

T.C.

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MB-YL-2009-0006

**SIĞIR MASTİTİSLERİNDEN İZOLE EDİLEN
STAFİLOKOKLARDA METİSİLİN DİRENCİ VE SLAYM
POZİTİFLİĞİ**

Vet. Hek. Seyhan KAYNARCA

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ

AYDIN-2009

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MB-YL-2009-0003

SIĞIR MASTİTİSLERİNDEN İZOLE EDİLEN
STAFİLOKOKLARDA METİSİLİN DİRENCİ VE SLAYM
POZİTİFLİĞİ

Vet. Hek. Seyhan KAYNARCA

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ

AYDIN-2009

ÖNSÖZ

Mastitis, ineklerde süt miktarını düşüren, meme bezlerinde genellikle mikroorganizmalar tarafından meydana getirilen, iltihaplı meme hastalığıdır. Ülkemizde ineklerde mastitis görülme oranının %30 dolayında olduğu ve mastitis nedeniyle süt veriminde yaklaşık %10 oranında azalma meydana geldiği, bunun sonucunda da yıllık kaybın ülke ekonomisi açısından oldukça önemli olduğu bilinmektedir.

Stafilokok türleri sığırlarda klinik ve subklinik mastitislere neden olabilen bulaşıcı en önemli etiyolojik etkenlerdir. Mastitislerde stafilokokların virulansında rol oynayan önemli faktörlerden birisi, mastitisin patogenezesinde en kritik aşama olan stafilokokların meme bezi epiteline adezyonunu sağlayan slime faktör oluşturabilme yeteneklerinin olmasıdır. Metisilin (2,6-dimetoksifenilpenisilin), stafilokokal β laktamaz enziminin hidrolizine dirençli penisilin grubu antibiyotikler içerisinde ilk elde edilen ve ilk klinik kullanıma girendir. In vitro olarak metisiline dirençli bulunan stafilokok kökenleri, tüm diğer beta laktam grubu antibiyotiklere de dirençli kabul edilmektedirler. Stafilokok suşlarında metisilin direncinin ortaya çıkışı ve diğer bazı antibiyotiklere direnci de beraberinde getirmesi bu mikroorganizmanın neden olduğu infeksiyonların tedavisini ve kontrolünü güçleştirmektedir.

İnsanlarda metisilin dirençli suşların varlığı yıllardan beri bilinmekte ve bu durum stafilokokal infeksiyonların tedavilerinde büyük bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Günümüzde veteriner klinik saha çalışmalarında hayvanlarda da metisilin direncinin geliştiği bildirilmektedir. Yurdumuzda bu konuda az sayıda çalışma bulunmakla birlikte sığır mastitislerine neden olan stafilokoklarda slime faktör oluşumunun metisilin direncine etkisinin olup olmadığının incelendiği bir çalışma şu anki bilgilerimize göre bulunmamaktadır. Bu çalışmada sığır mastitislerinden izole edilmiş olan stafilokok suşlarında metisilin direnci ve slime oluşumunun saptanması, bununla birlikte slime oluşumunun metisilin direncine etkisinin olup olmadığının incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu araştırma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (SAE-08017 no'lu proje) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sa
	yf
	a
KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
TABLolar DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
RESİMLER DİZİNİ.....	viii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	ix-x
1. GİRİŞ	
1. 1. Stafilokokların ve Stafilokoklarda Metisilin Direncinin Tarihçesi.....	1
1. 2. MRSA İnfeksiyonlar Neden Tehlikelidir?.....	2
1. 3. Stafilokokların Tanımı ve Sınıflandırılması.....	3
1. 4. Stafilokokların Üreme ve Biyokimyasal Özellikleri.....	4
1. 5. Stafilokokların İdentifikasyonu	5
1. 6. Virülans ve Patojenite.....	7
1. 7. Slaym Faktör.....	11
1. 8. Epidemiyoloji.....	15
1. 9. <i>Staphylococcus aureus</i>' un ve MR Stafikokokların İdentifikasyonu.....	16
1. 10. Stafilokokların Antibiyotik Direnci	17
1. 11. Tedavi	19
1. 12. Mastitis.....	20
2. GEREÇ VE YÖNTEM	
2. 1. Gereç.....	23
2. 1. 1. Örnekler	23
2. 1. 2. Besiyerleri, Ayıraçlar, Solüsyonlar, ve Antibiyotik Diskleri	23
2. 1. 2. 1. İzolasyon, İdentifikasyon, Antibiyogram, Slaym Faktör Tespiti ...	23
2. 1. 2. 1. 1. Blood Agar Base	23

2. 1. 2. 1. 2. MacConcey Agar.....	23
2. 1. 2. 1. 3. Mannitol Salt Phenol Red Agar.....	23
2. 1. 2. 1. 4. Nutrient Broth	24
2. 1. 2. 1. 5. Tripotone Soya Broth	24
2. 1. 2. 1. 6. Lansen' in Üçlü Tüp Besiyeri	24
2. 1. 2. 1. 6. 1. Glikoz – Laktoz – H ₂ S Besiyeri	25
2. 1. 2. 1. 6. 2. Mannitol – Hareket Besiyeri	25
2. 1. 2. 1. 6. 3. Üre – İndol Besiyeri	25
2. 1. 2. 1. 7. Muller – Hinton Agar	
26	
2. 1. 2. 1. 8. Kongo Kırmızılı Kalp İnfüzyon Agar	26
2. 1. 2. 2. Ayıraç ve Solusyonlar	27
2. 1. 2. 2. 1. Kovaks Ayırıcı	27
2. 1. 2. 2. 2. Lizis Solusyonu	27
2. 1. 2. 3. Kullanılan Antibiyotik Diskleri	28
2. 1. 3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Elektroforez	28
2. 1. 3. 1. Kullanılan Cihazlar.....	28
2. 1. 3. 1. 1. Primerler	28
2. 1. 3. 1. 2. MgCl ₂ , Taq DNA Polymerase, 10x Taq Buffer, dNTP Set ..	28
2. 1. 3. 1. 3. Etidyum Bromür	28
2. 1. 3. 1. 4. Marker.....	28
2. 1. 3. 2. Elektroforez	29
2. 1. 3. 2. 1. Kullanılan Gereçler	29
2. 1. 3. 2. 2. Agarose Jel Hazırlanışı	29
2. 2. Yöntem	
2. 2. 1. Örneklerin Alınması.....	31
2. 2. 2. Etken İzolasyonu	
31	
2. 2. 2. 1. Gram Negatif Mikroorganizmaların İdentifikasyonu	31
2. 2. 2. 1. 1. Oksidaz Testi	31
2. 2. 2. 1. 2. Lansen' in Üçlü Tüp Besiyerinde İncelenen Biyokimyasal	
Özellikler.....	32
2. 2. 2. 2. Gram Pozitif Mikroorganizmaların İdentifikasyonu	34

2. 2. 2. 2. 1. <i>Streptococcocea</i> ve <i>Micrococcocea</i> Türlerinin Ayırımı	34
2. 2. 2. 2. 2. <i>Staphylococcus</i> ve <i>Micrococcus</i> Türlerinin Ayırımı	34
2. 2. 2. 2. 3. Koagulaz Pozitif ve Koagulaz Negatif Stafilocokların Ayırımı	34
2. 2. 3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	35
2. 2. 3. 1. Kromozomal DNA Ekstrasyonu	35
2. 2. 3. 2. Master Mikslerin Hazırlanması	36
2. 2. 3. 2. 16S rRNA Geninin PZR ile Çoğaltılması	36
2. 2. 3. 4. Örneklerin Yüklenmesi	37
2. 2. 3. 5. Yürütme	37
	2.
2. 3. 6. Görüntüleme	37
2. 2. 3. 7. Sekansın Analizi	37
2. 2. 4. Disk Diffüzyon Yöntemi ile Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi.	
38	
2. 2. 4. 1. Metisilin Dirençli Stafilocok Suşlarının İdentifikasyonu	39
2. 2. 5. Slaym Faktörün Saptanması	40
2. 2. 6. İstatistiksel Analiz	40
3. BULGULAR	
3. 1. İzolasyon.....	41
3. 2. İzole Edilen Stafilocok Türleri.....	42
3. 3. Stafilocok Türlerinin Antibiyotik Dirençleri.....	43
3. 4. Metisilin Direnci	43
3. 5. PZR Ürünlerinin Elektroforez ile Ayırımı	47
3. 6. Slaym Pozitifliği	47
3. 7. İstatistiksel Analiz	49
4. TARTIŞMA	50
5. SONUÇ	55
ÖZET	56
SUMMARY	57
KAYNAKLAR	58
ÖZGEÇMİŞ	68
TEŞEKKÜR	69

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2. 1. Mastermixin hazırlanma oranları	36
Tablo 2. 2. PZR İşlemlerine ait ısıl döngü ve süre diyagramı	37
Tablo 2. 3. İzole ve identifiye edilen stafilokok suşlarının in vitro antibiyotik duyarlılıkları	39
Tablo 3. 1. Mastitisli sütlerden izole edilen mikroorganizmalar	41
Tablo 3. 2. İdentifiye edilen stafilokok türlerinin dağılımı	43
Tablo 3. 3. Stafilokok türlerinde antibiyotik duyarlılık ve dirençliliklerin dağılımı ...	45
Tablo 3. 4. Metisilin dirençli suşların antibiyotik duyarlılık ve dirençliliklerinin dağılımı	46
Tablo 3. 5. İzole edilen suşlarda slime pozitifliği ve metisilin direncinin türlere göre dağılımı	48
Tablo 3. 6. Slime oluşturan ve oluşturmayan stafilokok türlerinde metisilin duyarlılık ve direnç durumu	49

RESİMLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Resim 3. 1. MSA' da <i>S. aureus</i> ve <i>S. chromogenes</i>	42
Resim 3. 2. Metisilin dirençli aynı zamanda çoklu antibiyotik dirençli stafilokok suşu	44
Resim 3. 3. 16S universal primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PZR	47
Resim 3. 4. Slaym pozitif ve negatif suşlar	49

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

- MRSA:** Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus*
- DNA:** Deoksiribo Nükleik Asit
- rRNA:** Ribozomal Ribo Nükleik Asit
- KNS:** Koagulaz Negatif Stafilokok
- KPS:** Koagulaz Pozitif Stafilokok
- PVL:** Panton- Valentine Lökosidin
- CRF:** Coagulase Reacting Faktör
- PBS:** Penisilin Bağlayan Protein
- ELISA:** Enzyme Linked Immunosorbent Assay
- KKA:** Kongo Kırmızılı Agar
- KKT:** Kalitatif Tüp Testi
- MT:** Kantitatif Mikrodilüsyon Plak Testi
- PZR:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu
- CLSI:** Clinical and Laboratory Standards Institute
- PBP:** Penisilin Bağlayan Protein
- TK- MRSA:** Toplum Kökenli Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus*
- HK- MRSA:** Hastahane Kökenli Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus*
- SCC*mec*:** Stafilokokal Kromozom *mec*Gen
- SHS:** Somatik Hücre Sayısı
- CMT:** California Mastitis Test
- WST:** White Side Test
- MCA:** MacConcey Agar
- NB:** Nutrient Broth
- TSB:** Tripotone Soya Broth
- MHA:** Mueller – Hinton Agar
- MSA:** Mannitol Salt Agar

BHIA: Brain Heart Infusion Agar
UV: Ultraviyole
ONPG: Ortho – Nitrophenyl – B - Galactoside
MR: Metil Red Testi
VP: Voges Proskauer
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic asit
S: Duyarlı
I: Orta Derecede Duyarlı
R: Dirençli
N: İzolat Sayısı
SPSS: Slaym Pozitif Suş Sayısı
MRSS: Metisilin Direnli Suş Sayısı
AMC: Amoksisillin Klavulanik Asit
N: Neomisin
P: Penisilin
CN: Gentamisin
ENR: Enrofloksasin
CFP: Sefoperazon
TET: Tetrasiklin
VAN: Vankomisin
FOX: Sefoksitin

1. GİRİŞ

1. 1. Stafilocokların ve Stafilocoklarda Metisilin Direncinin Tarihçesi

Stafilocoklar ilk kez Robert Koch tarafından 1878'de gösterilmiş; mikroorganizmayı 1880 yılında Pasteur sıvı besiyerinde üretmiş ve 1881'de İskoçyalı bir cerrah olan Alexander Ogston fare ve kobaylar için patojen olduğunu bildirilmiştir. *Staphylococcus* terimi karakteristik kümelenmeler yaptıkları için Grekçe staphyle (üzüm salkımı) tabirinden türetilmiştir (Waldvogel 2000). Rosenbach 1884'te beyaz renkli kolonileri *Staphylococcus albus*, sarı-portakal rengi kolonileri ise *Staphylococcus aureus* olarak isimlendirmiştir (Cengiz 1999).

