérieux marka DensiCHEK™ Plus model McFarland cihazı kullanıldı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda 20 dehidre test maddesi içeren strip steril ve aseptik koşullarda, hazırlanan bakteri süspansiyonu ile dolduruldu. 20 dehidre test maddesi ve inkübasyon sonrası oluşan renk reaksiyonları Tablo 2'de belirtilmiştir. Doldurulan stripler numune isimlendirmesi yapılarak 37°C'de 24 saat inkübe edildiler. İnkübasyon sonunda; ek reaktif gerektiren kuyucuklara (VP, NIT, PAL) üretici talimatlarında belirtilen şekilde ek reaktifler damlatıldı. Oluşan reaksiyonlar görsel olarak değerlendirilerek sonuç kağıdına işlendi ve her bir mikroorganizma için sayısal profil oluşturuldu. Elde edilen sayısal profiller çevrimiçi bir profil tanımlama programı olan apiWEB programına girilerek identifikasyon sonuçları alındı.

Tablo 2. API Staph test kiti için değerlendirme kriterleri

TESTLER	AKTİF İÇERİKLER	MİKTAR (mg/küp.)	REAKSİYONLAR/ENZİMLER	SONUÇ	
				NEGATİF	POZİTİF
0	Substrat yok		Negatif kontrol	kırmızı	—
GLU	D-glukoz	1.56	(Pozitif kontrol) (D-GLUcose)	kırmızı	sarı
FRU	D-fruktoz	1.4	asidifikasyon (D-FRUctose)		
MNE	D-mannoz	1.4	asidifikasyon (D-ManNosE)		
MAL	D-maltoz	1.4	asidifikasyon (MALtose)		
LAC	D-laktoz (inek orijinli)	1.4	asidifikasyon (LACtose)		
TRE	D-trehaloz	1.32	asidifikasyon (D-TREhalose)		
MAN	D-mannitol	1.36	asidifikasyon (D-MANnitol)		
XLT	Xylitol	1.4	asidifikasyon (XyLiTol)		
MEL	D-melibioz	1.32	asidifikasyon (D-MELibiose)		
NIT	potasyum nitrat	0.08	NITratların nitritlere indirgenmesi		
PAL	β -naftil fosfat	0.0244	Alkaline Phosphatase	ZYM A + ZYM B / 10 dk. sarı mor	
VP	sodyum piruvat	1.904	Acetyl-methyl-carbinol production (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / 10 dk. renksiz-açık pembe mor-pembe	
RAF	D-raffinöz	1.56	asidifikasyon (RAFfinose)	kırmızı	sarı
XYL	D-ksiloz	1.4	asidifikasyon (XYLose)		
SAC	D-sakkaroz (sukroz)	1.32	asidifikasyon (SACcharose)		
MDG	methyl- \square D-glukopiranosid	1.28	asidifikasyon (Methyl- \square D-Glucopyranoside)		
NAG	N-acetyl-glukozamin	1.28	asidifikasyon (N-Acetyl- Glucosamine)		
<u>ADH</u>	L-arginin	1.904	Arginine DiHydrolase	sarı	turuncu-kırmızı
<u>URE</u>	üre	0.76	UREase	sarı	kırmızı - mor

3.2.6. *Staphylococcus* sp. VITEK 2 Compact ile İdentifikasyon

Çalışmamızda veritabanında Stafilocokların da yer aldığı VITEK GP (Gram Pozitif) identifikasyon kartları Kullanıldı. Tablo 3’de VITEK 2 Compact cihazı veritabanında yer alan Stafilocok türleri sunulmuştur.

Tablo 3. VITEK 2 Compact cihazı veritabanında yer alan Stafilocok türleri

<i>Staphylococcus hominis</i> ssp. <i>hominis</i>	<i>Staphylococcus sciuri</i>	<i>Staphylococcus caprae</i>
<i>Staphylococcus hominis</i> ssp. <i>novobiusepticus</i>	<i>Staphylococcus simulans</i>	<i>Staphylococcus carnosus</i> ssp. <i>carnosus</i>
<i>Staphylococcus hyicus</i> +	<i>Staphylococcus vitulinus</i>	<i>Staphylococcus chromogenes</i>
<i>Staphylococcus intermedius</i> +	<i>Staphylococcus warneri</i>	<i>Staphylococcus cohnii</i> ssp. <i>cohnii</i>
<i>Staphylococcus kloosii</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i>	<i>Staphylococcus cohnii</i> ssp. <i>urealyticus</i>
<i>Staphylococcus lentus</i>	<i>Staphylococcus arlettae</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> +
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> *+	<i>Staphylococcus equorum</i>
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Staphylococcus auricularis</i>	<i>Staphylococcus gallinarum</i>
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	<i>Staphylococcus capitis</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>

+ Koagulaz pozitif türler, * Patojen olarak değerlendirilen tür

VITEK GP kartları içerisinde karbon kaynağı kullanımı, enzimatik aktiviteler ve direnci ölçen biyokimyasal testlerden oluşan 43 substrat kuyucuğu bulunmaktadır. Tablo 4’de VITEK GP kartı içeriğinde yer alan 43 adet substrat belirtilmiştir.

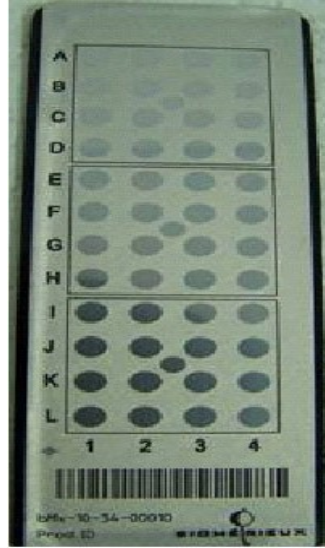
Tablo 4. VITEK GP kartı içeriğinde yer alan substratlar

D-AMİGDALIN	L-LAKTAT alkalınleşmesi
FOSFATİDİLİNOSİTOL FOSFOLİPAZ C	LAKTOZ
D-KSİLOZ	N-ASETİL-D-GLUKOSAMİN
ARJİNİN DİHİDROLAZ 1	D-MALTOZ
BETA-GALAKTOSİDAZ	BACİTRASİN DİRENCİ
ALFA-GLUKOSİDAZ	NOVOBİYOSİN DİRENCİ
Ala-Phe-Pro ARİLAMİDAZ	%6,5 NaCl’DE ÜREME
SIKLODEKSTRİN	D-MANİTOL
L-Aspartat ARİLAMİDAZ	D-MANNOZ
BETA GALAKTOPIRANOSİDAZ	METİL-B-D-GLUKOPIRANOSİD
ALFA-MANOSİDAZ	PULLULAN
FOSFATAZ	D-RAFİNOZ
Lösin ARİLAMİDAZ	O/129 DİRENÇ (comp.vibrio.)
L-Prolin ARİLAMİDAZ	SALİCİN
BETA GLUKURONİDAZ	SAKKAROZ/SÜKROZ
ALFA-GALAKTOSİDAZ	D-TREHALOZ
L-Pirolidonil-ARİLAMİDAZ	ARJİNİN DİHİDROLAZ 2
BETA-GLUKURONİDAZ	OPTOKİN DİRENCİ
Alanin ARİLAMİDAZ	POLİMİKSİN DİRENCİ
Tirosin ARİLAMİDAZ	D-GALAKTOZ
D-SORBITOL	D-RİBOZ
ÜREAZ	

Kanlı agarda üreyen 18-24 Saat'lik taze kültürlerden steril pamuk eküvyon çubuğu vasıtası ile alınan koloniler ile üreticinin talimatları doğrultusunda, 3 ml steril salin solüsyonu içersinde 0.50-0.63 McFarland arasında yoğunluğa sahip süspansiyon hazırlandı. McFarland ölçümünde bioMérieux marka DensiCHEK™ Plus model McFarland cihazı kullanıldı. Hazırlanan bakteri süspansiyonu tüplerine VITEK GP kartları yerleştirildi ve üreticinin talimatları doğrultusunda kart barkodları ile numune isimleri eşleştirilerek cihazın doldurucu kısmına yüklendi. Doldurucu kısmında dolum işleminin bitimi akabinde, kartlar cihazın inkübasyon modülüne aktarıldı. Bu aktarım sonrası cihaz tarafından, girilen numune isimleri ve kart barkodlarının eşleştirmeleri yeniden kontrol edilip dolumu yapılan kartlar cihazın inkübasyon modülüne otomatik olarak aktarıldı. İnkübasyon süreci sonunda VITEK 2 Compact cihazı tarafından sonuçlar otomatik olarak yazdırıldı.

3.2.7. *Staphylococcus* sp. VITEK MS (MALDI-TOF MS) ile İdentifikasyon

Çalışmamızda VITEK MS/IVD/V.3.0 (bioMérieux, France) veritabanı kullanıldı ve üreticinin talimatı doğrultusunda gerçekleştirilen bütün işlemler aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Ön testler ile Gram pozitif, kok ve katalaz pozitif olarak saptanan stafilocok grubu izolatlarımızdan kanlı agara alt kültür alındı. 18-24 saat sonrasındaki taze kolonilerden birer koloni 1 µl'lik öze ile alınarak VITEK MS slaytlarına ince bir tabaka halinde yayıldı. Bir slaytta aynı anda 34 adet izolat hazırlandı. Hazırlanan slaytta her 16 kuyucuk ortasında yer alan kalibrasyon kuyucuğuna kalite kontrol ve kalibrasyon amacıyla kütle spektrum profili çok iyi bilinen *E. coli* ATCC 8739 ince bir tabaka halinde yayıldı. Hazırlanan slayttaki kuyucukların her birinin üzerine 1'er µl matriks solüsyonu CHCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) eklendi ve oda ısında kurumaya bırakıldı. 2 Dakika beklenildikten sonra slayt cihaz içine yerleştirilerek çalışma başlatıldı. Cihaz ilk çalıştırıldığında vakum ve kalibrasyon işleminin yaklaşık 10 dakika sürmesinin ardından izolatların her birinin spektrumları alınmaya başlandı. 48 adet örnek ve 3 adet kalibrasyon spotunun yer aldığı slaytımızın toplam raporlama süresi 57 dakika olarak ölçüldü (Örnek başına yaklaşık 1.7 Dakika). Çalışmada kullanılan VITEK MS slaytı Şekil 4'de sunulmuştur.



Şekil 4. VITEK MS Slaytı

3.2.8. *Staphylococcus* sp. 16S rRNA ile Genotipik İdentifikasyon ve Sekans Yöntemi

3.2.8.1. DNA Ekstraksiyonu

Öncelikle *Staphylococcus* sp. izolatlarından PCR’da kullanılmak üzere izolatlardan total DNA ekstraksiyonu Fermentas® DNA ekstraksiyon kit ile gerçekleştirildi.

Fermentas® DNA Isolation Kit Prosedürü:

*Bir öze dolusu kültür 400 µl lizis solusyonu ile süspanse edildi. 65°C’de 5 dk inkübe edildi.

*600 µl kloroform ilave edildikten sonra 10.000 rpm’de 2 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı.

*800 µl presipitasyon solusyonu pelet üzerine ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 1-2 dakika karıştırıldı.

*10.000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildikten sonra DNA içeren pelet 1.2 M NaCl solusyonunda çözdürüldü.

*300 µl etanol eklendikten sonra 10 dakika -20°C’de bekletildi. 10.000 rpm’de 3 dakika santrifüj edildikten sonra %70’lik etanol ile yıkandı. Daha sonra 100 µl steril distile suda çözüldü. Her bir PCR reaksiyonu için 5 µl template DNA kullanıldı.