Patojen mikroorganizmalarla oluşan infeksiyonların önlenmesi ve tedavisinde kullanılan etkili ajanların keşfi modern tıbbın en önemli gelişmelerinden biridir. Stafilocokal infeksiyonlara bağlı mortalite 1940'lı yıllarda penisilinin tedavide kullanılmaya başlanmasıyla birlikte, hızla azalma göstermiştir. Ancak kısa bir süre sonra 1944'te *S. aureus* suşları penisilinaz enzimi üretmeye başlayarak penisiline direnç geliştirmiş bu dirençli suşlar hızla yayılmış ve 1950'lerin sonlarında suşların yaklaşık %50'si penisiline dirençli hale geldiği bildirilmiştir. Aynı tarihlerde tetrasiklin, kloramfenikol ve eritromisine karşı çoklu direnç gösteren *S. aureus* suşlarının varlığı ortaya konulmuştur. İlk semisentetik penisilinaza dirençli antimikrobiyal ajan olan metisilin 1959 yılında klinik kullanıma girmiştir. Bundan iki yıl sonra, 1961 yılında, insanlarda ilk metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) izolatlarının varlığı İngiltere'de bildirilmiştir (Jevons 1961). Hayvanlarda ise ilk MRSA izolatı 1972 yılında mastitisli

sığırlardan izole edilirken, bunu 1988 yılında kedi ve 1989 yılında köpek izolatları izlemiştir. Daha sonra dünyanın pek çok yerinde izolat sayısının artması ile MRSA infeksiyonlarının hayvanlarda da önemli bir problem olmaya başladığı görülmüştür (Leonard ve Markey 2008, Morgan 2008).

1. 2. MRSA İnfeksiyonları Neden Tehlikelidir?

1. 2. 1. Patojenite: MRSA suşlarının konakta hastalık oluşturmasını sağlayan pek çok virulans faktörü vardır. MRSA suşları hastane infeksiyonu oluşturan etkenler olmalarının yanı sıra özellikle etkilenen bireylerde nekrotize pnemoni, deri ve yumuşak doku infeksiyonlarına neden olan önemli toplum kaynaklı patojenler olarak bilinmektedirler (Anonim 1).

1. 2. 2. Tedavi Seçeneklerinin Sınırlı Olması: Antimikrobiyal direnç tüm dünyada halk sağlığı açısından önemli bir sorundur. Metisiline dirençli *S. aureus* suşları ölümcül infeksiyonlara neden olmasının dışında diğer bir ürkütücü yanı da; penisilinaz enzimine dirençli tüm penisilinlere (metisilin, oksasilin, nafsilin, kloksasilin ve dikoloksasilin), sefalosporinlere, ayrıca klindamisin, eritromisin, tetrasiklin ve aminoglikozidler gibi daha birçok antibiyotiğe dirençli olmalarıdır. Bu da; MRSA infeksiyonlarında tedavi seçeneği olarak sınırlı sayıda antibiyotik bulunduğu anlamına gelmektedir. Günümüzde MRSA ile infekte olguların tedavisi nadiren etkili olan birkaç antibiyotik dışında, glikopeptid grubu antibiyotiklerle mümkün olabilmektedir. Diğer önemli bir nokta ise, uygun dozda kullanılsa bile vankomisinin, hastada mevcut MRSA kolonizasyonunu ortadan tamamen kaldıramamasıdır; yani, MRSA infeksiyonu olduğu için etkin olarak tedavi edilen bir hastanın tedavi bitiminden sonra da bu bakteri ile kolonize olma olasılığı bulunmaktadır (Cengiz 1999).

1. 2. 3. Bulaşıcı Olmaları: *S. aureus* en sık olarak burun deliklerinin ön kısmında, daha az olarak da nazofarenks, koltuk altları, gastrointestinal sistemde bulunur. Toplumdaki bireylerin %30-40'ı *S. aureus*'un burun taşıyıcısıdır. Bu nedenle oto infeksiyon sık görülür. Solunum yolu ve cansız maddeler yolu ile bulaşma nadirdir. Hastanelerde hijyenik kurallara uymayan sağlık personeli bulaşmada önemli rol oynamaktadır (Anonim 2).

MRSA suşlarının artık insan ve hayvanlar arasında bulaşabildiği bilinmektedir (Morgan 2008). Juhász-Kaszanyitzky ve ark. (2007) hem mastitisli sığırlardan hem de onların bakıcılarından MRSA suşu izole ettiklerini MRSA suşlarının insan ve hayvanlar arasında bulaşabildiği yani zoonotik önemlerinin olabileceğini bildirmişlerdir. Hastane kökenli MRSA klonlarının köpeklerde (Rich ve ark. 2005) ve mastitisli sığır sütlerinde (Türkyılmaz ve ark. 2009) bulunması MRSA suşlarının insanlardan hayvanlara bulaşabildiğini düşündürmüştür. Bu nedenle MRSA hem insan hem hayvan sağlığı açısından önemli bir patojendir.

1. 3. Stafilocokların Tanımı ve Sınıflandırılması

Stafilokok türleri *Micrococcaceae* familyası içinde yer alan, katalaz pozitif, Gram pozitif koklardır. Stafilocoklar doğada; tozda, toprakta, hayvanların deri, mukoza dokularında ve salgılarında yaygın olarak bulunan, insan ve hayvanların deri, burun boşluğu ve lezyonlarında çoğalabilen bakterilerdir (Bilgehan 2000).

Günümüze kadar *Staphylococcus* genusunda 33 tür ve 17 alt tür saptanmıştır. Stafilocok türleri DNA/DNA ilişkileri ve fenotipik özelliklerine göre her geçen gün değişmekle birlikte en az dört grup altında toplanabilirler:

Birinci grupta (*S. epidermidis* grubunda); *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* ve *S. saccharolyticus* türleri,

İkinci grupta (*S. saprophyticus* grubunda); *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. xylosus* türleri,

Üçüncü grupta (*S. simulans* grubunda); *S. simulans*, *S. carnosus* türleri,

Dördüncü grupta (*S. sciure* grubunda); *S. sciure*, *S. lentus* türleri yer almaktadır (Tünger 2004, Tünger ve ark. 2005).

S. aureus, *S. auricularis*, *S. intermedius*, *S. hyicus* ve *S. caseolyticus* herhangi bir gruba sokulamamıştır. İnsanlarda ve hayvanlarda stafilocok infeksiyonlarına öncelikle *S. aureus* neden olmaktadır. Fırsatçı patojenler olan *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* da

sıklıkla infeksiyon oluşturunken; daha nadiren *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. saccharolyticus*, *S. cohnii* ve *S. simulans* da fırsatçı infeksiyonlara sebep olmaktadırlar (Bilgehan 2000, Waldvogel 2000).

1. 4. Stafilokokların Üreme ve Biyokimyasal Özellikleri

Stafilokok cinsi içerisinde bulunan bakteriler Gram pozitif kok görünümündedirler. Tekli, ikili, dörtlü hücreler halinde bulunabilirler, üç veya dört hücreden oluşan kısa zincirler yapabilirler ve düzensiz üzüm salkımı benzeri şekiller oluştururlar. Hareketsiz, spor oluşturmeyen, genellikle katalaz pozitif, oksidaz negatif, kapsülsüz olup, anaerop, katalaz negatif olan ve karbohidratlardan gaz oluşturmeyen *S. saccharolyticus* ve *S. aureus* subsp. *anaerobius* dışında fakültatif anaeropturlar. Daha çok aerop üremeyi tercih ederler. Stafilokoklar başta glukoz olmak üzere karbohidratları parçalar ve son ürün olarak da laktik asit oluştururlar. Fakat gaz üretmezler. Ancak şekerlerden mannitol üzerine olan etkileri özellik taşımakta olup bu karbohidratı yalnız koagülaz pozitif *Staphylococcus* türleri parçalarlar. Bu nedenle mannitole etki koagülaz testinden sonra *S. aureus*'u diğer stafilokoklardan ayırt etmede önemli test olarak kabul edilmektedir (Anonim 1). Glikoz içeren (%1) besi yerinde üretilince daha belirgin olarak katalaz pozitif, oksidaz negatifdirler. Nitratları nitritlere indirgerler. Çoğu %7,5–10 NaCl içeren basit besiyerlerinde, 18–45°C'de kolaylıkla ürerler. Bazı türlerde karotenoid pigment bulunabilir (Waldvogel 2000, Bilgehan 2000). Özellikle patojen olan *S. aureus*'ta kolonilerde pigment ve hemoliz görülebilir. Kolonilerin rengi beyaz ve limon sarısı arasında değişiklik gösterir. MacConkey agarda üreme yeteneğine sahiptirler. Patojen *Staphylococcus*'lar kültürlerde +4°C'de 2–3 ay, -20°C'de 3–6 ay canlı kalabilirler. Buna karşın, 60°C'ye 30 dakika dayanabilirler. Sodyum klorürün %9'luk konsantrasyonlarına ve sakkarozaya toleranslıdır, %2'lik fenolde 15 dakikada inaktive olurlar (Anonim 1, Bilgehan 2000).

Stafilokoklar basit besiyerleri dâhil birçok besiyerlerinde ürerler. Ancak kanlı besiyerlerinde daha iyi çoğalırlar. *S. aureus*'a ait koloniler geniş (6–8 mm çapında), düz, yüzeyden hafifçe kabarık, yarı şeffaf görünümündedir. Çoğu suşa ait koloniler krem-sarı, portakal rengi pigmentasyon gösterirler. *S. aureus* kanlı agarda beta hemoliz yapmaktadır. *S. aureus* hem aerop hem de anaerop ortamda ürer (Bilgehan 2000, Waldvogel 2000).

1. 5. Stafilokokların İdentifikasyonu

Gram pozitif koklar olan *Streptococaceae* ve *Micrococcaceae* familyalarındaki etkenleri birbirlerinden ayırmak için en yaygın olarak kullanılan testler aşağıda özetlenmiştir:

1. 5. 1. Katalaz Testi: *Micrococcaceae* familyalarındaki stafilokok ve mikrokokları, *Streptococaceae* familyası üyelerinden ayırt edici bir deneydir. Bu test eritrosit içeren besiyerlerinde yapılmamalıdır. Çünkü eritrositlerde katalaz enzimi bulunmakta ve deney sonunda hatalı pozitiflik gözlenmektedir. *Micrococcaceae* familyası (*Staphylococcus* spp. ve *Micrococcus* spp.) katalaz pozitif, *Streptococaceae* familyası üyeleri ise katalaz negatiftirler (Anonim 1, Bilgehan 2000).

1. 5. 2. Koagülaz Testi: Koagülaz enzimi plazmanın pıhtılaşmasında görev alır. Trombin katalizörlüğü ile meydana gelen fibrinojenden fibrin oluşumunu sağlar. Bakteriler bu enzim sayesinde plazmayı pıhtılaştırır. Oluşturdukları fibrin zırhı ile kaplanarak fagositoza karşı korunurlar. Koagülaz testi, *S. aureus*'un diğer stafilokoklardan ayırt edilmesinde en çok önem taşıyan deneydir. Stafilokok kolonisi görüntüsü veren ve Gram boyasında Gram pozitif koklar saptanan tüm izolatlarda yapılmalıdır. Pigment hemoliz, mannitole etki gibi deneylerin hiç birisi *S. aureus*'un ayırımında bu kadar değerli değildir. Tüp deneyi ve lam deneyi olmak üzere iki şekilde yapılabilir. Tüp deneyinde stafilokokların besiyerine saldıkları serbest koagülaz; lam deneyinde ise kümeleştirme faktörü olarak da bilinen bağlı koagülaz araştırılmaktadır. Lam deneyi hızlı sonuç vermekle birlikte, *S. aureus* suşlarının %10-15'i bu yöntemle negatif sonuç verebilir. Mannitolü yalnız *S. aureus* parçaladığı halde koagülaz negatif olanlar parçalamazlar (Bilgehan 2000, Waldvogel 2000).

1. 5. 3. Mannitol Fermentasyonu: Karışık bakteri florası içeren materyalden stafilokokların ayırımı için kullanılmaktadır. *S. aureus* mannitolü daima kullanır. Reaksiyon mannitolün asit bileşiklere dönüşmesine dayanır. *S. epidermidis* mannitol fermentasyonu yönünden nadiren pozitifdir. Mannitole etki etmesi, koagülaz testinden sonra *S. aureus*'u diğer stafilokoklardan ayırt etmede en yararlı testtir (Bilgehan 2000, Waldvogel 2000).