3.2.8.2. PCR

16S rRNA primerine spesifik ürünlerin aranması için yapılan PCR reaksiyonlarında bir örnek için PCR amplifikasyonu toplam 20 µl toplam hacimde, olacak şekilde gerçekleştirildi. Kullanılan malzemeler ve hacimleri Tablo 5’de belirtilmiştir.

Tablo 5. Mastermiks hazırlanma oranları

Malzeme (Ticari)	Kullanılan Hacim
MASTER Mix (GeneALL,Cat no.544-010,Lot no: TM016G19001)	10µL
Forward Primer (10pmol)	1µL
Reverse Primer (10pmol)	1µL
DNA	3 µL
ddH ₂ O	5 µL
TOPLAM	20 µl

Mastermikslere hazırlandıktan sonra 0,2 mL’lik tüpler, örnek adedi kadar numaralandırılıp, içlerine 16S rRNA 17’şer µl hazırlanan mastermiksten ilave edildi. Daha sonra, ekstraksiyonu yapılan DNA’dan için 3’şer µl alınıp ilgili tüplerin içerisine eklendi ve ağızları sıkıca kapatıldı. Hazırlanan tüpler daha sonra Applied Biosystems® SimpliAmp termal döngüleme cihazlarına yüklenip, programlandı. *Staphylococcus* sp. 16S rRNA analizlerinde kullanılan PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı Tablo 6’da gösterilmiştir.

Tablo 6. *Staphylococcus* sp. 16S rRNA PCR işlemlerine ait ısıl döngü ve süre diyagramı

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Başlangıç Denatürasyon	1	95°C	5 dk
Denatürasyon	37	95°C	30 sn
Bağlanma		55°C	30 sn
Uzama		72°C	30 sn
Son Uzama	1	72°C	5 dk
Bekletme	1	4°C	∞ dk

3.2.8.3. PCR Ürün Purifikasyonu

Jel elektroforezi sonucunda elde edilen bant jelden kesildi ve GelSV® (GeneALL Cat no: 102-150, Lot no:10215L08056) ile ürün saflaştırıldı. Saflaştırma prosedürü aşağıda belirtilmiştir:

- Jel görüntüleme cihazı altında istenilen bantlar alkolle temizlenmiş bistüri ile kesildi.
- Kesilen jel parçası mikrosantrifüj tüpüne konuldu.
- Hassas terazi de tartıldı. 100 mg ürüne 300 µl (3X volume) GB buffer eklenir.
- 50°C’de 5-10 dk inkübe edildi.
- Jel parçası içerisinde eriyene kadar bekletildi. Karışımın rengi sarı olarak gözlemlendi. Pipetaj yapıldı.
- 1X volume isopropanol eklenip vorteks yapıldı.
- Elde edilen karışım SV kolona aktarıldı.
- 10.000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi.
- Ependorf tüp yenilendi.
- Üzerine 500 µl GB buffer eklenip 1 dakika santrifüj edildi. Ependorf tüp yenilendi.
- Üzerine 700 µl NW Buffer eklendi. 1 dakika santrifüj edildi. Ependorf tüp yenilendi.
- Herhangi bir wash buffer kalma ihtimaline karşı 2 dk santrifüj yapıldı. 14.000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi.
- Kolon temiz ve etiketli 1.5 ml lik eppendorfa aktarıldı.
- Üzerine 50 µl Elution buffer eklendi.
- 14.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Purifiye PCR ürünleri, sekans işlemine kadar -20°C’de saklandı.

3.2.8.4. Sekans PCR İşlemi

Purifiye edilen PCR ürünlerinin Sekans PCR bileşenleri ve prosedürü, Tablo 7 ve Tablo 8’de belirtilmiştir.

Tablo 7. Sekans PCR bileşenleri

Malzeme (Ticari)	Kullanılan Hacim
PCR ürünü	5 µl
Primer (F/R) (3.2 pmol)	1 µl
Florasan işaretli Dye Terminatör	1 µl
5X sekans buffer	4 µl
ddH ₂ O	2/0 µl
TOPLAM	11 µl

Tablo 8. Sekans PCR işlemlerine ait ısıl döngü ve süre diyagramı

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Başlangıç Denatürasyon	1	95°C	30 sn
Denatürasyon	30	95°C	10 sn
Bağlanma		50°C	5 sn
Uzama		60°C	4 dk
Bekletme	1	4°C	∞ dk

3.2.8.5. Sekans PCR Purifikasyon Protokolü

Sephadex ile jel filtreleme metodu kullanılarak sekans PCR purifikasyonu gerçekleştirilir.

1. 25 örnek için 1.5 g sefadex tartıldı ve 20 ml'ye saf su tamamlanarak vortekslendi.
2. Kolonlara 850 – 900 µl hazırlanılan sefadex solüsyonundan kondu.
3. 4600 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Kolon hazırlandı.
4. Sekans PCR ürününün hepsi kolona yüklendi.
5. 4800 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
6. Alt tüpte kalan sıvı cihaz plate kuyucuğuna yüklendi. Üzerine 5 µl formamid konuldu.

Purifiye edilen sekans PCR ürünleri ABI PRISM® 3130XL cihazı ile sekanslanmıştır. Elde edilen sonuçlar, NCBI Blast® nükleotid dizileri ile elektronik ortamda karşılaştırılarak benzerlik oranları yüzde olarak saptanmıştır.

3.3. Antibiyogram

Antibiyogram çalışmamızda 418591 referans numaralı VITEK AST-P641 kartları kullanıldı. Tablo 9’da VITEK AST-P641 kartında yer alan antibiyotikler, konsantrasyonları ve raporlanabilir aralıkları belirtilmiştir.

Tablo 9. VITEK AST-P641 kartında yer alan antibiyotikler, konsantrasyonları ve raporlanabilir aralıkları

Antimikrobiyel Ajan	Konsantrasyon	Raporlanabilir Aralık	
		≤	≥
Penisilin (P)	0.125,0.25,1,2,8,64	0.12	8
Cefoxitin (OXSF)	6	NEG	POS
Siprofloksasin (CIP)	1, 2, 4	0.5	8
Eritromisin (E)	1, 2, 4, 8	0.25	8
Klindamisin (CM)	0.06, 0.25, 1	0.125	4
Linezolid (LNZ)	0.5, 1, 2	0.5	8
Daptomycin (DAP)	0.5, 1, 2, 4, 16	0.12	8
Teicoplanin (TEC)	0.5, 2, 8, 32	0.5	32
Vankomisin (VA)	1, 2, 4, 8, 16	0.5	32
Tetrasiklin (TE)	0.5, 1, 2	1	16
Tigesiklin (TGC)	0.25, 0.5, 1	0.12	2
Fosfomisin (FOS)	8, 32	8	128
Trimetoprim/Sulfametoksazol (SXT)	8/152, 16/304, 32/608	10(0.5/9.5)	320(16/304)

VITEK GP kartları ile yapılan iddentifikasyon çalışmasında hazırlanan 0.50 – 0.63 McFarland yoğunluğundaki bakteri süspansiyonundan 280 µl alınarak steril başka bir 3 ml’ lik salin solüsyonuna aktarıldı ve otomatik pipet vasıtası ile numunenin homojen şekilde karışımı sağlandı. VITEK Kartları ile identifikasyon işleminde olduğu gibi önce cihaz tarafından dolumu sonrasında da inkübatör modülüne aktarımı yapıldı. Sonuçlar 8 saat içinde cihaz tarafından alındı.

4. BULGULAR

Bu çalışmada Aydın ili ve çevresindeki süt sığırcılığı işletmelerinde bulunan hayvanlardan klinik bulgular ve California Mastitis Test ile mastitis problemi gösterdiği belirlenen hayvanlara ait sütler steril koşullarda alınan, toplam 100 adet süt örneği konvansiyonel yöntemler ile *Staphylococcus* sp. yönünden incelenmiştir. İzole edilen *Staphylococcus* sp. izolatları API Staph, VITEK2, MALDI-TOF MS, 16S rRNA genotipik identifikasyon ve Sekans yöntemleri ile tanımlanarak metodolojik karşılaştırmaları yapılmıştır. İzolatların antibiyotik duyarlılıkları VITEK2 cihazında VITEK AST-P641 kartları kullanılarak yapılmıştır.

4.1. Konvansiyonel Yöntemler ile *Staphylococcus* sp. İzolasyon Bulguları

Araştırmamızda incelenen 100 süt örneğinin 34 (% 34,0)' ünden *Staphylococcus* sp. izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen *Staphylococcus* sp. suşlarının koagulaz testi sonucunda 7 (% 20,6)'sı koagulaz pozitif *Staphylococcus* sp. ve 27 (% 79,4)'i koagulaz negatif *Staphylococcus* sp. olarak belirlenmiştir. İzolatların biyokimyasal testler ile yapılan identifikasyonları sonucunda 7 (% 20,60)'si *Staphylococcus aureus*, 11 (% 32,30)'u *Staphylococcus simulans*, 8 (% 23,50)'i *Staphylococcus epidermidis*, 4 (% 11,80)'ü *Staphylococcus saprophyticus*, 2 (% 5,90)'si *Staphylococcus chromogenes* ve 2 (% 5,90)'si *Staphylococcus hyicus* olarak tanımlanmıştır (Tablo 10).

Tablo 10. Örneklerden konvansiyonel yöntemlerle izole edilen *Staphylococcus* türlerinin dağılımı

Örneklerden İzole Edilen <i>Staphylococcus</i> Sayısı	Koagulaz Testi Sonucu	İzole Edilen Türler	İzolasyon Sayıları (Adet)	İzolasyon Yüzdeleri (%)
<i>Staphylococcus sp.</i> n=34	Koagulaz Pozitif <i>Staphylococcus sp.</i> n=7	<i>S. aureus</i>	7	20,60
		<i>Staphylococcus simulans</i>	11	32,30
	Koagulaz Negatif <i>Staphylococcus sp.</i> n=27	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	8	23,50
		<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	4	11,80
		<i>Staphylococcus chromogenes</i>	2	5,90
		<i>Staphylococcus hyicus</i>	2	5,90

4.2. API Staph ile *Staphylococcus* İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Araştırmamızda konvansiyonel yöntemler ile identifikasyonları yapılan 34 (% 34,0) *Staphylococcus* suşunun ayrıca API Staph kiti ile de identifikasyonları yapılmıştır. API Staph kiti ile yapılan identifikasyon sonucunda, izolatların 7 (% 20,60)'si *Staphylococcus aureus*, 11 (% 32,30)'u *Staphylococcus simulans*, 8 (% 23,50)'i *Staphylococcus epidermidis*, 4 (% 11,80)'ü *Staphylococcus saprophyticus*, 2 (% 5,90)'si *Staphylococcus chromogenes*, 1 (% 2,95)'i *Staphylococcus hyicus* ve 1 (% 2,95)'i *Staphylococcus lugdunensis* olarak tiplendirilmiştir.

Araştırmamızda konvansiyonel yöntemler ile identifiye edilen 2 *Staphylococcus hyicus* suşundan birinin API Staph kiti ile *Staphylococcus lugdunensis* olarak identifiye edildiği görülmektedir (Tablo 11).