1. 5. 4. Basitrasin Direnci: *Micrococcaceae* familyasındaki *Micrococcus* cinsi basitrasine duyarlı, *Staphylococcus* cinsi basitrasine dirençlidir (Falk ve Guering 1983).

1. 5. 5. Novobiocin Direnci: *S. saprophyticus* ve çok nadir olarak izole edilen bazı koagulaz olumsuz stafilokoklar (*S. cohnii*, *S. lentus*, *S. sciuri* ve *S. xylosus*) bu antibiyotiğe dirençli olduğu halde *S. epidermidis* ve *S. aureus* duyarlıdır (Anonim 1, Bilgehan 2000).

1. 5. 6. Glukoz Fermentasyonu Deneyi: *Micrococcaceae* familyasındaki *Micrococcus* genusu oksidatif, *Staphylococcus* genusu fermantatif etki verir (Anonim 1, Kloos ve Bunnerman 1995, Bilgehan 2000).

1. 5. 7. Amplifikasyon ve Dizi Analizi: Moleküler tanısal yöntemler, geleneksel yöntemler kullanarak identifikasyon yapılması zor veya imkânsız olan infeksiyöz etkenlerin tanımlanmasında en değerli yöntemler olarak kabul edilmektedirler. İnfeksiyöz hastalıkların moleküler tanısı çoğunlukla nükleik asit odaklıdır (Mehndiratta ve ark. 2009).

Bakteri ribozomlarının 30S ve 50S alt birimlerinden elde edilen 5S ve 16S rRNA'ların baz dizileri çalışmalarda çok yaygın olarak kullanılmaktadır. rRNA'lar bütün mikroorganizmalarda bulunurlar ve mikroorganizma evrimi ile ilişkilerini araştırmada idealdirler. Bütün ribozomlardaki işlevleri aynıdır; sabit ve kritik rolleri nedeni ile de yapıları zaman boyunca çok az değişir. Ana filogenetik grupların çoğunda 16S rRNA bir veya daha çok karakteristik nükleotid dizilerine sahiptir; bunlara "oligonükleotid imzaları" denir (Anonim 3). 16S rRNA gen sekansı 1980'li yıllardan beri bakterilerin sınıflandırılmasında ve genotipik analizleri için önemli bir araç olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin kullanılmasıyla pek çok yeni cins ve tür ayrılmıştır. rRNA mutasyonlardan en az etkilenen genetik materyaldir. Bu amaçla araştırılan 16S rRNA, rRNA 30 S alt ünitesinde yer alan bir dizidir. Özellikle kültürde üretilmemiş veya klasik yöntemlerle zor tanımlanabilen bakterilerin identifikasyonu için 16S rRNA hedef dizidir. 16S rRNA'nın birkaç bölgesi tüm bakterilerde çok iyi korunmuştur. Bu korunmuş bölgelerden seçilen primerler tüm bakterilerde 16S rRNA amplifikasyonunu sağlar ve bunlara üniversal primerler denir. Çoğaltılan bölgeler aynı zamanda tür identifikasyonunu sağlayan özgün değişken bölgeleri de içerir. Bundan dolayı 16S rRNA gen sekansına dayalı analiz yöntemleri insanlarda klinik tanı laboratuvarlarında bakteriyel izolatların identifikasyonunda kullanılan önemli bir yöntem haline almıştır (Rantakokko-Jalava ve ark. 2000, Woo ve ark.

2001, Anđ Küçüker ve ark. 2002). Bakterilerin 16S rRNA sekansına dayalı moleküler identifikasyonu veteriner klinik sahada karşılaşılan bakterilerin tanımlanmasında da kullanılmaya başlanmıştır (Chai ve ark. 2003). Özellikle veteriner rutin teşhis laboratuvarlarında koagulaz negatif stafilocokların (KNS) tür düzeyinde identifikasyonları zor ve zaman alıcı olduğundan bu yöntem tercih edilmektedir. Günümüzde bazı KNS'ların da artık mastitise neden olan önemli patojen mikroorganizmalar oldukları bilinmektedir. Bu nedenle KNS olarak tanımlanan etkenlerde tür düzeyinde identifikasyon, yapılması gerekli bir analiz olarak ele alınmaktadır. Sekans yöntemi için bakterinin izolasyonu, bunlardan DNA ekstraksiyonu ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile 16S rRNA geninin çoğaltılarak sekanslanması gerekmektedir (Ludwig ve Schleifer 1992).

1. 6. Virulans ve Patojenite

S. aureus virulansı en yüksek olan stafilocok türüdür. Ancak infeksiyon olup olmaması mikroorganizmanın virulansı ile konak savunma sisteminin oluşturacakları dengeye bağlıdır. Stafilocokların virulansında rol oynayan faktörler aşağıda özetlenmiştir:

1. 6. 1. Hücre Duvarı: Diğer Gram pozitif bakterilerde olduğu gibi stafilocokların da hücre duvarı kuru ağırlığının yaklaşık %50'sini peptidoglikan tabaka oluşturmaktadır. Bu tabaka insanda Gram negatif bakterilerin endotoksinlerine benzer aktivite gösterir. Yani makrofajlardan sitokin salınımını uyarır, komplemanın aktivasyonuna yol açar ve trombosit agregasyonuna neden olur. Ayrıca monositlerden interlökin-1 salınımını uyararak polimorfonükleer lökositlerin infeksiyon bölgesine toplanmalarına ve sonuçta apse oluşumuna da yol açar. Sadece Gram pozitif bakterilerde bulunan teikoik asit stafilocokların hücre duvarında da yer alır ve mukozalarda bulunan özgül reseptörleri ile birleşerek stafilocokların konağa adherensini sağlar (Tünger 2004).

1. 6. 2. Kapsül: Birçok *S. aureus* suşunda polisakkarid yapıda bir mikrokapsül bulunmaktadır. Bu ekzopolisakkarid bakteriyi fagositozdan korur ve konak hücrelerine adherensini sağlar (Tünger 2004).

1. 6. 3. Yüzey Proteinleri: Protein A, elastin, kollajen, fibronektin bağlayan proteinler ve "clumping faktör", kimyasal yapıları ve hücre duvarı yerleşimleri birbirlerine benzeyen stafilocoksik yüzey proteinleridir. Bu proteinler stafilocokların konak

dokularında kolonize olmasında en önemli faktörlerdir. Bu proteinlerin prototipi olan protein A'nın en önemli özelliği, IgG3 dışındaki tüm IgG ve IgA2 ile bazı IgM'lerin Fc reseptörleri ile birleşebilmesidir. Bu nedenle protein A'nın antikomplemanter ve antifagositer etkinliği vardır (Cengiz 1999, Tünger 2004).

1. 6. 4. Toksinleri: *S. aureus*, konak hücre morfolojisini ve fonksiyonunu etkileyen çok sayıda ekstraselüler toksin üretebilir. Bunlardan bir kısmı toksik etkilerini enzimatik aktivite ile gösterirken, diğerleri süperantijen özellikleri nedeniyle sitokin salınımını indükler. Ayrıca, bu toksinler sayesinde stafilokoklar yoğun inflamatuvar yanıt olan bölgelerde bile üremelerini sürdürebilirler. Stafilokokların en önemli toksinleri aşağıda özetlenmiştir;

1. 6. 4. 1. Sitolitik Toksinler: Stafilokokların salgıladığı, eritrositler ve çeşitli hücreler üzerinde sitolitik, deney hayvanlarında öldürücü, nekrotik etkileri olan ekzotoksinlerdir. İyi antijen yapısındaki bu toksinlere karşı organizmada nötralizan antikorlar oluşmaktadır. Bu toksinler dört tiptir (Cengiz 1999).

—**Alfa Toksin:** Bu toksin ilk kez Kraus ve Clairmont tarafından 1900 yılında tanımlanmıştır. *S. aureus* insan suşlarının ana hemolizindir. Hemolitik, dermonekrotik, lizozom parçalayıcı ve doku kültürlerinde sitolitik etkileri vardır. Tavşan eritrositleri için hemolitik aktivitesi en fazladır, insan eritrositlerine fazla bir etkisi yoktur. İnsan makrofajları ve trombositleri üzerine litik etkisi vardır, monositlere etkisizdir. Dolaşım, kas ve böbrek korteksi dokuları toksine karşı duyarlıdır, bu dokularda tahribat yapar.

—**Beta Toksin:** İlk kez 1935 yılında Glenny ve Stevens tarafından tanımlanmıştır. Stafilokok sfingomyelinazıdır. En iyi koyun, daha az olarak insan ve tavşan eritrositlerini eritir. Soğukta ve sfingomyelin üzerine etki ederek eritrositleri eritir.

—**Gama Toksin:** Smith ve Price tarafından 1938 yılında tanımlanmış, Möllby Wadström tarafından elde edilmiştir. İnsan, tavşan ve koyun eritrositleri duyarlıdır, at ve kanatlı eritrositleri dirençlidir.

—**Delta Toksin:** Bu toksin 1947 yılında Williams ve Harper tarafından tanımlanmıştır. İnsan, tavşan, koyun ve maymun eritrositlerini eritir. Biyolojik etkinliği

geniş olup, eritrosit, lökosit, makrofaj, lenfosit ve trombositleri hasara uğratan bir proteindir.

Bu sitolitik toksinlerden alfa ve delta toksin, *S. aureus* suşlarında en çok bulunanlardır. *S. aureus* suşlarının %95'inde bunlardan biri, %82'sinde her ikisi birlikte bulunur (Anonim 1, Cengiz 1999).

1. 6. 4. 2. Lökosidin: *S. aureus* tarafından oluşturulan bu toksinin polimorf çekirdekli lökositler ve makrofajlar üzerine litik etkisi vardır. Diğer hücreleri etkilemez. Toksin elektroforetik olarak birbirinden ayrı F (Fast) ve S (Slow) adında iki protein komponentinden oluşmuştur. Bu komponentlerden her biri iyi antijen yapısında olup, herbirinden ayrı toksoid oluşturulur. Hücre zarında potasyum ve diğer katyonlara karşı geçirgenliği artırıcı gözeneklerin açılmasını sağlayarak etkili olurlar (Cengiz 1999, Waldvogel 2000).

Panton-Valentine Lökosidin (PVL), özellikle toplum kökenli cilt ve yumuşak doku infeksiyonları ile akut nekrotizan pnömonilerden izole edilen *S. aureus* suşları tarafından salgılanan önemli bir virulans faktörüdür. PVL, de diğer lökosidinler gibi birbiri ile sinerjik etki gösteren iki komponentli bir toksin olup, konak lökositlerinin membranlarında porlar oluşturarak bu hücrelerin erimesine neden olmaktadır. PVL sentezleyen suşlar tarafından oluşturulan infeksiyonlar daha şiddetli seyretmekte, hatta akut nekrotizan pnömonilerde olduğu gibi ölümlerle sonuçlanabilmektedir. Özellikle toplum kökenli suşlar tarafından sentezlenmekle birlikte, yapılan çalışmalar PVL-pozitif *S. aureus* suşlarının hastanelerde yayılabildiğini, hatta hastane kaynaklı salgınlara neden olabildiğini göstermektedir. *S. aureus* izolatları arasında ortalama olarak %2–10 arasında PVL pozitifliği bildirilmektedir (Lina ve ark. 1999, Morgan 2008).

1. 6. 4. 3. Enterotoksinler: Isıya dirençli, 100°C'ye 30 dakika dayanabilen, polipeptit yapısında maddelerdir. Özellikle yüksek CO₂'li atmosfer ortamında karbonhidratlı ve proteinli besiyerlerinde üreyen stafilokoklar tarafından oluşturulurlar. Enterotoksinin A, B, C1, C2, D, E ve F şeklinde yedi immünolojik tipi vardır. *S. aureus* kökenlerinin %35-50'sinin bu toksinleri oluşturabildikleri saptanmıştır. A ve D besin zehirlenmelerinde, B ise hastane infeksiyonlarında çok karşılaşılan bir toksindir. Besin zehirlenmelerinde tablo, stafilokok üremiş ve enterotoksin oluşmuş besinlerin yenmesini

izleyen 2–6 saat içinde bulantı, kusma ve ishal ile başlar. Semptom ve bulgular genellikle 24 saat içinde düzelir (Bilgehan 2000, Waldvogel 2000).

1. 6. 4. 4. Eksfoliyatif Toksin (Eksfoliyatin): Epidermolitik toksin olarak da bilinen bu toksin, stafilokok infeksiyonlarının veziküler ve eksfoliyatif deri lezyonlarından sorumludur. Antijenik ve biyokimyasal yapıları bakımından en az iki farklı eksfoliyatin bulunduğu saptanmıştır. A tipi kromozomal, B tipi plazmide bağlı genlerce oluşturulur (Cengiz 1999, Bilgehan 2000).

1. 6. 4. 5. Toksik Şok Sendromu Toksini-1 (TSST-1): Toksik şok sendromunda yer alan stafilokokların çoğu faj-1 grubundandır. Bu özgül toksini salgılayan *S. aureus* suşlarının hastane kaynaklı olabileceği bildirilmektedir (Cengiz 1999, Bilgehan 2000).

Stafilokoklardaki virulans faktörler yoğun bir şekilde çalışılmıştır. Sığır mastitis vakalarından izole edilen *S. aureus* suşları alfa, beta, gama, delta toksinlerine ilaveten leukosidinler, enterotoksin ve koagülaz içermektedir (Matsunaga ve ark. 1993). Bununla birlikte önemli virulans faktörlerinden birisi olan PVL hayvan orjinli suşlarda nadir olarak belirlenmiştir (Morgan 2008).

1. 6. 5. Enzimleri: Stafilokoklar lipaz, hiyaluronidaz, fibrinolizin, penisilinaz, katalaz, koagülaz ve DNaz gibi birçok enzim üretirler. Bu enzimler özellikle stafilokokların komşu dokulara yayılımını kolaylaştırarak infeksiyon patogeneğinde rol alırlar (Tünger 2004).

1. 6. 5. 1. Katalaz: Tüm stafilokok türleri toksik hidrojen peroksidi toksik olmayan oksijen ve suya ayırıştırarak katalaz enzimi üretir. Bakteriler, bu enzim sayesinde fagositlerin içinde toksik oksijen radikalleri tarafından öldürülmeye direnç kazanır.

1. 6. 5. 2. Koagülaz: Ekstrasellüler bir enzimdir. Coagulase-Reacting faktör (CRF) ile birleşerek aktif duruma geçer ve plazmayı pıhtılaştırır. *S. aureus* için standart belirleyici olan koagülazla, patojen olan veya olmayan stafilokok ayrımı yapılır. Koagülaz pozitif stafilokokların üzerinde oluşan kalın fibrin tabakasının, mikroorganizmayı fagositoza karşı koruyarak, patojenliğe katkı sağladığı ileri sürülmektedir. *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hycus* ve *S. delphini* türlerinin koagülaz pozitif oldukları saptanmıştır (Anonim 1).

1. 6. 5. 3. Lipaz: *S. aureus* suşlarının tümü ve koagülaz negatif stafilokokların da yaklaşık 1/3'ü lipaz enzimi üretir. Lipaz, yağları hidrolize ederek vücudun lipid içeren bölgelerinde stafilokokların yaşamasını sağlamakta ve stafilokokların yüzeysel dokuları invaze ederek fronkül ve karbonkül gibi infeksiyonlarının gelişimine neden olmasını sağlamaktadır.

1. 6. 5. 4. Hiyalüronidaz: Bağ dokusunun asellüler matriksindeki asit mukopolisakkaridler olan hiyalüronik asidi hidrolize eden enzimlerdir.

1. 6. 5. 5. Deoksiribonükleaz: DNaz enzimleri endo ve ekzonükleaz aktivitesine sahip, nükleik asitleri 3'-fosfomononükleotidlere parçalayan fosfodiesterazlardır.

1. 6. 5. 6. β -laktamazlar: Klinik kullanıma girdiği dönemlerde hemen tüm stafilokok kökenleri penisiline duyarlı iken, günümüzde özellikle hastane kaynaklı izolatlarda bu oran %5'in altına düşmüştür. Stafilokoklarda penisilin direncine neden olan mekanizma beta-laktamaz üretimidir.

Tüm diğer infeksiyonlar gibi konakçı savunma mekanizması ve bakteriyel virulans arasındaki denge önemlidir. Stafilokokların hücre duvarının büyük bir bölümü, diğer Gram pozitif mikroorganizmalarda olduğu gibi kalın bir peptidoglikan tabakadan oluşur. Hücre duvarının ağırlık olarak %40'ını oluşturan teikoik asidin ise bakterinin mukozal hücrelere tutunmasında ve *S. aureus*'un mukozal kolonizasyonunda önemli olduğu düşünülmektedir. (Doebbeling 1994). *S. aureus*'un zedelenmiş dokulara tutunabildiği beş farklı konakçı proteini saptanmıştır. Bunlar fibronektin, fibrinojen, laminin, trombospondin ve tip 4 kollojendir. İçlerinde tutunma mekanizmasının en iyi açıklandığı fibronektin ve fibrinojendir (Christensen ve ark., 1994, Cengiz ve ark. 2004).

1. 7. Slaym Faktör: Bazı bakterilerin en dış bölümünde glikokaliks denilen yapışkan bir tabaka bulunur. Eğer bu glikokaliks tabakası kalın, bakteri yapısı içinde belli bir yeri olan ve hücre duvarına sıkıca yapışık durumda ise buna kapsül adı verilir. Eğer bu tabaka ince, hücre duvarına sıkıca yapışık durumda değil ve kolaylıkla ayrılabilir bir yapı ise buna slaym tabakası denir. Slaym faktör %40 karbonhidrat ve %27 protein içerir. Stafilokokların tutundukları düz yüzeylerde oluşturdukları slaym tabakası bakterilerin de

tutundukları yüzeylerde hızla kolonize olmalarına ve konakçı savunma mekanizmalarından korunmalarına yol açar (Tünger ve ark. 2004, Cengiz ve ark. 2006).

Slaym üretimi stafilokoklarda önemli bir patojenite faktörü olarak kabul edilmektedir. Bu faktörün mikroorganizmanın konak hücreye veya yapay yüzeylere adezyonunu sağlayarak etkili olduğu gösterilmiştir (Christensen ve ark. 1994, Keskin ve ark. 2003, Cengiz ve ark. 2004). Keskin ve ark. (2003) mastitisli inek sütlerinden ve tavuklardaki lezyonlardan izole edilen patojenik KNS suşlarının, sağlıklı hayvanlardan izole edilen kontrol suşlarına oranla daha fazla oranda slaym oluşturdıklarını ve daha aderan olduklarını bildirmişlerdir. Yüzeylerde bulunan fibrin, fibronektin ve slaym faktörü ile bir biyofilm tabakası oluşmakta, kolonizasyon meydana getirmekte ve bu biyofilmden ayrılan mikroorganizmalar sepsise yol açmaktadırlar (Karaca ve ark. 2001). Biofilm ve slaym terimleri birbirleri yerine kullanılabilir (Arciola ve ark. 2002). Slaym faktör mikroorganizmayı kaplayarak vücudun savunma mekanizmalarından korur. Bu maddenin kemotaktik etkisinin de bulunduğu fakat slaym tarafından uyarılan polimorf çekirdekli lökositlerde miyeloperoksidaz salınımının yetersiz olduğu gösterilmiştir. Bu mikroorganizmanın, hücre içinde yaşam süresinin uzamasına ve fagositozdan korunmasına neden olmaktadır (Aybay ve ark. 1997). Ayrıca, slaym oluşturan mikroorganizmalarla gelişen infeksiyonlarda antibiyotik tedavisi başarısızlığına ve kronik infeksiyonlara daha sık rastlanmaktadır (Christensen ve ark. 1994). Stafilokoklarda slaym oluşumu, fenotipik olarak çeşitli yöntemlerle belirlenebilmektedir.

1. 7. 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 (Christensen ve ark. 1985).

1. 7. 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. Mikroplaklar mikro ELISA ile 490–492 nm dalga boyunda okunur. Beş kuyucuğa sadece steril buyyon konarak, optik yoğunluk ölçümlerinin ortalaması alınır. Bu değer in üstünde olan kuyucuklar slaym “pozitif” olarak değerlendirilir. Plastik doku kültür plakları ile slaym oluşumunu kantitatif olarak inceleyen bir yöntemdir (Christensen ve ark. 1982).

1. 7. 3. Kongo Kırmızılı Agar Yöntemi (KKA): Stafilokokların KKA’ a 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).

Denyer ve ark. (1990) %5 CO₂’ li ortamda bakteriyel aderansın azaldığını göstermişlerdir. Bazı araştırmacılar da anaerop ortamda slaym üretimini göstermişlerdir. (Songür ve ark. 1998, Kaleli ve Demir 1999). Kaleli ve Demir (1999) 100 koagülaz 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.

Stafilokokların slaym oluşturma yeteneklerinin belirlenmesinde KKA, MT ve KTT’ nin etkinliği yapılan çeşitli çalışmalarla incelenmiş ve bu üç yöntem arasında duyarlılık ve özgüllük açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı; KKA yönteminin pratik ve güvenilir bir yöntem olduğu bildirilmiştir (Türkyılmaz ve Eskiizmirli 2006, Yıldırım ve ark. 2008). Yine aynı araştırmacılar tarafından slaym pozitif suşların, test edilen antibiyotiklere slaym negatif suşlardan daha dirençli oldukları da gösterilmiştir

Koagulaz negatif stafilokoklarda slaym faktör pozitifliği ile ilgili çok sayıda araştırma vardır. Delialioğlu ve Gedikoğlu (2001) çeşitli klinik örneklerden soyutlanan 327 KNS suşunun slaym faktör oluşturma 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. Hebert ve ark. (1988) 672 KNS türünde tüp yöntemi ile slaym oluşumunu incelemişler ve *S. epidermidis*'te %83, *S. haemolyticus* %42, *S. hominis*'te %56, *S. simulans*'ta %71, *S. saprophyticus*'ta %71, *S. xylosus*'ta %73, *S. warneri*'de %5, *S. capitis*'te %7 slaym pozitifliği saptamışlardır. Aydın ve ark. (1997) 131 *S. epidermidis*'ten 62'sinde slaym faktör pozitifliğini bildirmişlerdir. Kiraz (1993) 22 kateter örneklerinde slaym faktör pozitifliğini, tüp yöntemi ile %55 olarak vermektedir. Elçi ve ark. (1996) Christensen yöntemi ile KNS'lerde slaym faktör pozitifliğini %56,5, Songür ve ark. (1998) %37 bulurken, Akyar ve ark. (1998) tüp yönteminde %42, KKA yönteminde %43 ve KTT yönteminde %42 bulduklarını 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). Catalanotti ve ark. (2005)'nin bakteriyel bilateral konjunktiviti olan ve yumuşak kontakt lens kullanan 97 hastanın konjunktival sürüntü örneklerinde yaptıkları bir çalışmada izole edilen *S. epidermidis* suşlarının %74,5'i ve *S. aureus* suşlarının %61,1'inin slaym ürettiği ve *icaA* ve *icaD* genlerine sahip oldukları, ayrıca slaym üreten *S. epidermidis* ve *S. aureus* suşlarının yüzey hidrofobisitelerinin slaym üretmeyenlere göre daha fazla olduğu gösterilmiştir. Malm ve ark. (2005)'nin 71 *S. aureus* ve KNS'leri içeren sağlıklı kişilerin cilt ve nazofarenkslerinden elde edilmiş 314 stafilokok suşunda yaptığı bir çalışmada stafilokokların çoğunun alındıkları yere bakılmaksızın yoğun veya orta seviyede slaym üretme yeteneğinde olduğu ve bir önceki yayının aksine çoğunun hidrofilik hücre yüzeyine sahip olduğu, sonuç olarak da slaym üretiminin sağlıklı kişilerin çeşitli bölgelerinden izole edilen stafilokokların genel bir özelliği olduğu bildirilmiştir.

Veteriner mikrobiyolojide de stafilokok suşlarının slaym faktör oluşturma özellikleri moleküler yöntemlerle gösterilmeye başlanmıştır. Vasudeva ve ark. (2003) sığır mastitislerinden izole ettikleri *S. aureus* suşlarının biofilm oluşumunu fenotipik ve genotipik yöntemlerle incelemişlerdir. Fenotipik olarak bakterilerin slaym oluşumuna

KKA yöntemi ile bakmışlar 35 suşun 32 (%91,4)'sinde; biofilm oluşumunu mikroplyt yöntemi incelemişler, 35 suşun 24 (%68,5)'ünde pozitiflik bulduklarını; bununla birlikte genotipik olarak PZR ile ise 35 izolatin hepsinin (%100,0) *icaA* ve *icaD* genlerini içerdiklerini bildirmişlerdir. Sonuç olarak *S. aureus* suşlarında biofilm oluşumunun incelenmesinde KKA yönteminin oldukça iyi sonuçlar verdiğini bildirmekle birlikte; fenotipik ve genotipik yöntemlerin birlikte kullanılmasının daha faydalı olabileceğini vurgulamışlardır. Grinholc ve ark. (2007) 302 MRSA suşunda biofilm üretimini fenotipik ve genotipik yöntemlerle incelemişlerdir. İnceledikleri MRSA suşlarının %91'inin *icaD* genine sahip olduklarını; *icaD* geni bulunmayan suşların ise *icaA* geni taşıdıklarını bildirmişlerdir. Biofilm oluşumunu fenotipik olarak mikroplyt ve KKA yöntemleri ile incelemişler ve bu yöntemler arasında %96 oranında uyum saptadıklarını bildirmişlerir. KKA yönteminin fenotipik olarak suşların biofilm oluşturabilmelerinin belirlenmesinde Arciola ve ark. (2006)'nın bildirdikleri gibi pratik ve ucuz bir yöntem olduğunu, laboratuarlarda kolaylıkla ve güvenle kullanılabileceğini vurgulamışlardır.