Tablo 11. API Staph identifikasyon sonuçları

Sıra	Numune No	Koagülaz Sonucu	API Staph ile İzole Edilen <i>Staphylococcus</i> Türleri	API Staph Yüzdesi
1	7	KPS	<i>Staphylococcus aureus</i>	85,5%
2	21	KPS	<i>Staphylococcus aureus</i>	77,5%
3	40	KPS	<i>Staphylococcus aureus</i>	69,3%
4	45	KPS	<i>Staphylococcus aureus</i>	70,9%
5	75	KPS	<i>Staphylococcus aureus</i>	77,5%
6	83	KPS	<i>Staphylococcus aureus</i>	97,1%
7	85	KPS	<i>Staphylococcus aureus</i>	71,6%
8	14	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	97,1%
9	17	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	89,1%
10	18	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	86,6%
11	33	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	69,3%
12	60	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	96,2%
13	64	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	69,3%
14	66	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	97,1%
15	73	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	86,6%
16	76	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	77,5%
17	89	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	70,9%
18	98	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	96,2%
19	15	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	87,3%
20	19	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	77,5%
21	23	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	58,5%
22	42	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	71,6%
23	46	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	60,6%
24	55	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	88,1%
25	62	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	85,5%
26	87	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	82,1%
27	8	KNS	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	85,5%
28	44	KNS	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	82,1%
29	92	KNS	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	60,6%
30	96	KNS	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	88,1%
31	67	KNS	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	87,3%
32	77	KNS	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	58,5%
33	69	KNS	<i>Staphylococcus hyicus</i>	89,1%
34	81	KNS	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	69,3%

4.3. VITEK 2 Compact ile *Staphylococcus* İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Araştırmamızda konvansiyonel yöntemler ve API Staph kiti ile identifikasyonları yapılan *Staphylococcus* izolatlarını doğrulamak amacıyla VITEK 2 Compact cihazı kullanılmıştır. VITEK 2 Compact cihazı ile yapılan identifikasyon sonucunda, izolatların 7 (% 20,60)'si *Staphylococcus aureus*, 11 (% 32,30)'u *Staphylococcus simulans*, 8 (% 23,50)'i *Staphylococcus epidermidis*, 4 (% 11,80)'ü *Staphylococcus saprophyticus*, 2 (% 5,90)'si *Staphylococcus chromogenes*, 2 (% 5,9)'si *Staphylococcus hyicus* olarak tiplendirilmiştir.

Araştırmamızda VITEK 2 Compact cihazıyla elde edilen sonuçlar, konvansiyonel yöntemler ile elde edilen sonuçlarla paralellik göstermektedir (Tablo 12).

Tablo 12. VITEK 2 Compact identifikasyon sonuçları

Sıra	Numune No	Koagulaz Sonucu	VITEK 2 Compact ile İzole Edilen <i>Staphylococcus</i> Türleri	VITEK 2 Compact Yüzdesi
1	7	KPS	<i>Staphylococcus aureus</i>	97,0%
2	21	KPS	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,0%
3	40	KPS	<i>Staphylococcus aureus</i>	98,0%
4	45	KPS	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,0%
5	75	KPS	<i>Staphylococcus aureus</i>	95,0%
6	83	KPS	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,0%
7	85	KPS	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,0%
8	14	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,0%
9	17	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,0%
10	18	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,0%
11	33	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,0%
12	60	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	93,0%
13	64	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,0%
14	66	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,0%
15	73	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,0%
16	76	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,0%
17	89	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,0%
18	98	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	93,0%
19	15	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,0%
20	19	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	95,0%
21	23	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	97,0%
22	42	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,0%
23	46	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,0%
24	55	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	98,0%

25	62	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	97,0%
26	87	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,0%
27	8	KNS	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	97,0%
28	44	KNS	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99,0%
29	92	KNS	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99,0%
30	96	KNS	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	98,0%
31	67	KNS	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	99,0%
32	77	KNS	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	97,0%
33	69	KNS	<i>Staphylococcus hyicus</i>	99,0%
34	81	KNS	<i>Staphylococcus hyicus</i>	99,0%

4.4. VITEK MS (MALDI-TOF MS) ile *Staphylococcus* İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Araştırmamızda VITEK 2 Compact cihazı *Staphylococcus* izolatları, VITEK MS (MALDI-TOF MS) cihazı ile de tanımlanmıştır. VITEK MS (MALDI-TOF MS) cihazı ile yapılan identifikasyon çalışmaları sonucunda, izolatların 7 (% 20,60)'si *Staphylococcus aureus*, 10 (% 29,40)'u *Staphylococcus simulans*, 8 (% 23,50)'i *Staphylococcus epidermidis*, 4 (% 11,80)'ü *Staphylococcus saprophyticus*, 2 (% 5,90)'si *Staphylococcus chromogenes*, 2 (% 5,90)'si *Staphylococcus hyicus* ve 1 (% 2,95) *Staphylococcus arlettae* olarak tiplendirilmiştir.

VITEK MS (MALDI-TOF MS) sonuçları incelendiğinde, 1 *Staphylococcus simulans* izolatının *Staphylococcus arlettae* olarak tanımlandığı görülmektedir (Tablo 13).

Tablo 13. VITEK MS (MALDI-TOF MS) identifikasyon sonuçları

Sıra	Numune No	Koagülaz Sonucu	VITEK MS (MALDI-TOF MS) ile İzole Edilen <i>Staphylococcus</i> Türleri	VITEK MS Yüzdesi
1	7	KPS	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,9%
2	21	KPS	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,9%
3	40	KPS	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,9%
4	45	KPS	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,9%
5	75	KPS	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,9%
6	83	KPS	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,9%
7	85	KPS	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,9%
8	14	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%
9	17	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%
10	18	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%
11	33	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%
12	60	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%
13	64	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%
14	66	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%
15	73	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%
16	76	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%
17	89	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%
18	98	KNS	<i>Staphylococcus arlettae</i>	99,9%
19	15	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,9%
20	19	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,9%
21	23	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,9%
22	42	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,9%
23	46	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,9%
24	55	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,9%
25	62	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,9%
26	87	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,9%
27	8	KNS	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99,9%
28	44	KNS	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99,9%
29	92	KNS	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99,9%
30	96	KNS	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99,9%
31	67	KNS	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	99,9%
32	77	KNS	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	99,9%
33	69	KNS	<i>Staphylococcus hyicus</i>	99,9%
34	81	KNS	<i>Staphylococcus hyicus</i>	99,9%

4.5. *Staphylococcus sp.* 16S rRNA ile Genotipik İdentifikasyon ve Sekans Bulguları

Araştırmamızda identifikasyonları yapılan 34 (% 34,0) *Staphylococcus* suşu 16S rRNA primerleri kullanılarak genotipik identifikasyonları gerçekleştirilmiş ve Sanger sekanslamaları yapılarak tiplendirilmişlerdir. Sekanslama sonucunda elde edilen sonuçlar incelendiğinde, 34 *Staphylococcus* izolatının VITEK MS (MALDI-TOF MS) sonuçlarına paralel olarak tiplendirildiği görülmektedir (Tablo 14).

Tablo 14. Sekans identifikasyon sonuçları

Sıra	Numune No	Koagülaz Sonucu	16S rRNA PCR ve Sekans ile İzole Edilen <i>Staphylococcus</i> Türleri	Sekans Yüzdesi
1	7	KPS	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,9%
2	21	KPS	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,9%
3	40	KPS	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,9%
4	45	KPS	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,9%
5	75	KPS	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,9%
6	83	KPS	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,9%
7	85	KPS	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,9%
8	14	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%
9	17	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%
10	18	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%
11	33	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%
12	60	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%
13	64	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%
14	66	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%
15	73	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%
16	76	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%
17	89	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%
18	98	KNS	<i>Staphylococcus arlettae</i>	99,9%
19	15	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,9%
20	19	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,9%
21	23	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,9%
22	42	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,9%
23	46	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,9%
24	55	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,9%
25	62	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,9%
26	87	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,9%
27	8	KNS	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99,9%
28	44	KNS	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99,9%
29	92	KNS	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99,9%
30	96	KNS	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99,9%

31	67	KNS	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	99,9%
32	77	KNS	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	99,9%
33	69	KNS	<i>Staphylococcus hyicus</i>	99,9%
34	81	KNS	<i>Staphylococcus hyicus</i>	99,9%

Araştırmamız sonucunda elde edilen tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, 81 ve 98 numaralı örnekler dışındaki tüm örneklerin konvansiyonel, API Staph, VITEK 2 Compact, VITEK MS (MALDI-TOF MS) ve Sekans sonuçları doğrultusunda aynı *Staphylococcus* türlerinin identifiye edildiği görülmektedir. 81 numaralı örnekte API Staph kiti ile *S. lugdunensis* izole edilirken diğer tüm metotlarda *S. hyicus* identifiye edilmiş ve bu izolat *S. hyicus* olarak değerlendirilmiştir. 98 numaralı örnekte ise konvansiyonel, API Staph, VITEK 2 Compact sonucunda *S. simulans* identifiye edilirken, VITEK MS (MALDI-TOF MS) ve Sekans sonuçları doğrultusunda *S. arlettae* identifiye edilmiştir. 98 numaralı örnekte *S. arlettae* identifikasyonu kabul edilmiştir (Tablo 15).

Tablo 15. Araştırma sonuçlarının değerlendirilmesi

Sıra	Nu mu ne No	Koagulaz Sonucu	Konvansiyonel Yöntemler ile İzole Edilen <i>Staphylococcus</i> Türleri	API Staph ile İzole Edilen <i>Staphylococcus</i> Türleri	API Staph Yüzdesi	VITEK 2 Compact ile İzole Edilen <i>Staphylococcus</i> Türleri	VITEK 2 Compa ct Yüzdesi	VITEK MS (MALDI-TOF MS) ile İzole Edilen <i>Staphylococcus</i> Türleri	VITEK MS (MAL DI- TOF MS) Yüzdesi	16S rRNA PCR ve Sekans ile İzole Edilen <i>Staphylococcus</i> Türleri	Sekans Yüzdesi
1	7	KPS	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	85,5%	<i>Staphylococcus aureus</i>	97,0%	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,9%	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,9%
2	21	KPS	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	77,5%	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,0%	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,9%	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,9%
3	40	KPS	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	69,3%	<i>Staphylococcus aureus</i>	98,0%	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,9%	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,9%
4	45	KPS	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	70,9%	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,0%	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,9%	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,9%
5	75	KPS	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	77,5%	<i>Staphylococcus aureus</i>	95,0%	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,9%	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,9%
6	83	KPS	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	97,1%	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,0%	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,9%	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,9%
7	85	KPS	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	71,6%	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,0%	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,9%	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,9%
8	14	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	<i>Staphylococcus simulans</i>	97,1%	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,0%	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%
9	17	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	<i>Staphylococcus simulans</i>	89,1%	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,0%	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%
10	18	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	<i>Staphylococcus simulans</i>	86,6%	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,0%	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%
11	33	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	<i>Staphylococcus simulans</i>	69,3%	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,0%	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%
12	60	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	<i>Staphylococcus simulans</i>	96,2%	<i>Staphylococcus simulans</i>	93,0%	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%
13	64	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	<i>Staphylococcus simulans</i>	69,3%	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,0%	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%
14	66	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	<i>Staphylococcus simulans</i>	97,1%	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,0%	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%
15	73	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	<i>Staphylococcus simulans</i>	86,6%	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,0%	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%