1. 8. Epidemiyoloji

Stafilokoklar doğada çok yaygın olarak bulunan Gram pozitif bakterilerdir. Fizyolojik olmayan çevre koşullarına uzun süre dayanabilirler, yüksek tuz ve lipid içeren ortamlarda üreyebilirler (Bilgehan 2000). Fırsatçı patojen karaktere sahip olan bu etkenler, hayvanın stres altında kalması ve her türlü yaralanma sonucunda etkenin aktive olmasına ya da açılan portantrelerden vücuda girmesine sebep olur. İnsan ve hayvanlarda farklı klinik tablolarla seyreden hastalıklara neden olurlar. Hayvanlarda stafilokoklardan ileri gelen başlıca enfeksiyonlar; mastitis, botriyomikozis, enzootik piyemi, artrit ve gıda zehirlenmeleridir.

S. aureus enfeksiyonlarının insanlarda doğal seyri özetlenecek olursa; pekçok yenidoğan, çocuk ve yetişkinler *S. aureus* ile kolonize olurlar ve bu mikroorganizmayı tercihen nazofarenkslerinde, bazen cilt ve gysilerinde, daha nadiren vajinalarında ya da rektum ya da perineal bölgelerinde barındırırlar. Bu bölgelerdeki *S. aureus* cilt veya müköz membranlardaki herhangi bir bölgeyi kişiden kişiye transfer yoluyla, aerosol yolla veya direk kontakt yoluyla diğer konakları kontamine ederler. Müköz membranlar ve cilt, yerel doku invazyonuna karşı çok etkili bir mekanik bariyer oluştururlar. Bu bariyer incinme ya da cerrahi ile bozulursa, *S. aureus* alttaki dokuya girebilir ve nekrotik doku, fibrin ve çok

sayıda canlı ve ölü polimorfonükleer lökositten oluşan lokal bir abse lezyonuna yol açabilir. Daha sonra çoğalan bakteriler lokal fagositik mekanizmaları aşabilir ve lenfatik kanallara ve kan dolaşımına girebilirler. Bunu izleyen stafilokokal bakteriyemi korkutucu bir komplikasyondur ve metastatik infeksiyonlara ve ölüme yol açabilir (Waldvogel 2000).

1. 9. *S. aureus*'un ve Metisilin Dirençli Stafilokokların İdentifikasyonu

S. aureus'un identifikasyonunda koloni morfolojisi ve boyanma, pigment üretimi, hemoliz, mannitol fermantasyonu, yüksek tuz konsantrasyonlu ortamda üreme ve koagülaz varlığı gibi kriterler araştırılmaktadır. Kanlı agarda 24 saatte üreyen stafilokoklar beta hemoliz zonu bulunan, altın sarısı renginde koloniler oluştururlar. *S. aureus*'un bütün suşları koagülaz ve mannitol pozitifdir. Sporsuz, hareketsiz, kapsülsüz, genellikle katalaz pozitif, oksidaz negatif olup Gram pozitif boyanırlar. Fakültatif anaerob olup daha çok aerob üremeyi tercih ederler. Çoğu %7,5–10 NaCl₂ içeren basit besiyerlerinde, 18–45°C'de kolaylıkla ürer. Birçok türünde karotenoid pigment bulunabilir. Başta glikoz olmak üzere birçok karbonhidratı parçalarlar ve son ürün olarak laktik asit oluştururlar (Cengiz 1999, Bilgehan 2000).

Metisilin dirençli suşların doğru bir şekilde belirlenmesi uygun antimikrobik ilacın kullanımını sağlamak için önemlidir. İnsanlarda interstisyel nefrite yol açması nedeniyle, metisilin günümüzde klinik olarak kullanımda değildir. Sadece laboratuarlarda stafilokoklardaki beta laktam direncinin saptanmasında kullanılmaktadır. Oksasilin, metisilin direncinin belirlenmesinde diğer penisilinaza dirençli penisilinlere göre daha stabil bir molekül olması ve özgüllüğü yüksek sonuç vermesi nedeniyle Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafından fenotipik testlerde önerilmektedir (NCCLS 2003). Fakat direncin heterojen olması (koloniyi oluşturan bakterilerin çoğu metisilin düşük konsantrasyonlarına duyarlıdır, ancak 10⁵ ya da 10⁸ bakteride bir bakteri yüksek metisilin direnci gösterir), oksasilin kullanılarak yapılan duyarlılık testlerinde, dirençli ve duyarlı sonuçların ayırımında zorluklara neden olmaktadır (Swenson ve ark. 2005). Bundan dolayı sonuçların güvenilirliğini artırmak için inokulum miktarını artırmak, daha düşük sıcaklıkta inkübasyon, sodyum klorür içeren oksasilin tarama testi veya inkübasyonu uzatma gibi önerilerde bulunulmuştur (Felten ve ark. 2002). Telli ve ark. (2006) sefoksitinle yapılan disk difüzyon testinin MRSA belirleme yeteneği açısından halen kullanılmakta olan diğer yöntemlerle karşılaştırmışlar; oksasilin disk difüzyon,

sefoksitin disk difüzyon, lateks aglütinasyon ve oksasilin agar tarama testlerinin duyarlılıkları sırasıyla, %98,8, %98,3, %97,7 ve %98,8; özgüllükleri sırasıyla, %99,1, %99,1, %97,4 ve %98,3 olduğunu bildirmişlerdir. Sonuç olarak, sefoksitin disk difüzyon testi metisiline direnci belirlemede güvenilir yöntem olarak bulduklarını belirtmişlerdir.

Bir sefamisin türevi olan sefoksitin *mecA* genini diğer penisilinlere göre daha iyi eksprese ettirdiği gösterilmiştir (Swenson ve ark. 2005). Bazı araştırmacılar sefoksitin disk difüzyon testinin oksasilin disk difüzyon testinden daha yararlı olduğunu, *mecA* gen varlığı ile uyumun daha iyi olduğunu bildirmiştir (Felten ve ark. 2002, Cauwelier ve ark. 2004). CLSI antibiyotik duyarlılık testleri alt komitesi CLSI yayını M100-S15'te hem disk difüzyon hem de dilüsyon bölümlerindeki stafilokok tablosunda (Tablo 2C) sefoksitin disk difüzyon yöntemini yeni test olarak ilave etmiştir (CLSI 2005).

1. 10. Stafilokokların Antibiyotik Direnci

S. aureus epitel hücrelerine diğer bakterilerden daha fazla tutunma yeteneğindedir. Son on yılda nosokomial epidemilere yol açan mikroorganizmaların epidemiyolojisinde önemli değişiklikler olmuş ve Gram pozitif koklar ön plana geçmiştir. Epidemilerin yaklaşık yarısından fazlası MRSA suşları tarafından oluşturulmaktadır (Schaberg ve ark. 1991).

İlk semisentetik penisilinaza dirençli antimikrobiyal ajan olan metisilin 1959 yılında klinik kullanıma girmiştir. İki yıl sonra, 1961 yılında, ilk MRSA izolatları İngiltere'den bildirilmiş (Jevons 1961) ve sonradan 1960'lı yıllarda Avrupa'da ve 1970'li yıllarda ABD'de bir problem haline gelmiştir (Hartstein ve Mulligan 1986). Antibiyotiklere çoklu direnç gösteren MRSA suşları 1980'lerin sonlarında ve 1990'lı yıllarda tüm dünyaya yayılmıştır (Schmitz ve Jones 1997).

Stafilokoklarda esas sorun son yıllarda giderek artan oranlarda görülen metisilin direncidir. Direnç bir bakterinin β -laktam grubu veya hücre duvarı sentezini inhibe eden diğer antibiyotiklerin öldürücü, çoğu zaman litik etkisine karşı ölüm oranlarının azalması olarak açıklanmıştır. Klinik materyallerden izole edilen Stafilokok suşlarının %85-90'ı ve toplumdan izole edilenlerin yaklaşık o kadarı oluşturdukları beta laktamaz nedeniyle penisiline direnç kazanmışlardır. Bunların yanında metisilin, oksasillin, nafsillin gibi beta laktamaza dirençli penisilinlere karşıda gittikçe artan oranda direnç kazanmaktadırlar.

Dünya çapında sık görülen bakterilere karşı direnç olayı hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde artmıştır (Akalin 1994).

Bakteriler tarafından üretilen beta laktamaz, beta laktam grubu antibiyotiklere (penisilin G ve ampisilin gibi) bağlanarak onları hidrolize eden ve bu yolla bakteriyel dirence neden olan enzimdir. Bu tür direnç beta laktam antibiyotiklerin beta laktamaz inhibitörleri ile kombine edilmesiyle ortadan kaldırılabılır (Ünal ve Akhan 1996).

Metisilin dirençli stafilokoklar metisilin duyarlı stafilokoklardan farklı olarak *mecA* genine sahiptir. Bu gen, β -laktamaz dirençli antibiyotik grubundaki metisilin, oksasillin gibi antibiyotiklere düşük ilgi gösteren penisilin bağlayan protein PBP2a'nın sentezlenmesinden sorumludur (Hartman ve Tomas 1984). MRSA izolatları PBP2a üretir. PBP2a beta laktamlara düşük afinitelidir ve bu nedenle beta laktam antibiyotiklerle karşılaştığında, beta laktam antibiyotiği bağlayamaz ve hücre duvar sentez fonksiyonunu sürdürür (Chambers 1997).

Özellikle metisilin dirençli *S. aureus* önemli bir hastane patojenidir. Bazı MRSA suşları hızla yayılabilme kapasitesine sahiptir. Bu suşlar yayılma kapasitesi olmayan diğer MRSA suşlarından ayırt edilebilmek için epidemik olarak tanımlanmaktadır. MRSA suşlarının bir ortamdan başka ortama transferi canlı veya cansız çevre aracılığı ile olur ve genellikle temas yolu ile bulşır (Köksal 1992).

Toplum kökenli (TK) MRSA olarak tanımlanan infeksiyöz etkene bağlı hastalıkların insidansında bir artış olduğu bildirilmekte, hatta bazı ülkelerde TK MRSA'ya bağlı salgınlar yaşanmaktadır. Başlangıçta TK MRSA'nın hastane kökenli (HK) olduğu ve hastane dışına taşarak topluma yayıldığı düşünülmüş olsa da, yapılan klinik ve moleküler çalışmalar sonucunda, durumun böyle olmadığı anlaşılmıştır (Hiramatsu ve ark. 2002, Ünal 2006). HK MRSA suşları çoklu ilaca dirençli, klonal ve bazı risk faktörlerinin varlığıyla ilişkiliyken, TK MRSA az sayıda ilaca dirençli ve daha sıklıkla da poliklonaldır. Aslında hem TK MRSA hem de HK MRSA suşları içinde *mecA* geni bulduran stafilokokkal kromozom *mec* (*SCCmec*) gen kaseti taşıyor olsa da, bunların büyüklükleri ve kökenleri çok farklıdır (Hiramatsu ve ark. 2002).

S. aureus suşlarında şu ana değin saptanmış beş SCC*mec* tipi vardır. Gen elemanları boyut, içerik ve antimikrobiyal direnç ekspresyonu açısından farklılık gösterir. SCC*mec* tip I, II ve III esas olarak hastanede kazanılmış metisilin dirençli *S.aureus* suşlarında bulunur. Bunlar plasmid veya transpozabl genetik elemanlar üzerinde taşınır. SCC*mec* tip II ve III çoklu beta-laktam dışı antimikrobiyallere dirence neden olurlar. SCC*mec* tip IV ve V tipik olarak toplumda kazanılmış metisilin dirençli *S. aureus* suşlarında bulunur. Bu SCC*mec* tiplerinin boyutları daha küçüktür ve diğer çoklu ilaç direnç genlerini taşımazlar (Ünal 2006).