16	76	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	<i>Staphylococcus simulans</i>	77,5%	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,0%	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%
17	89	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	<i>Staphylococcus simulans</i>	70,9%	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,0%	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%	<i>Staphylococcus simulans</i>	99,9%
18	98	KNS	<i>Staphylococcus simulans</i>	<i>Staphylococcus simulans</i>	96,2%	<i>Staphylococcus simulans</i>	93,0%	<i>Staphylococcus arlettae</i>	99,9%	<i>Staphylococcus arlettae</i>	99,9%
19	15	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	87,3%	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,0%	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,9%	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,9%
20	19	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	77,5%	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	95,0%	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,9%	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,9%
21	23	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	58,5%	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	97,0%	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,9%	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,9%
22	42	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	71,6%	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,0%	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,9%	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,9%
23	46	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	60,6%	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,0%	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,9%	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,9%
24	55	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	88,1%	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	98,0%	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,9%	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,9%
25	62	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	85,5%	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	97,0%	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,9%	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,9%
26	87	KNS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	82,1%	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,0%	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,9%	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,9%
27	8	KNS	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	85,5%	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	97,0%	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99,9%	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99,9%
28	44	KNS	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	82,1%	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99,0%	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99,9%	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99,9%
29	92	KNS	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	60,6%	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99,0%	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99,9%	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99,9%
30	96	KNS	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	88,1%	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	98,0%	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99,9%	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99,9%
31	67	KNS	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	87,3%	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	99,0%	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	99,9%	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	99,9%
32	77	KNS	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	58,5%	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	97,0%	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	99,9%	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	99,9%
33	69	KNS	<i>Staphylococcus hyicus</i>	<i>Staphylococcus hyicus</i>	89,1%	<i>Staphylococcus hyicus</i>	99,0%	<i>Staphylococcus hyicus</i>	99,9%	<i>Staphylococcus hyicus</i>	99,9%
34	81	KNS	<i>Staphylococcus hyicus</i>	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	69,3%	<i>Staphylococcus hyicus</i>	99,0%	<i>Staphylococcus hyicus</i>	99,9%	<i>Staphylococcus hyicus</i>	99,9%

4.6. Antibiyogram Bulguları

Çalışmamızda tiplendirilmeleri yapılmış Staphylococcus suşlarına 418591 referans numaralı VITEK AST-P641 kartları ile VITEK 2 Compact cihazı ile antibiyogram yapılmıştır. Antibiyogram sonucunda izolatlardan elde edilen MIC düzeyindeki sonuçlar Tablo 16’de gösterilmektedir. İzolatların CLSI (2017) standartlarına göre değerlendirilen (Tablo 17) antibiyogram sonuçları Tablo 18’te belirtilmektedir.

Tablo 16. Staphylococcus izolatlarının MIC düzeyindeki sonuçları

Sıra No	Numune No	Staphylococcus İzolatları	P	OXFS	CIP	E	CM	LNZ	DAP	TEC	VA	TE	TGC	FOS	SXT
1	7	<i>S. aureus</i>	0,12	<=0,5	<=0,5	<=0,25	>=4	2	<=0,12	>=32	4	<=1	<=0,12	16	<=10
2	21		<=0,03	<=0,5	<=0,5	<=0,25	>=4	2	1	>=32	<=0,5	<=1	<=0,12	<=8	<=10
3	40		>=0,5	<=0,5	2	>=8	>=4	>=8	4	>=32	4	>=16	<=0,12	>=128	>=320
4	45		0,12	<=0,5	<=0,5	<=0,25	>=4	1	0,25	>=32	<=0,5	<=1	<=0,12	16	<=10
5	75		0,25	<=0,5	2	>=8	>=4	>=8	>=8	>=32	4	>=16	<=0,12	>=128	>=320
6	83		0,25	<=0,5	2	>=8	>=4	>=8	>=8	>=32	4	>=16	<=0,12	>=128	>=320
7	85		>=0,5	<=0,5	<=0,5	<=0,25	>=4	2	0,25	1	4	>=16	<=0,12	16	<=10
8	14	<i>S. simulans</i>	<=0,03	<=0,5	<=0,5	<=0,25	>=4	2	1	>=32	<=0,5	<=1	<=0,12	<=8	<=10
9	17		>=0,5	<=0,5	<=0,5	<=0,25	>=4	2	0,25	1	4	>=16	<=0,12	16	<=10
10	18		>=0,5	<=0,5	<=0,5	>=8	>=4	2	1	>=32	4	2	<=0,12	16	80
11	33		0,06	<=0,5	<=0,5	<=0,25	>=4	2	<=0,12	>=32	<=0,5	<=1	<=0,12	<=8	<=10
12	60		0,12	<=0,5	<=0,5	<=0,25	>=4	2	4	>=32	4	2	<=0,12	16	<=10
13	64		0,06	<=0,5	<=0,5	<=0,25	>=4	2	<=0,12	>=32	<=0,5	<=1	<=0,12	<=8	<=10
14	66		>=0,5	<=0,5	2	>=8	>=4	>=8	4	>=32	4	>=16	<=0,12	>=128	>=320
15	73		<=0,03	<=0,5	<=0,5	<=0,25	>=4	2	1	>=32	<=0,5	<=1	<=0,12	<=8	<=10
16	76		0,12	<=0,5	<=0,5	<=0,25	>=4	2	<=0,12	>=32	4	<=1	<=0,12	16	<=10
17	89		<=0,03	<=0,5	<=0,5	<=0,25	>=4	2	1	>=32	<=0,5	<=1	<=0,12	<=8	<=10
18	98	<i>S. arlettae</i>	0,06	<=0,5	<=0,5	<=0,25	>=4	2	<=0,12	>=32	<=0,5	<=1	<=0,12	<=8	<=10

19	15	<i>S. epidermidis</i>	0,25	<=0,5	2	>=8	>=4	>=8	>=8	>=32	4	>=16	<=0,12	>=128	>=320
20	19		<=0,03	<=0,5	<=0,5	<=0,25	>=4	2	1	>=32	<=0,5	<=1	<=0,12	<=8	<=10
21	23		0,12	<=0,5	<=0,5	<=0,25	>=4	1	<=0,12	<=0,5	1	<=1	<=0,12	16	<=10
22	42		>=0,5	<=0,5	4	<=0,25	>=4	2	4	>=32	4	2	<=0,12	32	<=10
23	46		0,06	<=0,5	<=0,5	<=0,25	>=4	2	<=0,12	>=32	<=0,5	>=16	<=0,12	<=8	<=10
24	55		0,12	<=0,5	<=0,5	1	>=4	2	4	1	1	2	<=0,12	16	<=10
25	62		0,12	<=0,5	<=0,5	<=0,25	>=4	1	<=0,12	<=0,5	1	<=1	<=0,12	16	<=10
26	87		>=0,5	<=0,5	<=0,5	>=8	>=4	2	1	>=32	4	2	<=0,12	16	80
27	8	<i>S. saprophyticus</i>	0,12	<=0,5	<=0,5	>=8	>=4	1	<=0,12	<=0,5	4	<=1	<=0,12	16	<=10
28	44		>=0,5	<=0,5	<=0,5	1	>=4	2	>=8	>=32	<=0,5	2	<=0,12	64	<=10
29	92		<=0,03	<=0,5	<=0,5	<=0,25	>=4	2	1	>=32	<=0,5	<=1	<=0,12	<=8	<=10
30	96		0,06	<=0,5	<=0,5	<=0,25	>=4	2	<=0,12	>=32	<=0,5	<=1	<=0,12	<=8	<=10
31	67	<i>S. chromogenes</i>	>=0,5	<=0,5	<=0,5	1	>=4	2	>=8	>=32	<=0,5	2	<=0,12	64	<=10
32	77		0,06	<=0,5	<=0,5	<=0,25	>=4	2	<=0,12	>=32	<=0,5	<=1	<=0,12	<=8	<=10
33	69	<i>S. hyicus</i>	0,12	<=0,5	<=0,5	<=0,25	>=4	1	0,25	>=32	<=0,5	<=1	<=0,12	16	<=10
34	81		>=0,5	<=0,5	2	>=8	>=4	>=8	4	>=32	4	>=16	<=0,12	>=128	>=320

Tablo 17. CLSI standart MIC değerleri (CLSI, 2017)

Antibiyotikler	S	I	R
Penisilin	≤ 0.12		≥ 0.25
Cefoxitin (OXSF)	≤ 4		≥ 8
Siprofloksasin (CIP)	≤ 1	2	≥ 4
Eritromisin (E)	≤ 0.5	1-4	≥ 8
Klindamisin (CM)	≤ 0.5	1-2	≥ 4
Linezolid (LNZ)	≤ 4		≥ 8
Daptomycin (DAP)	≤ 1		
Teicoplanin (TEC)	≤ 8	16	≥ 32
Vankomisin (VA) (<i>S. aureus</i>)	≤ 2	4-8	≥ 16
Vankomisin (VA) (KNS)	≤ 4	8-16	≥ 32
Tetrasiklin (TE)	≤ 4	8	≥ 16
Tigesiklin (TGC)	≤ 0.5		
Fosfomisin (FOS)	≤ 64	128	≥ 256
Trimetoprim/Sulfametoksazol (SXT)	$\leq 2/38$		$\geq 4/76$

Tablo 18. Araştırmamızda izole edilen Stafilokok suşlarının antibiyogram sonuçlarının değerlendirilmesi

Sıra No	Numune No	Stafilokok İzolatları	P	OXFS	CIP	E	CM	LNZ	DAP	TEC	VA	TE	TGC	FOS	SXT
1	7	<i>S. aureus</i>	S	S	S	S	R	S	S	R	I	S	S	S	S
2	21		S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S
3	40		R	S	I	R	R	R	R	R	I	R	S	I	R
4	45		S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S
5	75		R	S	I	R	R	R	R	R	I	R	S	I	R
6	83		R	S	I	R	R	R	R	R	I	R	S	I	R
7	85		R	S	S	S	R	S	S	S	I	R	S	S	S
8	14	<i>S. simulans</i>	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S
9	17		R	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S
10	18		R	S	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S	R
11	33		S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S
12	60		S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S
13	64		S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S
14	66		S	S	I	R	R	R	R	R	S	R	S	I	R
15	73		S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S
16	76		S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S
17	89		S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S
18	98	<i>S. arlettae</i>	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S

19	15	<i>S. epidermidis</i>	R	S	I	R	R	R	R	R	S	R	S	I	R	
20	19		S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
21	23		S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
22	42		R	S	R	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S
23	46		S	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S	S	S	S
24	55		S	S	S	I	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S
25	62		S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
26	87		R	S	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R
27	8	<i>S. saprophyticus</i>	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	
28	44		R	S	S	I	R	S	R	R	S	S	S	S	S	
29	92		S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	
30	96		S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	
31	67	<i>S. chromogenes</i>	R	S	S	I	R	S	R	R	S	S	S	S	S	
32	77		S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	
33	69	<i>S. hyicus</i>	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	
34	81		R	S	I	R	R	R	R	R	S	R	S	I	R	

Araştırmamızda identifiye edilen 34 *Staphylococcus* sp. izolatının Cefoxitin, Siprofloksasin, Vankomisin, Tigesiklin ve Fosfomisine % 100 ve Linezolide % 85,2 oranlarında duyarlı; Klindamisine %100 ve Tetrasikline %82,4 oranlarında dirençli olduğu görülmektedir.

Koagulaz pozitif *Staphylococcus* izolatlarının (*S. aureus* izolatları), Cefoxitin, Vankomisin, Tigesiklin ve Fosfomisine % 100 ve Klindamisine %100 ve Tetrasikline % 85,8 oranlarında dirençli olduğu tespit edilmiştir.

Koagulaz negatif *Staphylococcus* izolatlarının Cefoxitin, Vankomisin, Tigesiklin ve Fosfomisine % 100, Siprofloksasine % 92,5, Linezolide % 88,8, Tetrasiklin ve Trimetoprim/Sulfametoksazole % 81,5 oranlarında duyarlı ve Klindamisine % 100 oranında dirençli olduğu belirlenmiştir. *S. simulans* izolatlarının Klindamisine % 100, Teicoplanine % 90 oranlarında dirençli ve araştırmamızda kullanılan diğer 11 antibiyotiğe ise % 80-100 oranlarında duyarlı olduğu tespit edilmiştir. *S. arlettae* izolatında Klindamisine ve Teicoplanine % 100 oranında dirençli diğer antibiyotiklere duyarlı olduğu görülmektedir. *S. epidermidis* izolatlarının Klindamisine % 100 oranında dirençli ve araştırmamızda kullanılan diğer 12 antibiyotiğe ise % 75-100 oranlarında duyarlı olduğu tespit edilmiştir. *S. saprophyticus* izolatlarının da Klindamisine % 100 oranında dirençli ve araştırmamızda kullanılan diğer 8 antibiyotiğe ise % 100 oranında duyarlı olduğu görülmektedir. *S. chromogenes* ve *S. hyicus* (n=2) izolatlarının da Klindamisine ve Teicoplanine % 100 oranında dirençli olduğu saptanmıştır (Tablo 19).

Tablo 19. Araştırmamızda izole edilen Stafilokok suşlarının antibiyogram sonuçlarının yüzde değerleri

İZOLATLAR	ANTİBİYOTİKLER												
	P	OXFS	CIP	E	CM	LNZ	DAP	TEC	VA	TE	TGC	FOS	SXT
<i>Staphylococcus</i> sp. (n=34)	%64.7 S	%100 S	%97 S	%73.5S		%85.2 S	%67.6 S	%17.6 S	%100 S	%73.5 S	%100 S	%100 S	%76.4 S
	%35.3 R		%3R	%26.5R	%100 R	%14.8 R	%32.4	%82.4 R		%26.5 R			%23.6 R
KPS (<i>S. aureus</i>) (n=7)	%42.8 S	%100 S	%57.2S	%57.2S		%57.2S	%57.2S	%14.2 S	%100 S	%42.8 S	%100 S	%100 S	%57.2S
	%57.2 R		%42.8R	%42.8R	%100 R	%42.8R	%42.8R	%85.8R		%57.2 R			%42.8R
KNS (n=27)	%70.4 S	%100 S	%92.5 S	%77.7 S		%88.8 S	%70.4 S	%18.5 S	%100 S	%81.5 S	%100 S	%100 S	%81.5 S
	%29.6 R		%7.5 R	%22.3R	%100 R	%11.2 R	%29.6 R	%81.5 R		%18.5 R			%18.5 R
<i>S. simulans</i> (n=10)	%80.0 S	%100 S	%100 S	%80.0 S		%90.0 S	%80.0 S	%10 S	%100 S	%80.0 S	%100 S	%90.0 S	%80.0 S
	%20.0 R			%20.0 R	%100 R	%10 R	%20.0 R	%90 R		%20.0 R		%10 R	%20.0 R
<i>S. arlettae</i> (n=1)	%100 S	%100 S	%100 S	%100 S		%100 S	%100 S		%100 S	%100 S	%100 S	%100 S	%100 S
					%100 R			%100 R					
<i>S. epidermidis</i> (n=8)	%62.5 S	%100 S	%87.5 S	%75.0 S		%87.5 S	%62.5 S	%37.5 S	%100 S	%75.0 S	%100 S	%87.5 S	%75.0 S
	%37.5 R		%12.5 R	%25.0 R	%100 R	%12.5 R	%37.5 R	%62.5		%25.0 R		%12.5 R	%25.0 R
<i>S. saprophyticus</i> (n=4)	%75.0 S	%100 S	%100 S	%75 S		%100 S	%75 S	%25.0 S	%100 S	%100 S	%100 S	%100 S	%100 S
	%25.0 R			%25 R	%100 R		%25 R	%75.0 R					
<i>S. chromogenes</i> (n=2)	%50.0 S	%100 S	%100 S	%50.0 S		%100 S	%50.0 S		%100 S	%100 S	%100 S	%100 S	%100 S
	%50.0 R			%50.0 R	%100 R		%50.0 R	%100 R					
<i>S. hyicus</i> (n=2)	%50.0 S	%100 S	%50.0 S	%50.0 S		%50.0 S	%50.0 S		%100 S	%50.0 S	%100 S	%50.0 S	%50.0 S
	%50.0 R		%50.0 R	%50.0 R	%100 R	%50.0 R	%50.0 R	%100 R		%50.0 R		%50.0 R	%50.0 R

5. TARTIŞMA

Bakteriyel nedenler başta olmak üzere çeşitli nedenlere bağlı olarak şekillenen meme dokusu yangısı mastitis olarak tanımlanır. Mastitis enfeksiyonuna bağlı olarak süt veriminde azalma ve buna bağlı oluşan çeşitli sonuçlara bağlı olarak bu enfeksiyon süt yönlü yetiştiricilik yapan bir işletme için oldukça önemli ekonomik kayıplar şekillendirir. Streptokoklar mastitise neden olan önemli bakteriyel patojenlerdir. Bu patojen etkenlerin kendi aralarında çevresel ve bulaşıcı olarak sınıflandırılmaları, mastitis probleminin çözümünde etkene spesifik yönetim prosedürü ve tedavi uygulamalarının başarısını artırır. Bu nedenle streptokokal mastitislerin identifikasyon prosedüründe izlenecek işlemler oldukça önemlidir. Bu çalışmada, mastitisli sütlerden *Staphylococcus* sp. izolasyonu ve mastitis etiyolojisindeki rolleri klasik kültür yöntemi, API Staph ID32, VITEK, MALDITOF-MS 16S rRNA ve Sekans yöntemleri ile belirlenerek, izole edilen suşların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Mastitis, hazırlayıcı birçok etkenin yanısıra bakteriler, mantarlar, algler ve virüsler gibi birçok mikroorganizmalar tarafından oluşturulmaktadır fakat çoğunlukla bakteri kaynaklıdır (Akay ve ark, 1993). Polimikrobiyal etiyolojiye 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).

S. 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 (Pettersson-Wolfe, 2010; Paterson, 2013).

En önemli *S. aureus* rezervlerinden biri meme yapıları olsa da sığırın meme dışı bölgelerinde de bakteriye rastlanmıştır. Bu nedenlerle geçmişten günümüze kadar

mastitisin tedavisi, ortadan kaldırılması ve koruma-kontrolü ile ilgili birçok 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 suşlarının 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).

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).

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 birçok 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).

Türkiye’de mastitislerin yaygınlığını ve mastitislere neden olan mikroorganizmaların belirlenmesine yönelik yapılan fenotipik ve genotipik çalışmalarda farklı Stafilokok izolasyon oranları bulunmuştur. Türütoğlu ve ark. (1995), Marmara bölgesinde % 28,1 *S. aureus* ve % 23,1 *S. epidermidis*, Kuyucuoğlu ve Uçar (2001) Afyon bölgesinde % 40,1 *S. aureus*, Ergün ve ark. (2004), % 42,4 KNS ve % 25,1 *S. aureus*, Gürtürk ve ark. (1998) Van ve yöresinde % 41 oranında Stafilokok türü izole etmişlerdir.

Yıldız (2003), sığır mastitislerinde 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 stafilocok türlerinin diğerlerine göre daha düşük kaldığını gözlemlemiştir.

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 propların hibridizasyon sırasında rRNA genleri ile kolayca birleşmesi ve bunların otoradyografi veya diğer tekniklerle ortaya konduğu bir tekniktir. Bu sebeple rRNA dizilişleri için spesifik proplar benzer rRNA dizilişine sahip çeşitli bakterileri tayin edebilir. *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesilen kromozomal DNA fragmentleri boyutlarına göre ayrılıp, işaretli rRNA propları ile hibridize olmaktadır. Bilgisayar ortamında *S. aureus* bakterisine ait kayıtlı referans marker fragmenti ile izolattan elde edilen fragment karşılaştırılarak izolatanın ribotipi belirlenebilmektedir (Çakır, 2007; Gülbandılar, 2006).

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 *SmaI* restriksiyon enzimi ile PFGE ve *EcoRI* restriksiyon enzimi ile otomatik ribotiplendirme yöntemlerini kullanmıştır. PFGE ve ribotiplendirme ile genotiplendirme çalışmalarında sırasıyla 9 pulstip 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 bulunurken, antibiyotik duyarlılık sonuçlarında izolatların %30,64'ü oksasiline dirençli bulunduğunu belirtmiştir. İzolatların PFGE analiz sonucunda 35 pulstip ve ribotiplendirmede 7 ribogrup tespit ederek bu analiz yöntemlerinin özellikle

strainerin 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 16S rRNA identifikasyon çalışmaları Sanger Sekanslama yöntemi ile desteklenmiştir.

Yurtdışında yapılan çalışmalarda Tenhagen ve ark. (2006), Almanya'da % 9,1 KNS ve % 5,7 *S. aureus*, Giannechini ve ark. (2002) Uruguay'da % 62,8 *S. aureus* ve % 7,4 KNS, Pitkälä ve ark. (2004), Finlandiya'da % 49,6 KNS ve % 10,2 *S. aureus*, Workineh ve ark. (2002), Etiyopya'da % 40,5 *S. aureus* ve % 16,5 KNS izole etmişlerdir.

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.

Morandi ve ark. (2009), yaptıkları çalışmada 122 farklı çiğ süt örneğinden ve 8 farklı insan örneğinden toplamda 130 *S. aureus* suşunu 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* suşları 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.

Ote ve ark. (2011), Belçika’da klinik ve subklinik mastitis hastası sığırların sütlerinden izole ettikleri *S. aureus* suşlarının genetik profillerini belirlemek amaçlı çalışma yapmışlardır. Spesifik polimeraz zincir reaksiyonu 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 çeşitliliğinin sığırlarda mastitise neden olabileceğini belirtmişlerdir. Diğer yapılan çalışmalarla doğru orantılı olarak, 40 genden bazılarının mastitis nedenli *S. aureus* izolatları ile ilgili olduğunu ama diğerlerinin ilgili bulunmamış ya da nadiren bulunmuş olduğunu göstermişlerdir.

Lüthje ve Schwarz (2006), sığır mastitisi ile ilişkili patojenlerin kontrolü için koagülaz negatif stafilokokları (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 tanımlamışlardır. 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 tanımlamışlardır.

Pankaj ve ark. (2013,) 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. 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.

Koagülaz pozitif Stafilokok türlerinin fenotipik olarak farklılaşması, spesifik biyokimyasal belirteçlerin bulunmaması nedeniyle tanımlama açısından zor bir durum ortaya koymaktadır. Bu sorunun üstesinden gelmek için, moleküler araçların kullanımı veteriner mikrobiyolojisi alanında rutin hale gelmiştir. Bununla birlikte, fenotipik analizler nispeten zaman alıcıdır ve en önemlisi analiz edilmesi güç sonuçlar meydana getirebilmektedir (Sasaki ve ark, 2010). Bu çalışmada konvansiyonel ve ticari biyokimyasal tanımlama yöntemleri ile izole edilen *S. aureus* türlerinin tanımlamaları, VITEK 2, VITEK (MALDI-TOF) MS, PCR ve Sekans proteomik analizleri ile doğrulanmıştır. Otomatize sistemlerin *S. aureus* türlerini ayırt etmek için etkili bir araç olduğu kanıtlanmıştır.