1. 11. Tedavi

Stafilokoklar antibiyotiklere çabuk direnç geliştirdiklerinden, uygun antibiyotiğin seçimi için antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması gereklidir. Antibiyotiklere direnç gelişimi özellikle *S. aureus* suşlarında daha çok görülmektedir (Cengiz 1999). 1940'lı yılların başlarında penisilin G stafilokok infeksiyonlarında başarı ile kullanılmış, ancak bu yılların sonunda penisilin G'ye dirençli suşlar izole edilmeye başlanmıştır. Penisilin G günümüzde, *S. aureus* suşlarının çoğunun beta laktamaz üretmeleri nedeniyle stafilokokal infeksiyonların tedavisinde kullanılamaz duruma gelmiştir. *S. aureus* suşlarının tümü 1951'de eritromisine duyarlı iken, 6 ay kadar sonra bu antibiyotiklere karşı da direnç gelişmiştir. Metisiline dirençli *S. aureus* suşlarının çoğu, başta diğer beta laktam antibiyotikler olmak üzere, aminoglikozidlere ve tetrasikline de dirençlidirler (Cengiz 1999).

Stafilokokların neden olduğu mastitislerin tedavisinde istenilen sonuçların alınamaması stafilokoklara karşı yeni ve etkili antibiyotiklerin gerekliliğini ortaya koymuştur. Stafilokok infeksiyonlarına karşı β -laktam (penisilin ve sefalosporin) grubu antibiyotikler kullanılmaktadır. Ancak, stafilokoklar artık β -laktam grubu antibiyotiklere karşı direnç kazanmakta ve antibiyotiği etkisiz hale getiren β -laktamaz enzimi sentezlemektedirler (Watts ve Salmon 1997). Mastitisli sütlerden izole edilen stafilokoklarda β -laktamaz aktivitesi tespit edilmiştir (Jones ve Health 1985). Stafilokok infeksiyonlarının tedavisinde penisilin ve sefalosporinler gibi β -laktam antibiyotiklere göre β -laktamazlara dayanıklı olan antibiyotikler (sefoksitin, metisilin, oksasilin, kloksasilin) geliştirilerek hem beşeri hem veteriner sahada kullanıma girmiştir (Ünal ve Akhan 1996).

Fakat son otuz yılda metisiline dirençli suşların gelişmesi stafilokokal infeksiyonların tedavisinde tüm dünyada önemli sorun olmuş bu infeksiyonlarda tedavi, başarı oranını düşürmüştür.

Günümüzde *S. aureus* infeksiyonlarında kullanılan başlıca antibiyotikler arasında en önemlilerinden birisi penisilinaza dirençli penisilinler (antistafilokokal penisilinler: metisilin, nafsilin) ve izoksazolil penisilinler (kloksasilin, dikloksasilin, flukloksasilin ve oksasilin) bulunmaktadır. Beta laktam antibiyotikler bakteri hücre duvarında yer alan penisilin bağlayıcı proteinleri (PBP) inhibe ederek etkilerini göstermektedir. Metisiline duyarlı ve dirençli stafilokoklar arasındaki temel fark PBP'lerdedir. Metisilin direnci PBP 2 ya da 2a denen proteinin varlığına bağlıdır. Bu protein duyarlı suşlarda bulunmamaktadır. Direncin nedeni olan 2a'yı kodlayan gen kromozomal DNA üzerinde "mec" olarak adlandırılan bölgededir. PBP'lerde oluşan değişikliklerle meydana gelen metisilin direnci, beta laktamlara genel direncin ifadesidir. Bu nedenle metisiline dirençli stafilokoklarla oluşan infeksiyonların tedavisinde beta laktam antibiyotikler önerilmemektedir (Witte 1999).

1. 12. Mastitis

Mastitis meme salgı dokusu veya bağ dokusunun zarar gördüğü, süt veriminin çeşitli oranlarda azalmasına ya da tamamen kesilmesine ve süt kalitesinin değişmesine neden olan bir meme yangısı olup, yetiştiricilik yönünden büyük önem taşımaktadır. Mastitisli ineklerden sağılan sütlerde bulunan etkenler, temiz sütlerle karışınca bunların da kontamine olmasına ve bozulmalarına yol açarak büyük ekonomik kayıplara neden olurlar (Costa ve ark. 1995). Mastitisli sütlerin halk sağlığı açısından da önemi büyüktür. Birçok zoonozlar insanlara bu yolla geçebilir. Mastitise bağlı olarak görülen ekonomik zararlar sütün atılması, tedavi gideri, veteriner hekim ücreti, mastitisin şekillendiği laktasyon ve takip eden sonraki laktasyondaki süt veriminin düşmesi şeklinde sıralanabilir (Schroeder 1997).

Mastitisler etiyolojilerine göre kontagiyöz (*S. aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis*, *Corynebacterium bovis*), çevresel (*S. uberis*, *S. dysgalactiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Enterobacter aerogenes*), fırsatçı (*S. aureus* dışındaki diğer stafilokok türleri) ve diğer etkenler (*Pseudomonas aeruginosa*,

Actinomyces pyogenes, *Nocardia* spp.) olmak üzere dört grupta incelenirler (Myllys ve ark. 1998, Baştan 2002).

Mastitisler, klinik olarak belirgin bozukluk gösterdikleri gibi (klinik mastitis), farkedilmeyecek kadar hafif (subklinik mastitis) olarak da seyredebilirler. Subklinik mastitisler çoğunlukta olup, klinik olarak farkedilemeyen ancak sütte hücre sayısının artması ve patojen etkenlerin izolasyonu ile teşhis edilebilen, infeksiyöz etkenleri taşıyan ve yayan bir kaynak durumundadır (Schoeder 1997, Bradley 2002). Subklinik mastitisler yaygınlıkları ve işletmelerde süt verimindeki düşüğe bağlı olarak meydana getirdiği ekonomik kayıplar açısından klinik mastitislerden daha önemlidir (Baştan 2002).

Klinik mastitisler fiziksel muayene ile tanınırlar. Genellikle herhangi bir laboratuvar muayenesine gerek kalmaz. Laboratuvar tanı yöntemlerinden bakteriyel kültür ancak etkili antibiyotik seçimi için yapılabilir (Baştan 2002). Subklinik mastitislerin teşhisinde kimyasal ve mikrobiyolojik birçok test kullanılmakla birlikte sütün ml'sindeki somatik hücre sayısının (SHS) belirlenmesini esas alan testler son yıllarda daha da önem kazanmıştır. Subklinik mastitis bir sürü problemdir ve yayılması ile bir bütün olarak değerlendirilir. Süt ineklerinin en az %50'si bu şekilde subklinik mastitis yönünden pozitif sonuç verebilirler. Sütün muayenesi ile lökosit sayısı, dolayısıyla sütteki SHS'nin belirlenmesi, meme bezleri ve hayvan sağlığı hakkında bilgi verir. Meme sağlığının korunmasında, sütteki somatik hücre sayısı bundan dolayı önemlidir (Alaçam 1988).

Özellikle subklinik mastitislerde somatik hücre sayılarının belirlenmesi iyi bir tanı yöntemidir. Somatik hücre sayısı (SHS)'nin belirlenmesinde California Mastitis Test (CMT) ya da White Side Test (WST) gibi indirekt yöntemler ile birlikte mikroskopik somatik hücre sayısı, Fossomatik ve Coulter Counter gibi direkt yöntemler kullanılmaktadır (Baştan 2002). CMT mastitisli sütlerde DNA içeriğini, dolayısıyla da somatik hücre içeriğini ölçen basit ve güvenilir bir yöntemdir (Schalm ve Noorlander 1957).

Ülkemizde mastitisten kaynaklanan yıllık ekonomik zararın 41,5 milyon TL dolayında olduğu, buna karşın etkin bir mastitis kontrol programı için harcanan her 1 TL'nin 5 TL olarak üreticiye geri döneceği düşünüldüğünde (Tekeli 2005), mastitise yol açan etkenlerin bilinmesi ve gerekli önlemlerin alınmasını; kaliteli süt üretiminin önündeki

engellerin aşılmasında en önemli adımlar olarak değerlendirmek mümkündür (Atasever ve Erdem 2008).

Hem yurdumuzda hem de dünyada mastitise neden olan stafilokokların izolasyonuna yönelik çalışmalar yapılmış ve yöresel olarak farklı oranlar elde edilmiştir. *S. aureus*'un ülkemizde yapılan önceki çalışmalarda izolasyon oranı Aydın ilinde %28,3 (Kırkan ve ark. 2005) , Afyon ilinde %40,1 (Kuyucuğlu ve Uçar 2001) , Burdur ilinde ise %43 (Türütoğlu ve ark. 2006) olmuştur. Türütoğlu ve ark. (2006) Burdur ilindeki mastitisli süt örneklerinde %31,1 oranında KNS izole ederken Aydın ilinde KNS'lar %20 oranında bulunmuştur (Kırkan ve ark. 2005). Bademkırın ve ark. (2005), bir süt işletmesinde mastitisli Holştayn ırkı inekler üzerinde yaptıkları bir çalışmada, %47,5 *S. aureus*, %15,3 *S. epidermis*, %3,4 *S. agalactie*, %10,2 *S. dysgalactiae*, %5,1 *S. uberis*, %5,1 *C. pyogenes*, %8,5 *E. coli* ve %5,1 ise hiçbir etken üremesinin olmadığını bildirmişlerdir. Bayar (2007) 221 subklinik mastitisli süt örneğinden izole ettiği bütün stafilokok türlerinin KNS (*S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. auricularis*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. cohnii*, *S. xylosum*, *S. epidermidis* ve *S. sciuri*) olduğunu bildirmiştir. Yapılan çalışmalarla KNS'ların mastitis olgularında eskiden kabul edildiği gibi zararsız etkenler olmadığı görülmüştür (Taponen ve Pyorola 2009).

Metisilin dirençli stafilokoklar tedavisi güç, morbidite ve mortalitesi yüksek infeksiyonlara yol açarlar (Leonard ve Markey 2008). MRSA günümüzde en önemli hastane kaynaklı etkenlerden birisi olmakla birlikte (Morgan 2008); yurdumuzda hayvanlarda MRSA suşlarının varlığı hakkında az sayıda çalışma bulunmaktadır (Ak ve ark. 2000, Kireççi ve Çolak 2002, Güler ve ark. 2005, Kırkan ve ark. 2005, Türkyılmaz ve ark. 2009). Ayrıca yurdumuzda hayvan orjinli stafilokok suşlarında metisilin direnci ve önemli bir virulans faktörü olan slaym üretiminin birlikte incelendiği bir çalışma şu anki bilgilerimize göre bulunmamaktadır. Bu çalışmada, Aydın yöresi Umurlu ilçesinde sığır mastitislerine neden olan aerobik bakteriyel etkenlerin belirlenmesi, izole edilen stafilokok suşlarında metisilin direncinin ve slaym oluşumunun incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2. 1. GEREÇ

2. 1. 1. Süt örnekleri: Bu çalışmada Aydın ili Umurlu ilçesinde, 2008 Ocak–2009 Nisan tarihleri arasında 23 sığır işletmesinden (her sürüden 5–16 örnek) hepsi laktasyon döneminde olan, son üç ayda antibiyotik tedavisi almamış, en az bir doğum yapmış, 3–9 yaşlı, Holştayn ırkı, fiziksel muayenede anormallik bulunan (meme loblarında: şişkinlik, sıcaklık, ağrı, kızarıklık yada sütte: sulu, kanlı, pıhtılı v.s.) ve CMT ile pozitif reaksiyon (1+, 2+, 3+) veren 152 sağmal inekten alınan 339 mastitisli süt örneği araştırma materyali olarak kullanılmıştır.

2. 1. 2. Besiyerleri, Ayıraçlar, Solusyonlar ve Antibiyotik Diskleri

2. 1. 2. 1. İzolasyon, İdentifikasyon, Antibiyogram, Slaym Faktör Tespiti İçin Kullanılan Besiyerleri

2. 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 koyun kamı ilave edilmiştir.

2. 1. 2. 1. 2. MacConkey Agar (MCA) (Oxoid CM 7)

MacConkey Agar.....	50 g
Distile su.....	1000 ml

Karışımın pH'sı 7,2–7,4'e ayarlanmış, onbeş dakika otoklav edildikten sonra, 50°C'ye kadar soğutulup petrilere dökülmüştür.

2. 1. 2. 1. 3. Mannitol Salt Phenol Red Agar (Merck 1.05404)

Mannitol Salt Phenol Red Agar.....	108 g
Distile su.....	1000 ml

Karışımın pH'sı 7,2–7,4'e ayarlanmış, onbeş dakika otoklav edildikten sonra, 50°C'ye kadar soğutulup petrilere dökülmüştür.