Stafilokoklar, sığırlarda mastitise yol açma potansiyeline sahip geniş tür çeşitliliğine sahip olduklarından dolayı teşhisleri zorlaşmaktadır (Thorberg ve ark, 2009). Stafilokok türleri tanımlama, bu mikroorganizma grubundaki türlerin güvenilir şekilde ayırt edilebilmesi için basit ve hızlı bir tanı yönteminin olmaması ile de sınırlanmaktadır (Ruegg, 2012). Bu çalışmada, VITEK 2, VITEK (MALDI-TOF) MS, PCR ve Sekanslama ile sığır mastitis örneklerinden Stafilokokların tür tanımlamasının sonuçları izolatların tamamının % 94'ü için tanımlama sağlanmıştır. Bir adet izolat API Staph kiti ile *S. lugdunensis* olarak tanımlanırken, diğer tüm metotlarda *S. hyicus* tanımlanmış ve bu izolat *S. hyicus* olarak değerlendirilmiştir. Diğer bir örnekte ise konvansiyonel, API Staph, VITEK 2 Compact sonucunda *S. simulans* tanımlanırken, VITEK MS (MALDI-TOF MS) ve Sekans sonuçları doğrultusunda *S. arlettae* tanımlanmıştır. Çalışmamızın sonuçları, VITEK 2, MALDI-TOF MS gibi otomatize sistemlerin mikroorganizma tanısı için hızlı ve doğru spesifik tanımlama yöntemi olabileceğini göstermektedir. Hızlı teşhis, sürü yönetimi veya mastitin antimikrobiyal tedavisi ile ilgili daha doğru kararlar alınmasını sağlar, böylece potansiyel olarak bulaşıcı Stafilokok türlerinin neden olduğu meme içi enfeksiyonların zararlı etkileri önlenmiş olur (Piessens ve ark, 2011).

Sığır mastitis vakalarından KNS türlerinin ID 32 Staph, VITEK 2, MALDI-TOF MS, 16S rRNA gen dizilimi ve *tuf* gen sekansı olmak üzere 5 adet farklı yöntemin karşılaştırıldığı bir çalışmada (Tomazi ve ark 2014) MALDI-TOF MS için % 99,3 ID 32 Staph

strip için % 85,9, VITEK 2 için % 92,3, 16S rRNA gen dizilimi için % 70,4 ve gen sekanslama yöntemi için % 93 oranlarında doğruluk tespit edilmiştir. Çalışmamızda gözlenen MALDI-TOF MS tarafından sağlanan KNS türlerinin tanımlama oranı, Tomazi ve ark. (2014) tarafından değerlendirilen genotipik yöntemler için belirlenen identifikasyon oranından daha fazladır, ki bu MALDI-TOF MS'in sığır mastitislerine neden olan KNS türlerinin ayrımı için güvenilir bir alternatif yöntem olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmanın sonuçları, otomatize sistemlerin sığır mastitisine neden olan Stafilocok türlerini belirlemek için güvenilir ve hızlı bir yöntem olabileceğini düşündürmektedir. Stafilocok türleri, özellikle potansiyel olarak mastitise neden olan suşların çeşitliliği nedeniyle, koagulaz negatif türlerin ayrımının zorluğunu göz önünde bulundurarak otomatize yöntemlerin, mastitise neden olan *Koagulaz Negatif Stafilocokların* ayrımında güvenilir ve hızlı bir yöntem olduğu ortaya konulmuştur.

Ateş ve arkadaşlarının (1991), Konya bölgesinde yaptıkları çalışmada mastitisli sütlerden izole edile *S. aureus* türlerinin Penisilin'e % 28,1, Tetrasiklin'e % 50,2, Kanamisin'e % 37,2, Eritromisin'e % 68,1, Ampisilin'e % 37,8, Streptomisin'e % 32,4, Sefalosporinlere % 72,4 oranında duyarlı buldukları bildirilmiştir.

Kuyucuoğlu ve Uçar (2001), Afyon bölgesinde bulunan değişik laktasyon dönemlerindeki 272 inekten, 126 inekte CMT pozitif tespit etmişler, CMT pozitif olan 126 inekten 164 adet süt örneği alarak mikrobiyolojik olarak incelemişler, örneklerden 62'sinde *S. aureus*, 22'sinde *S. epidermidis* izole ve identifiye etmişlerdir. İzole edilen *S. aureus* suşlarının % 62'sinin Amoksisilin-klavulonik asite, % 82,22'sinin Ampisillin-sulbaktama, % 70,9'unun Enrofloksasine, % 59,6'sının Danofloksasine, % 74,1'inin Sefaperazona, % 77,4'ünün Streptomisine, % 25'inin Penisilin-G ye, % 22,5'inin Tetrasikline, % 27,4'ünün Eritromisine, % 54,8'inin Nistatine duyarlı olduklarını bildirmişlerdir. Kırsan ve ark. (1999), yaptıkları çalışmada araştırma bölgelerindeki özel çiftliklerde 33 adet Holstein ırkı inekten CMT pozitif olan 54 meme lobunun subklinik mastitis olduğunu, bakteriyolojik olarak muayene edilen 54 süt örneğinden 17 (% 26,56)'sinde *S. aureus* izole edildiğini ve izole edilen *S. aureus* suşlarının hepsinin Ampisillin-sulbaktam kombinasyonuna duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Ak (2000), Trakya bölgesinde yaptığı bir çalışmada tüm *S. aureus* suşlarının Penisiline dirençli olduklarını saptamış, ayrıca Enrofloksasine % 85,7 duyarlılık belirlemiştir. Akan ve ark (2001), yaptıkları bir çalışmada 82 stafilocok suşunun % 59,75'inin penisilin G ye, % 29,2'sinin amoksisiline, % 3,65'inin Amoksisilin-klavulonik asite, % 8,53'ünün Kloksasiline, % 56,09'unun Ampisilline, % 13,4'ünün Ampisillin-sulbaktama dirençli

olduğunu bulmuşlardır. Kuyucuoğlu ve Uçar (2001), mastitisli ineklerden elde ettikleri 76 stafilokok suşunun antibiyotik duyarlılıklarının incelenmesi sonucu, stafilokok suşlarının 34 (% 44,74)'ünü Amoksisiline, 4 (% 5,27)'ünü Ampisillin-sulbaktama, 48 (% 63,16)'ini Ampisiline, 56 (% 73,69)'sını Penisiline, 12 (% 15,79)'sini Kloksasiline ve 21 (% 27,64)'ini Sefaperazona dirençli bulmuşlardır. Uçan ve Arslan (2002), Konya bölgesinde mastitisli inek sütlerinden izole edilen 81 koagulaz pozitif stafilokok suşunun 75 (% 92,6)'ini *S. aureus*, 6 (% 7,4)'sını *S. intemedius* olarak tanımlamışlar, tüm suşlar dikkate alındığında en duyarlı olan antibiyotiğin Danofloksasin (% 100) olduğunu ve duyarlılıklarına göre Ampisillin-sulbaktam ile Metisilin (% 98,8), Oksasilin ve Amoksisilinklavulonik asit (% 97,5), Kloksasilin (% 96,3), Amoksisilin (% 22,2) ve Penisilin-G (% 14,8) olduğunu belirlemişlerdir. Younis ve ark. (2000), mastitisli sütlerden izole edilen Stafilokokların antibiyotik duyarlılığı ile ilgili olarak yaptıkları bir çalışmada, izole ettikleri 400 *S. aureus* suşunda, Tetrasikline (% 52) ve Penisiline yüksek oranda direnç (% 96,6) saptamışlardır. Türkiye'de yapılan çalışmalarda izole edilen stafilokok suşlarının antibiyotik dirençliliklerinde; sağımda temel hijyen kurallarına yeterince uyulmamasının, periyodik olarak indirekt yöntemlerle mastitis taramalarının yapılmamasının, özellikle inatçı olgularda mikrobiyolojik olarak etken izolasyonu yapılmadan antibiyotik sağaltımına gidilmesinin etkili olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (Ak, 2000; Kuyucuoğlu ve Uçar, 2001).

Stafilokok enfeksiyonlarının tedavisi amacıyla uzun yıllardan beri β -laktam grubu antibiyotikler kullanılmıştır. β -laktam grubu antibiyotiklerin bilinçsizce kullanımı bu antibiyotiklere karşı direnç gelişimini de beraberinde getirmiştir. Literatür verileri incelendiğinde; Türkiye'nin değişik bölgelerinde yapılan araştırmalarda mastitisli sütlerden izole edilen Stafilokoklarda penisiline dirençliliğinin % 59-88, amoksisiline % 29-78 arasında olduğu görülmektedir (Şahin ve ark, 1997; Akan ve ark, 2001; Kuyucuoğlu ve Uçar, 2001). Araştırmamızda ise, mastitisli sütlerden izole edilen stafilokoklar için β -laktam grubu antibiyotiklerle yapılan duyarlılık deneylerinde; Penisiline % 35,3 oranında dirençli olduğu, Sefoksitine ise % 100 oranında duyarlı, diğer antibiyotik grupları ile yapılan deneylerde suşlarının Vankomisin, Tigesiklin ve Fosfomisine % 100 duyarlı olduğu bulunmuştur. Klindamisine karşı saptanan % 100 direnç ile araştırmamızda izole edilen Stafilokokların Linkozamid grubu antibiyotiklere karşı dirençli olduğu belirlenmiştir. Vankomisine duyarlılık oranının bu kadar yüksek olmasında veteriner sahada Vankomisin içeren preparatların yaygın kullanılmaması nedeniyle direnç oluşmamış olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmada, glikopeptid grubu antibiyotiklerden Vankomisine yüksek oranda duyarlılık bulunmuştur. Bu sonuçlar Türkiye’de yapılan çalışmalarda elde edilen bulgularla duyarlılık oranlarının uyumlu olduğunu göstermektedir (Kırsan, 1994; Ak, 2000; Kuyucuoğlu ve Uçar, 2001). Türkiye’de yapılan çalışmalarda, mastitisli inek sütlerinden izole edilen stafilokok suşlarının β -laktamaz aktiviteleri araştırılmış, incelenen suşların % 30-63 arasında değişen oranlarda bu aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir (Akan ve ark, 2001; Uçan ve Arslan, 2002). Araştırmamızda, mastitisli hayvanların süt numunelerinden elde edilen ve bölgesel saha suşu olarak değerlendirilebilecek olan Stafilokok etkenlerinin Vankomisine ilave olarak Tigesiklin ve Fosfomisine de duyarlı oldukları ortaya konulmuştur.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Mastitis mikroorganizmaların sebep olduğu önemli bir meme bezi hastalığıdır. Mastitise bağlı olarak her yıl büyük ekonomik kayıplar meydana gelmektedir. Hastalık tarafından ortaya çıkan ekonomik kayıplar sadece süt veriminde azalma ile sınırlı olmayıp, hastalığın tedavisi, sürüden hastalıklı hayvanların çıkarılması gibi harcamaları da kapsamaktadır. Ayrıca önemli bir gıda kaynağı olan sütün kalitesindeki bozulma halk sağlığı açısından da olumsuz sonuçlara sebep olmaktadır.

Araştırmamızda, toplam 100 adet hayvana ait mastitisli süt örneklerinden Stafilocok türlerinin identifikasyonları biyokimyasal yöntemlere ilave olarak VITEK 2, VITEK (MALDI-TOF) MS, PCR ve Sekanslama ile yapılmıştır. Süt örneklerinin % 34'ünden Stafilocok izolasyonu yapılmıştır. Yapılan identifikasyon çalışmaları sonucunda, izolatların 7 (% 20,60)'si *Staphylococcus aureus*, 10 (% 29,40)'u *Staphylococcus simulans*, 8 (% 23,50)'i *Staphylococcus epidermidis*, 4 (% 11,80)'ü *Staphylococcus saprophyticus*, 2 (% 5,90)'si *Staphylococcus chromogenes*, 2 (% 5,90)'si *Staphylococcus hyicus* ve 1 (% 2,95) *Staphylococcus arlettae* olarak tiplendirilmiştir.

Çalışmamızda identifikasyon için kullandığımız standart biyokimyasal prosedürlere ilave olarak diğer otomatize sistemlerin kullanılması, identifikasyonların genotipik olarak sekans yöntemi ile doğrulanması sonucunda ülkemizde mastitis çalışmalarında izole edilen etkenler ile karşılaştırıldığında benzer sonuçlar verdiği görülmüştür. Dolayısıyla MALDI-TOF MS gibi proteomik yöntemlerin güvenilirliği doğrulanmış ve uygulanabilir olduğu ortaya koyulmuştur.

Araştırmamız sayesinde süt üretimi için oldukça önem taşıyan klinik tipteki mastitis olgularındaki patojenlerin hızlı ve güvenilir metotlarla izolasyonu ve identifikasyonu, hastalığın ülkemiz geneli ve Aydın ili çevresi için gelecek çalışmalara ışık tutulacaktır. İleride yapılması planlanan çalışmalar ülkemiz için hastalığın teşhis ve tedavi politikalarının belirlenmesinde etkili olabilecektir. Antibiyotik tedavisinin uygulanacağı durumlarda hem *S. aureus* ve hem de diğer *Koagulaz Negatif Stafilocok* türlerinin var olduğu sürülerde çalışmamızda da saptanan farklı antibiyotik duyarlılıklarının olabileceği göz önüne alınmalıdır.

KAYNAKLAR

- Achenbach LA, Carey J, Madigan M.** Photosynthetic and Phylogenetic Primers for Detection of Anoxygenic Phototrops in Natural Environments. *Applied and Environmental Microbiology* 2001, 67(7), 2922-2926.
- Ak S.** Trakya Yöresinde Sığır Mastitisinden Sorumlu Bulaşıcı ve Çevresel Bakteriye Etkenler ve Antibiyotiklere Duyarlılıkları. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2000, 26(2), 353-365.
- Akan M, Kökçü L, Öncel T, Ekem S.** Mastitislerden izole Edilen Stafilokok Suşlarının Beta Laktamaz Aktivitesi ve Bazı Antibiyotiklere Duyarlılıkları. *Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Dergisi* 2001, 2, 31-34.
- Akay Ö, İzgür, M, Esendal Ö, Çetin C.** İnek Sütlerinden İzole Edilen Streptokok Suşlarının Serogruplandırılması. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 1993, 17, 89-95.
- Andrew EC, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM.** Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* 2013, 26(3), 547–603.
- Arciola RC, Campoccia D, Montanaro L.** Detection of Biofilm-Forming Strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus*. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 2002, 2, 478–84.
- Atasever S, Erdem H.** Süt Sığırlarında Mastitis ile Sütün Elektriksel İletkenliği Arasındaki İlişkiler. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 2008, 23(2), 131-136.
- Ateş M, Erganiş O, Çorlu M, Serpek B.** Konya Yöresindeki Mastitisli İneklerden Elde Edilen Süt Örneklerinin Mikrobiyel Florası ve LDH Aktivitesi. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 1991, 16, 19–29.
- Awale MM, Dudhatra GB, Avinash K, Chauhan BN, Kamani DR, Modi CM, Patel HB, O’Kennedy R.** Bovine Mastitis: A Threat to Economy. *Open Access Scientific Reports* 2012, 1, 295.
- Aydın N, İzgür M, Diker KS, Yardımcı H, Esendal Ö, Paracıkoğlu J, Akan M.** Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). İlke-Emek Yayınları, Ankara, 2006, 5-13.
- Aydınlı A, Durmaz G, Akgün Y.** Koagülaz Negatif Stafilokoklarda Slaym Faktör Yapımının Kongo Kırmızılı Agar Yöntemi İle Araştırılması. *Flora* 1997, 1, 41–44.

- Baştan A.** Mastitisten Korunmada Temel İlkeler. İneklerde Meme Hastalıkları. Hatipoğlu Basım ve Yayım Tic.Ltd.Şti, Ankara, 2009, 84-105.
- Bilgehan H.** Gram Olumlu Koklar. Klinik Mikrobiyoloji, Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. Fakülteler Kitabevi, İzmir, 2000, 239–268.
- Brakstad OG, Maeland JA, Chesneau O.** Comparison of Tests Designed to Identify *Staphylococcus aureus* Thermostable Nuclease. *APMIS* 1995, 103(3), 219-24.
- Brooks GF, Butel JS, Ornston LN, Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA.** Medical Microbiology. Appleton & Lange Norwalk, Connecticut, 1997, 186-192.
- Brown FJ.** Guidelines for the Laboratory Diagnosis and Susceptibility Testing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2005. 56, 1000-1018.
- Cervinkova D, Vlkova H, Borodacova I, Makovcova J, Babak V, Lorencova A, Vrtkova I, Marosevi D, Jaglic Z.** Prevalence of Mastitis Pathogens in Milk From Clinically Healthy Cows. *Veterinarni Medicina* 2013, 58, 567-575.
- Christensen GD, Baldassari L, Simpson WA.** Colonization of Medical Devices by *Coagulase-Negative Staphylococci*. Infections associated with indwelling Medical devices. ASM Pres, Washington DC, 1994, 45–78.
- CLSI National Committee for Clinical Laboratory Standards (M11).** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Vol. 27th Informational Supplement, Pennsylvania Wayne, 2017.
- Çakır P.** Gıda ve İnsan Kaynaklı *Staphylococcus aureus* Strainlerinin Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2007.
- Delialioğlu N, Gedikoğlu S.** Koagülaz Negatif Stafilokoklarda Slaym Yapımı ve Klinik Uyum Arasındaki İlişki. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* 2001, 31, 136–42.
- Dendani Z, Arcangioli MA, Bezille P, Ouzrout R, Sellami NL.** Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). *Journal of Animal and Veterinary Advances* 2010, 9(1), 5-11.
- Dijkshoorn L, Ursing BM, Ursing JB.** Strain, Clone and Species: Comments on Three Basic Concepts of Bacteriology. *Journal of Medical Microbiology* 2000, 49, 397-401.
- Eigner U, Holfelder M, Oberdorfer K, Betz-Wild U, Bertsch D, Fahr AM.** Performance of a Matrix- Assisted Laser Desorption Ionizationtime- of-Flight Mass Spectrometry System for the Identification of Bacterial Isolates in the Clinical Routine Laboratory. *Clinical Laboratory* 2009, 55, 289–96.

- Ergün Y, Aslantaş Ö, Cantekin Z, Doğruer G.** Hatay İlindeki Aile Tipi Süt Sığırcılığı İşletmelerinde Subklinik Mastitislerin Epidemiyolojisi. *Veteriner Bilimleri Dergisi* 2004, 20, 25-28.
- Feßler AT, Billerbeck C, Kadlec K, Schwarz S.** Identification and Characterization of Methicillin Resistent *Coagulase Negative Staphylococci* From Bovine Mastitis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2010, 65, 1576-1582.
- Frey Y, Rodriguez JP, Thomann A, Schwendener S, Perreten V.** Genetic Characterization of Antimicrobial Resistance *Coagulase Negative Staphylococci* From Bovine Mastitis. *Journal of Dairy Science* 2013, 96, 2247-2257.
- Giannechini R, Concha C, Rivero R, Delucci I, Moreno López J.** Occurrence of Clinical and Subclinical Mastitis in Dairy Herds in The West Littoral Region in Uruguay. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2002, 43, 221-230.
- Grisold AJ, Leitner E, Mühlbauer G, Kessler HH.** Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Simultaneous Confirmation by Automated Nucleic Acid Extraction and Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2002, 40(7), 2392-7.
- Guendouzi SE, Haouat AC, David S, Haggoud A, Ibsouda S, Iraqui M.** Isolation and Identification of a *Staphylococcus warneri* Strain with Anti-Mycobacterial Activity. *African Journal of Biotechnology* 2013, 12(42), 6119-6125.
- Gülbandılar A.** Kütahya Yöresinde Çeşitli Kaynaklardan Elde Edilen *Staphylococcus aureus* İzolatlarının Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2006.
- Gürtürk K, Boynukara B, Ekin İE, Gülhan T.** Van ve Yöresindeki İneklerde Subklinik Mastitisin Etiyolojisi Üzerine Bir Çalışma. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 1998, 9, 1-4.
- Holland RD, Wilkes JG, Raffi F.** Rapid Identification of Intact Whole Bacteria Based on Spectral Patterns Using Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization with Time-Of-Flight Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 1996, 10, 1227-32.
- Huber H, Ziegler D, Pflüger V, Vogel G, Zweifel C, Stephan R.** Prevalence and Characteristics of Methicillin-Resistant *Coagulase-Negative Staphylococci* From Livestock, Chicken Carcasses, Bulk Tank Milk, Minced Meat and Contact Persons. *BMC Veterinary Research* 2011, 7, 6.

- Kaleli İ, Demir M.** *Koagülaz Negatif Stafilokoklarda* Slaym Faktör Yapımının İki Ayrı Yöntem ile ve Farklı Atmosfer Ortamlarında Araştırılması. *Türkiye Tıp Dergisi* 1999, 6, 226–30.
- Kalmus P, Aasmae B, Karssin A, Orro T, Kask K.** Udder Pathogens and Their Resistance to Antimicrobial Agents in Dairy Cows in Estonia. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2011, 53, 4.
- Karahan M.** Mastitisli İnek Sütlerinden İzole Edilen Streptokok ve Stafilokok Etkenlerinde Genetik Polimorfizmin Araştırılması. Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ, 2005.
- Kıran F, Osmanağaoğlu Ö.** Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) İdentifikasyonunda/Tiplendirmesinde Kullanılan Moleküler Yöntemler. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 2011, 27(1), 62-74.
- Kırkan Ş, Göksoy EÖ, Kaya O.** Identification and Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Coagulase Negative Staphylococci* From Bovine Mastitis in the Aydın Region of Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science* 2005, 29, 791-796.
- Kırsan İ, Özgür Y, Gürbulak K, İkiz S, Şenünver A.** Laktasyondaki İneklerde Subklinik Mastitislerin Ampisilin ve Sulbaktam Kombinasyonu ile Tedavisi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* 1999, 29, 105-111.
- Knapp CC, Washington JA.** Evaluation of Trehalose-Mannitol Broth for Differentiation of *Staphylococcus Epidermidis* From Other Coagulase-Negative Staphylococcal Species. *Journal of Clinical Microbiology* 1989, 27, 2624-2625.
- Kuyucuoğlu Y, Uçar M.** Afyon Bölgesi Süt İneklerinde Subklinik ve Klinik Mastitislerin Görülme Oranları ve Etkili Antibiyotiklerin Tespiti. *Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Dergisi* 2001, 1, 19-24.
- Levi K, Bailey C, Bennett A, Marsh P, Cardy DL, Towner KJ.** Evaluation of an Isothermal Signal Amplification Method for Rapid Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* From Patient-Screening Swabs. *Journal of Clinical Microbiology* 2003, 41(7), 3187-91.
- Lindsay JA, Aravena-Roman MA, Riley TV.** Identification of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus hominis* From Blood Cultures by Testing Susceptibility to Desferrioxamine. *Eurasian Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 1993, 12, 127-131.