2. 1. 2. 1. 4. Nutrient Broth (NB) (Oxoid CM 0067)

Nutrient Broth.....	8 g
Distile su.....	1000 ml

Karışımın pH'sı 7,2–7,4'e ayarlanmış, beş ml miktarda tüplere dağıtıldıktan sonra 121°C'de onbeş dakika otoklav edilmiştir.

2. 1. 2. 1. 5. Tripotone Soya Broth-TSB (Oxoid CM 129)

Nutrient Broth.....	8 g
Distile su.....	1000 ml

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

2. 1. 2. 1. 6. Lassen'in Üçlü Tüp Besiyeri

Gram negatif mikroorganizmaların identifikasyonunda kullanılmıştır (Lassen 1975). Hazırlanan besiyerleri şunlardır:

2. 1. 2. 1. 6. 1. Glikoz-Laktoz-H₂S Besiyeri

Pepton	20 g
Laktoz	10 g
Glikoz	1 g
Sodyum tiyosülfat.....	0,2 g
Ferro amonyum sülfat.....	0,3 g
NaCl.....	6 g
Agar.....	17 g
Fenol red (%0,2'lik).....	12,5 g
Distile su.....	1000 ml
pH: 7,6	

Karışım kaynatıldıktan sonra 7–8 ml miktarında vida kapaklı tüplere dağıtılarak 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Sterilizasyondan sonra tüpler 15–20 derecelik eğimli bir yüzeyin üzerine konularak besiyerinin katılaşması beklenmiştir.

2. 1. 2. 1. 6. 2. Mannitol-Hareket Besiyeri

Pepton	5 g
Neopepton.....	5 g
Mannitol.....	2 g
Agar.....	2,5 g
Potasyum nitrat.....	1,7 g
Fenol red (%0,2'lik).....	20 g
Distile su.....	1000 ml
pH: 7,6	

Karışım kaynatılıp 5–6 ml miktarında tüplere dağıtıldıktan sonra 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

2. 1. 2. 1. 6. 3. Üre-İndol Besiyeri

L-triptofan.....	0,3 g
Potasyum dihidrojen fosfat.....	0,1 g
Dipotasyum hidrojen fosfat.....	0,1 g
NaCl.....	0,5 g
Üre.....	0,2 g
Etanol (% 95'lik).....	1 ml
Fenol red (%0,2'lik).....	12,5 g
Distile su.....	1000 ml
pH: 7,6	

Karışım iyice kaynatıldıktan sonra filtre edilerek bir ml miktarında steril tüplere dağıtılmıştır.

2. 1. 2. 1. 7. Mueller-Hinton Agar (MHA) (Oxoid CM 129)

Mueller-Hinton Agar.....	38 g
Distile su.....	1000 ml
pH: 7,3±0,2	

Besiyeri 38 g olacak şekilde distile su içinde kaynatılarak eritilip, otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilip otoklav sonrası 45–50°C'a soğutulup steril petri kutularına 12,5'er ml dökülmüştür.

2. 1. 2. 1. 8. Kongo Kırmızılı Agar

Slaym faktör varlığı Kongo Kırmızılı Agar (KKA) yöntemi ile (Fremeen ve ark. 1989) incelenmiştir. KKA aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır:

A. Brain Heart Infusion Agar (BHIB) (Oxoid)	37 g
Distile su.....	800 ml
B. Kongo Kırmızısı.....	0.8 g
Distile su.....	100 ml

C. Sukroz.....	50 g
Distile su.....	100 ml
pH: 7,2	

Besiyeri ve kongo red boyası distile suda eritilerek ayrı ayrı olarak hazırlanmış ve 121°C’de 15 dakika otoklavlanmıştır. Otoklavdan çıkarıldıktan sonra besi yeri ve boya solusyonu karıştırılmış, sukroz 0,22 µm por çaplı filtreden süzülerek sterilize edilmiştir. Besi yeri ve boya karışımı yeterince soğuduktan sonra (55°C) bu karışıma ilave edilmiştir. Daha sonra hazırlanan bu besi yeri steril plastik petrilere dökülmüştür.

2. 1. 2. 2. Ayıraç ve Solusyonlar

2. 1. 2. 2. 1. Kovaks Ayırıcı

P-Dimetilaminobenzaldehyt.....	10 g
Izoamilalkol.....	150 ml
HCL.....	50 ml (Bilgehan 1992).

Hazırlanan ayıraç indol testinde kullanılmıştır.

2. 1. 2. 2. 2. Lizis solusyonu

Bakteriyel DNA ekstraksiyonu amacı ile kullanılan lizis solusyonu aşağıdaki gibi hazırlanmıştır:

Lysozyme (5000 units ml ⁻¹).....	0,5 ml
Lysostaphin (500 units ml ⁻¹).....	0,5 ml
EDTA (0,5 M).....	0,2 ml
Tris (1M).....	0,1 ml
De-iyonize su.....	8,7 ml (Anonim 4).

2. 1. 2. 3. Kullanılan Antibiyotik Diskleri

Antibiyotik direncinin belirlenmesinde Oxoid marka ampisilin (Amp; 10 µg), amoksisilin klavulanik asit (Amc; 30 µg), neomisin (N; 30 µg), penisilin (P; 10 IU), gentamisin (Cn; 10 µg), enrofloksasin (Enr; 5 µg), sefoperazon (Cfp; 30 µg), tetrasiklin (Tet; 30 µg), vankomisin (Van; 30 µg), sefoksitin (Fox; 30µg) disklerden yararlanılmıştır.

2. 1. 3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Elektroforez

2. 1. 3. 1. Kullanılan Cihazlar

PZR için Eppendorf MasterCycler gradient, 96 örnek kapasiteli termal döngüleme cihazı kullanılmıştır.

2. 1. 3. 2. Primerler

Staphylococcus türlerinde 16S rRNA genini çoğaltmak için universal primerler olan S16S20 (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') ve 16S1390 (5' GAC GGG CGG TGT GTA CAA 3') kullanılmıştır (Sghir ve ark. 1998, Suau ve ark. 1999).

2. 1. 3. 3. MgCl₂, Taq DNA Polymerase, 10X Taq Buffer, dNTP Set

Sigma marka 25 mM MgCl₂, Taq DNA polimeraz (5U), 10X Taq Buffer (100 mM (Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl), fermentas marka 100mM dNTP set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) kullanılmıştır.

2. 1. 3. 4. Etidyum Bromür

Sigma marka %1'lik Ethidium Bromür kullanılmıştır.

2. 1. 3. 5. Marker

Marker olarak PstI enzimi ile kesilmiş Fermentas marka lambda faj DNA'sı kullanılmıştır.

2. 1. 3. 2. Elektroforez

2. 1. 3. 2. 1. Elektroforez İçin Kullanılan Gereçler

6X Loading Dye solusyonu,
PZR ürünü (DNA),
3 µl DNA ladder,
1 gr agaroz,

Agaroz jel ve elektroforez tankında yürütme yapmak için; 100 ml. TBE ve 500 ml. (Tris-Borik Asit-EDTA) buffer kullanılmıştır.

2. 1. 3. 2. 2. Agarose Jel Hazırlanışı (%1'lik)

Önce TBE Stok Solusyon Tamponu (Tris, Borik Asit, EDTA, 10x, pH: 8,0) hazırlanmıştır.

TBE buffer:

Tris Base.....	121,10 g
Borik Asit	61,83 g
EDTA	5,84 g

Distile su ile hacim 1000 ml'ye tamamlanarak; pH 8'e ayarlanarak buzdolabında saklanmıştır.

Agaroz Jel:

Agarose (Sigma)	1 g
TBE (0,5x)	100 ml

Buffer, şişe içerisindeki agarozun üzerine ilave edilerek, karıştırılmış ve sonra mikrodalga fırında yaklaşık 3–5 dk. kaynatılan karışım, 40–50°C'ye kadar soğutulmuştur. Halen sıvı halde olan karışım, jel kalıbının içerisine yavaşça, kabarcık bırakmayacak şekilde dökülmüş ve içerisine yükleme kuyucuklarını oluşturacak olan taraklar

yerleştirilerek, 15–20 dakika oda ısısında soğumaya bırakılmıştır. Soğutulan jel, kalıptan çıkarılarak, elektroforez tankına dikkatlice yerleştirilmiştir.

2. 2. YÖNTEM

2. 2. 1. Örneklerin Alınması: Her örnek alınırken, meme başları tek kullanımlık kağıt havluya dökülen %50 oranında seyreltilmiş iyodin çözeltisi ile dezenfekte edildi, daha sonra %70'lik alkol ile yeniden temizlenmiştir. Eller de dezenfekte edildikten sonra eldiven giyilip meme başındaki saprofit bakterileri uzaklaştırmak için ilk birkaç ml süt atılmıştır. Meme loblarından ayrı ayrı 45 derecelik eğimle tutulan 5 ml hacmindeki steril enjektörler içine (Baştan 2002) alınan süt örnekleri soğuk zincir altında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına getirilip incelenmiştir.

2. 2. 2. Mikroorganizma İzolasyonu: Laboratuara getirilen örneklerden %7 koyun kanlı agara manitol salt agara ve MacConkey agara ekilip 37°C'de 24–48 saat inkube edilmiş daha sonra izolasyon besiyerlerinde üreyen mikroorganizmaların makroskopik olarak koloni morfolojileri, pigment ve hemoliz özellikleri, mikroskopik olarak Gram boyanma özellikleri incelenmiştir.

2. 2. 2. 1. Gram Negatif Mikroorganizmaların İdentifikasyonu

Gram negatif olan suşların önce oksidaz özellikleri incelenmiş daha sonra oksidaz pozitif ve negatif olan suşlardan Lassen'in üçlü tüp besi yerine geçilerek izole edilen suşların identifikasyonları standart biyokimyasal yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Koneman ve ark 1997).

Oksidaz Testi

Gram negatif mikroorganizmaların oksidaz aktiviteleri, oksidaz diski (Bacto 1633–35–2) ile ölçülmüştür. Şüpheli bakterinin 18–24 saatlik saf kültüründen platin öze ile alınan koloniler oksidaz diskine yayılarak sürülmüş; 25–30 saniye içinde diskin pembe–mor bir renk “pozitif”, renk değişikliğinin olmaması “negatif” olarak değerlendirilmiştir (Bekar 1997).

Gram negatif bakterilerin 18–24 saatlik saf kültürlerinden, bir koloni alınarak Nutrient broth'a pasaj yapılmış ve 37°C'de 24 saat inkube edilmiştir. Bu süre sonunda üreyen mikroorganizmalar, identifikasyon için Lassen'in üçlü tüp besi yerine ekilmişlerdir.

2. 2. 2. 1. 2. Lassen'in Üçlü Tüp Besiyerinde İncelenen Biyokimyasal Özellikler

Besiyerlerine saf kültürden ekim yapılmıştır. Ekim yapılan tüpler 37°C'de 18–24 saat inkübasyona bırakılmış, inkübasyon süresi sonunda aşağıdaki testler yönünden incelenmiştir.

Tüp 1

a. Glikoz fermantasyonu: Besiyerinin normal portakal kırmızısı rengin tüpün dip kısmından başlayarak sarıya dönüşmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir.

b. Laktoz Fermantasyonu: Besiyerinin eğik yüzeyinin kırmızıdan sarıya dönüşmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir.

c. H₂S Oluşumu: Besiyerinde yüzeyden başlayıp derine doğru ilerleyen siyahlaşma ile tanımlanmıştır.

d. ONPG Testi: Besi yerinin yüzeyinden alınan bir öze dolusu kültür 0,25 ml fizyolojik tuzlu su ile süspansiyon edilmiş; bunun üzerine 0,25 ml ONPG solüsyonu ilave edilmiş ve 37°C lik etüvde 30 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda sabit sarı rengin oluşması pozitif olarak değerlendirilmiştir.

e. Lizin Dekarboksilaz Oluşumu: Besi yerindeki kültür üzerine 1 ml 5/N NaOH ve 2 ml kloroform katılmıştır. Yavaşça çalkalanıp ve çökmeye bırakılmıştır. Bir süre beklendikten sonra tüpün dibindeki berrak bölgeden 0,5 ml alınıp ufak bir tüpe aktarılmıştır. Bu sıvının üzerine eşit miktarda ninhidrin (kloroformda %1 oranında eritilmiş) ilave edilmiş ve on dakika oda ısısında bekletilmiştir. Menekşe renginin oluşması pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Tüp 2

a. Mannitol Fermentasyonu: Besiyerinin normal kırmızı renginin sarıya dönüşmesi ile belirlenmiştir.

b. Nitrat Redüksiyonu: Besiyerindeki kültür üzerine A ve B indikatörlerinden (A indikatörü; 1 gr sülfanilik asit + 100 ml N asetik asit, B indikatörü; 0,6 N alfa-naftilamin + 100 ml N asetik asit) 4'er damla damlatılmıştır. Nitratın nitrite indirgenmesi besi yerinin kırmızıdan kahverengiye dönüşmesiyle belirlenmiştir.

c. Hareket: Hareketsiz suşlar besiyerinin tam ortasında inokulasyon hattı boyunca sınırlı bir üreme gösterdikleri halde, hareketli suşların besi yerinde homojen bir bulanıklığın oluşmasına neden olduğu görülmüştür.