Lowy R, Franklin D. Antimicrobial Resistance: The Example of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Microbiology* 2003, 111, 1265-1273.

Lüthje P, Schwarz S. Antimicrobial Resistance of *Coagulase Negative Staphylococci* From Bovine Subclinical Mastitis with Particular Reference to Macrolide-Lincosamide Resistance Phenotypes and Genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2006, 57, 966-969.

Marshall SA, Wilke WW, Pfaller MA, Jones RN. *Staphylococcus aureus* and *Coagulase-Negative Staphylococci* From blood Stream Infections: Frequency Of Occurrence, Antimicrobial Susceptibility, and Molecular (*mecA*) Characterization of Oxacillin Resistance in the SCOPE Program. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 1998, 30(3), 205-214.

Mason WJ, Blevins JS, Beenken K, Wibowo N, Ojha N, Smeltzer MS. Multiplex PCR Protocol for the Diagnosis of Staphylococcal Infection. *Journal of Clinical Microbiology* 2001, 39(9), 3332-8.

Mellmann A, Cloud J, Maier T. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of- Flight Mass Spectrometry in Comparison to 16S rRNA Gene Sequencing for Species Identification of Nonfermenting Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 2008, 46, 1946–1954.

Memmedova N. Süt Sığırlarında Mastitisin Bazı Yapay Zeka Yöntemleri Kullanılarak Erken Dönemde Tespiti. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, 2012.

Milner P, Page KL, Hillerton JE. The Effects of Early Antibiotic Treatment Following Diagnosis of Mastitis Detected by a Change in the Electrical Conductivity of Milk. *Journal of Dairy Science* 1996, 80(5), 859-863.

Mohania D, Nagpal R, Kumar M, Bhardwaj A, Yadav M, Jain S, Marotta F, Singh V, Parkash O, Yadav H. Molecular Approaches for Identification and Characterization of Lactic Acid Bacteria. *Journal of Digestive Diseases* 2008, 9, 190-198.

Moon JS, Lee AR, Kang HM, Lee ES, Kim MN, Paik YH, Park YH, Joo YS, Koo HC. Phenotypic and Genetic Antibigram of Methicillin Resistant *Staphylococci* Isolated from Bovine Mastitis in Korea. *Journal of Dairy Science* 2007, 90, 3, 1176-1185.

- Morandi S, Brasca M, Lodi R, Brusetti L, Andrighetto C, Lombardi A.** 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* 2009, 88, 427-435.
- Mork T, Jorgensen HJ, Sunde M, Kvitle B, Sviland S, Waage S, Tollersrud T.** Persistence of Staphylococcal Species and Genotypes in the Bovine Udder. *Veterinary Microbiology* 2012, 159, 171-180.
- Ote I, Taminiau B, Duprez JN, Dizier I, Mainil JG.** Genotypic Characterization by Polymerase Chain Reaction of *Staphylococcus aureus* Isolates Associated with Bovine Mastitis. *Veterinary Microbiology* 2011, 153, 285-292.
- Pankaj SA, Chhabra R, Sindhu N.** Sub-clinical Mastitis in Murrah Buffaloes with Special Reference to Prevalence, Etiology and Antibiogram. *Buffalo Bulletin* 2013, 32(2), 107-115.
- Paterson GK, Morgan FJE, Harrison EM, Peacock SJ, Parkhill J, Zadoks RN Holmes MA.** Prevalence and Properties of mecC Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Bovine Bulk Tank Milk in Great Britain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2013, 417, 1-5.
- Petersson-Wolfe CS, Mullarky IK, Jones GM.** *Staphylococcus aureus* Mastitis: Cause, Detection, and Control. *Virginia Cooperative Extension Publication* 2010, 404, 229, 1-7.
- Piessens V, Van Coillie E, Verbist B, Supré K, Braem G, Van Nuffel A, De Vuyst L, Heyndrickx M, De Vliegher S.** Distribution of *Coagulase Negative Staphylococcus* species from milk and environment of dairy cows differs between herds. *Journal of Dairy Science* 2011, 94, 2933–2944.
- Pitkälä A, Haveri M, Pyörälä S, Myllys V, Honkanen-Buzalski T.** Bovine Mastitis in Finland 2001 Prevalence, Distribution of Bacteria, and Antimicrobial Resistance. *Journal of Dairy Science* 2004, 87, 2433-2441.
- Rhabadan PM, Garcia de Viedma D, Diaz M.** Heterogeneous Antimicrobial Resistance Patterns in Polyclonal Populations of *Coagulase Negative Staphylococci* Isolated From Catheters. *Journal of Clinical Microbiology* 2000, 38(4), 1359-63.
- Rhoden DL, Hancock GA, Miller JM.** Numerical Approach to Reference Identification of *Staphylococcus*, *Stomatococcus* and *Micrococcus*. *Journal of Clinical Microbiology* 1993, 31, 490-493.

- Riffon R, Sayasith K, Khalil H, Dubreuil P, Drolet M, Lagace J.** Development of a Rapid and Sensitive Test for Identification of Major Pathogens in Bovine Mastitis by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2001, 39, 2584-2589.
- Rişvanlı A, Kalkan C.** İneklerde Meme Papillomatozisi ile Mastitis Arasındaki İlişki. *Veteriner Bilimleri Dergisi* 2001, 17(3), 143-147.
- Ruegg PL.** New Perspectives in Udder Health Management. *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice* 2012, 28, 149–163.
- Sasaki T, Tsubakishita S, Tanaka Y, Sakusabe A, Ohtsuka M, Hirotaki S, Kawakami T, Fukata T.** Multiplex-PCR Method for Species Identification of *Coagulase-Positive Staphylococci*. *Journal of Clinical Microbiology* 2010, 48(3), 765-769.
- Seng P, Drancourt M, Gouriet F.** Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Clinical Infectious Diseases* 2009, 49, 543–51.
- Songür M, Sayan M, Yüce A, Yuluğ N.** Koagülaz Negatif Stafilokoklarda Slaym Üretimi ile Değişik İnkübasyon Ortamlarının İlişkisi. *İnfeksiyon Dergisi* 1998, 12, 29–33.
- Stapleton PD, Taylor PW.** Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Science Progress* 2002, 85, 57-72.
- şahin M, şolak A, Oflu S, Aydın F, Genç O, Güler M.** Kars Yöresi İthal Simental İneklerinde Subklinik ve Klinik Mastitislerin Görülme Oranı ve Etkili Antibiyotiklerin Belirlenmesi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 1997, 3(1), 49-55.
- Tenhagen BA, Köster G, Wallmann J, Heuwieser W.** Prevalence of Mastitis Pathogens and Their Resistance Against Antimicrobial Agents in Dairy Cows in Brandenburg, Germany. *Journal of Dairy Science* 2006, 89, 2542-2541.
- Thorberg BM, Danielsson-Tham ML, Emanuelson U, Persson Waller K.** Bovine Subclinical Mastitis Caused by Different Types of *Coagulase Negative Staphylococci*. *Journal of Dairy Science* 2009, 92, 4962–4970.
- Tomazi T, Gonçaves JL, Barreiro JR, de Campos Braga PA, e Silva LFP, Eberlin MN, dos Santos MV.** Identification of *Coagulase Negative Staphylococci* From Bovine Intramammary Infection by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology* 2014, 52, 5, 1658 1663.
- Tünger A.** *Staphylococcus aureus*: Mikrobiyoloji, Patogenez ve Epidemiyoloji. Gram-Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2004, 9–68.
- Tünger A, Çavuşoğlu C, Korkmaz M.** Mikrobiyoloji. Asya Tıp Kitapevi, İzmir, 2005, 6.

- Türütoğlu H, Ateşoğlu A, Salihlioğlu H, Öztürk M.** Marmara Bölgesi Süt İneklerinde Mastitise Neden Olan Etkenler. *Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi* 1995, 26, 125-137.
- Türütoğlu H, Erçelik S, Öztürk D.** Antibiotic Resistance of *Staphylococcus aureus* and *Coagulase-Negative Staphylococci* isolated From Bovine Mastitis. *Bulletin of Veterinary Institute Pulawy* 2006, 50, 41-5.
- Uçan US, Arslan E.** İnek Mastitislerinden İzole Edilen *Koagulaz Pozitif Stafilokok* Suşlarının Penisilin Direnci ve Bazı Antibiyotiklere Duyarlılıkları. *Selçuk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi* 2002, 18(3), 19-22.
- Van Veen SQ, Claas EC, Kuijper EJ.** High-throughput Identification of Bacteria and Yeast by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry in Conventional Medical Microbiology Laboratories. *Journal of Clinical Microbiology* 2010, 48(3), 900–907.
- Vasudevan P, Nair MKM, Annamalai T, Venkitanarayanan KS.** Phenotypic and Genotypic Characterization of Bovine Mastitis Isolates of *Staphylococcus aureus* for Biofilm Formation. *Veterinary Microbiology* 2003, 92, 179-185.
- Virdis S, Scarano C, Cossu F, Spanu V, Spanu C, Pietro Luigi de Santis E.** Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus* and *Coagulase Negative Staphylococci* Isolated from Goats with Subclinical Mastitis. *Veterinary Medicine International* 2010, 517060.
- Waldvogel FA.** *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock). Mandell, Douglas and Bennet's Principles and Practice of Infectious Diseases. Churchill Livingstone, New York, 2000, 2069–2092.
- Wieser A, Schneider L, Jung J, Schubert S.** MALDI-TOF MS in Microbiological Diagnostics of Microorganisms and Beyond. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2012, 93(3), 965-974.
- Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL.** Gram-Positive Cocci. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Lippincott Williams Wilkins, Baltimore, 2006, 623-671.
- Workineh S, Bayleyegn M, Mekonnen H, Potgieter LN.** Prevalence and Aetiology of Mastitis in Cows From Two Major Ethiopian Dairies. *Tropical Animal Health and Production* 2002, 34, 19-25.
- Yavuz MK, Esendal ÖM.** Mastitisli İnek Sütlerinden İzole Edilen Stafilokokların Tür Düzeyinde İdentifikasyonu ve Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi* 2002, 13, 19-27.

Yıldız A. Laktasyondaki Subklinik ve Klinik Mastitisli Sütçü İneklerde Lincomycin-Neomycin Kombinasyonu ile Meme İçi Tedavinin Etkinliği. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2003, 17(1), 65-69.

Younis A, Leitner G, Heller D, Samra Z, Gadba R, Lubashevsky G. Phenotypic Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis in Israel Dairy herds. *Journal of Veterinary Medicine Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 2000, 47(8), 591-597.

Zhang Y, Wang X, Lejeune JT, Zervos M, Bhargava K. Comparison of Phenotypic Methods in Predicting Methicillin Resistance in *Coagulase Negative Staphylococcus* (CoNS) From Animals. *Research in Veterinary Science* 2010, 90, 23-25.

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : TANIR, Tansu
Uyruk : T.C
Doğum yeri ve tarihi : İzmir/ 05.06.1983
Telefon : 05303302556
E-mail : tansu.tanir@biomerieux.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Lisans	Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2006

İŞ DENEYİMİ

2006-2008	Medsantek Laboratuvar Mlz. Ltd. Şti	Satış Sorumlusu
2008-	Biomérieux Diagnostik A.Ş.	Satış Sorumlusu

AKADEMİK YAYINLAR

1. MAKALELER

xxx

2. PROJELER

xxx

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

xxx

B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler

xxx