Tüp 3

a. Üreaz Oluşumu: Besiyeri renginin inkubasyon periyodu sonunda sarıdan kırmızıya dönüşmesiyle belirlenmiştir.

b. İndol Oluşumu: İnkubasyon süresi sonunda besi yerinin üzerine 0,5 ml Kovaks ayırıcı ilave edilmiş; indol pozitif suşların besi yerinin üzerinde kırmızı, negatif suşların sarı bir halkanın oluşmasına sebep olduğu görülmüştür.

c. Triptofan Deaminaz Deneyi: İndol deneyi yapılmadan önce 5 damlabesi yeri bir pipet yardımıyla steril bir aglutinasyon tüpüne aktarılmıştır. Üzerine bir damla % 10'luk FeCl₃ ilave edilmiş; enzim oluşumu besiyerinin normal sarı renginin 3–5 dakika kiremit kırmızısı rengine dönüşmesine sebep olmuştur.

Diğer Testler

Metil Red (MR) – Voges Proskauer Testi (VP): MR buyyona taze kültürden bir öze dolusu ekim yapılmış ve 37°C de 2–7 gün inkubasyona bırakılmıştır. Üretilen kültürden bir kısım alınarak üzerine 4–5 damla metil red solüsyonundan damlatılmıştır. Kırmızı renk oluşumu MR pozitif olarak değerlendirilmiştir. Kültürün kalan kısmına 3 ml

% 5'lik alfaftol solüsyonundan ilave edilerek karıştırılmıştır. Bunun üzerine % 40'lık KOH çözeltisinden bir ml ilave edilmiş ve 2–5 dakika içerisinde pembe renk oluşumu VP pozitif olarak değerlendirilmiştir (Bekar 1997).

2. 2. 2. 2. Gram Pozitif Mikroorganizmaların İdentifikasyonu

2. 2. 2. 2. 1. Streptococcaceae ve Micrococcaceae Familyalarının Ayrımı: Gram pozitif kok morfolojisine sahip olan *Streptococcaceae* ve *Micrococcaceae* familyasındaki etkenleri ayırd edebilmek için katalaz testi uygulanmıştır. Bu test için besiyerinde üreyen kolonilerden steril öze ile alınıp temiz bir lam üzerine aktarıldıktan sonra üzerine 1–2 damla %3'lük H₂O₂ damlatılmıştır. Katalaz enzimi oluşturan bakteriler H₂O₂'i 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* spp. katalaz negatif, *Micrococcaceae* familyasındaki *Micrococcus* spp. ve *Staphylococcus* spp. ise pozitifdir.

2. 2. 2. 2. 2. Staphylococcus ve Micrococcus Türlerinin Ayrımı: Katalaz pozitif mikroskopik olarak Gram pozitif kok görünümündeki mikroorganizmalar *Micrococcaceae* grubunda kabul edilmişlerdir. Bu suşlardan tek bir koloni TSB'da üretildikten sonra MHA'a ekim yapılmış ve ekim bölgesinin üzerine basitrasin diski (Oxoid, 0,04U/ml) yerleştirilmiştir. 37°C'de 18–24 saat inkübe edildikten sonra basitrasine dirençli suşlar *Staphylococcus* spp. olarak ayrılmıştır (Koneman ve ark 1997). Elde edilen suşlar koagulaz testi yapıldıktan sonra sekans analizinde kullanılmak üzere %20 gliserinli brain heart infusion broth içerisinde -20°C'de saklanmıştır.

2. 2. 2. 2. 3. Koagulaz Pozitif ve Negatif Stafilokokların Belirlenmesi: Çalışmada, kullanılan bakterilerin koagulaz testleri lamda ve tüpte gerçekleştirilmiş ve her ikisinde de benzer sonuçlar alınmıştır. Tüp ve lam koagulaz testleri aşağıdaki şekilde yapılmıştır:

Tüp Koagulaz Testi: Steril bir deney tüpü içerisine 0,8 ml serum fizyolojik ve 0,2 ml EDTA'lı tavşan plazması (Bactident Coagulase, 1.13306.0001 Merck) eklenmiş; kanlı agarlı petri üzerinde 24 saat inkübasyon sonrası oluşan bir koloni, öze ile alınıp plazma

içerisinde ezilerek emülsifiye edilmiştir. 37°C'deki benmaride bırakılarak 1, 2, 4, 8 ve 24. saatlerde pıhtının oluşması gözlemlenmiştir. *S. aureus* gibi koagulaz enzimine sahip türlerin kan plazmasını koagüle etmesi sonucunda test tüpünde katılaşma meydana gelirse, test sonucu koagulaz pozitif, katılaşma meydana gelmiyorsa koagulaz negatif olarak değerlendirilmiştir.

Lam Koagulaz Testi: Tavşan plazmasından bir damla alınarak lam üzerinde *Staphylococcus* kültürü ile karşılaştırılmış, test "clumping faktör" denilen kümeleşme meydana geldiği görüldüğünde pozitif, kümeleşme olmadığında ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Bilgehan 1992, Koneman ve ark. 1997).

2. 2. 3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Sekans analizine gönderilecek olan stafilokok suşlarının 16S rRNA genleri universal primerler kullanılarak PZR ile çoğaltılmış; PZR için öncelikle izole edilen suşlardan kromozomal DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir.

2. 2. 3. 1. Kromozomal DNA Ekstraksiyonu

Staphylococcus türleri için kullanılan DNA ekstraksiyon işlemi aşağıdaki gibi yapılmıştır (Anonim 4):

1. Kanlı agarda saf üretilen taze kültürden bir öze alınarak 100 µl lysis solusyonu içerisinde süspanse edildi.
2. Süspanسیونlar 37°C 30 dakika inkübe edildi.
3. Thermal blokda 95°C'de 10 dak bekletildi.
4. Tüpler buz üzerine alındı. 1 ml phenol/chloroform isoamyl alcohol (25:24:1) ilave edildikten sonra iyice karıştırıldı.
5. 13 000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi.

6. Üstte toplanan bulutsu tabaka başka bir ependorf tüpüne alındıktan sonra üzerine soğuk 1 ml ethanol eklendi.

7. -20°C'de yarım saat beklendikten sonra 13 000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi.

8. Üst sıvı atıldıktan sonra pelet etüvde kurutuldu daha sonra üzerine 50 µl steril distile su eklenerek PZR'da kullanıldı.

2. 2. 3. 2. Master Mikslerin Hazırlanması

Herbir PZR amplifikasyonu 30 µl toplam hacimde, 2 µl hedef DNA, 0,2 mM deoksinükleotid trifosfat (dNTP), 2 mM magnesium klorür (MgCl₂), 0,4 pmol primer (her biri için), ve 3 µl 10X Taq enzimi tampon çözeltisi, 1,5 U Taq DNA polymerase kullanılmıştır. Kullanılan malzemeler ve volümler aşağıdaki Tablo 2.1.'de belirtilmiştir.

Tablo 2. 1. Mastermiksin hazırlanma oranları

Malzeme (Ticari)	İstenen Volüm	Kullanılacak Son Volüm
Buffer (10X)	1 X	300 µl
MgCl ₂ (25mM)	2 mM	240 µl
dNTP (10mM)	0,2 mM	60 µl
Primer - F (100 pMol)	0,4 pMol	12 µl
Primer - R (100 pMol)	0,4 pMol	12 µl
Taq Polimeraz	0,3 µl / 50 µl	18 µl
dH ₂ O	Son Volüme Tamamlanır	2358 µl
TOPLAM	-	3000 µl

*Tüpteki son volüm 30µl olması gerektiğinden ve 100 örnek hazırlamak için: 30 X 100 = 3000 µl olmalıdır. Ancak bir ependorf tüpü, en fazla 1500 µl alabildiği için; volümler 1500'er µl olarak, 2 defa hazırlanmıştır.

2. 2. 3. 3. 16S rRNA Geninin PZR ile Çoğaltılması

Mastermiks hazırlandıktan sonra ardından 0,2 mL'lik tüpler, örnek adedi kadar numaralandırılıp, içlerine 28'er µl hazırlanılan mastermiksdan ilave edilmiştir. Daha sonra, ekstraksiyonu yapılan DNA'dan 2'şer µl alınıp, ilgili tüplerin içerisine eklenmiş ve ağızları sıkıca kapatılmıştır. Hazırlanan tüpler daha sonra termal döngüleme cihazlarına yüklenip, programlanmıştır. Program 94°C'da 10 dakikalık denatürasyonu takiben 35 siklus 94°C 1 dakika, 50°C 1 dakika ve 72°C 1 dakikada tamamlandıktan sonra, 72°C'de 5 dakika ile sona erdirilmiştir (Tablo 2. 2.).

Tablo 2. 2. PZR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Başlangıç Denatürasyon	1	94°C	10 dk.
Denatürasyon	35	94°C	1 dk.
Bağlanma	35	50°C	1 dk.
Uzama	35	72°C	1 dk.
Son Uzama	1	72°C	5 dk.

2. 2. 3. 4. Örneklerin Yüklenmesi

Elektroforez boyasından pipetin ucuna 2 µl kadar alınıp, daha sonra elde edilen PZR ürünleriyle karıştırılmıştır. Oluşturulan karışımdan 8 µl alınarak, jeldeki uygun pozisyondaki kuyucuğa yüklenmiştir.

2. 2. 3. 5. Yürütme

Hazırlanmış olan jele, istenilen örnekler ve markerların yüklemesi yapıldıktan sonra, elektroforez tankının kapağı kapatılıp, elektrotlar uygun pozisyonlara bağlanarak, 100 voltluk akımda 30 dakika yürütülmüştür.

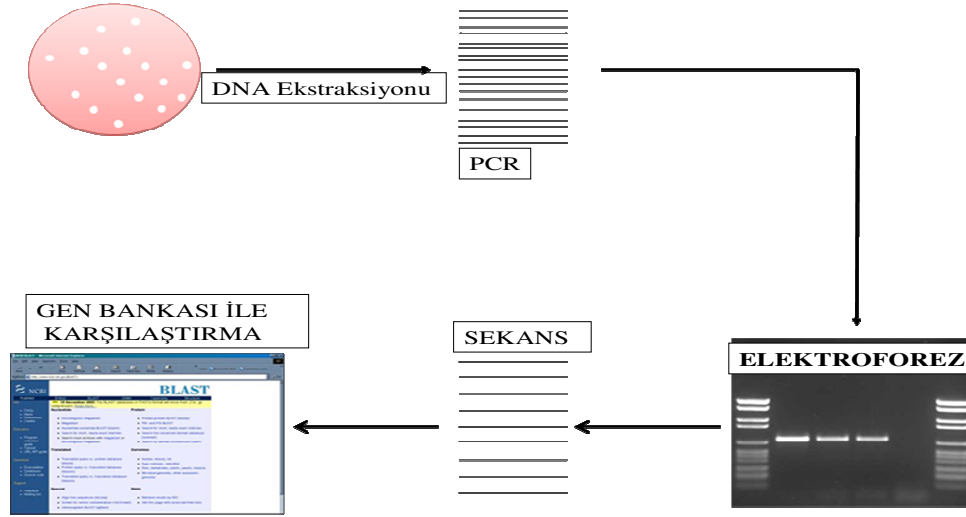
2. 2. 3. 6. Görüntüleme

Otuz dakikalık elektroforez zamanının ardından elde edilen jel, dikkatli bir şekilde etidyum bromürde 15 dakika boyanmaya yatırılmıştır. Süre sonunda boyanan jel, bilgisayara bağlı durumdaki transilluminatör cihazındaki odacığa yerleştirilerek, UV ışığı altında fotoğraflanıp, değerlendirilmiş ve 16S üniversal primerleri kullanılarak yapılan PZR'da 1371 bp uzunluğunda bant görülmüştür

2. 2. 3. 7. Sekansının Analizi

Elde edilen amplikonlar sekans analizleri için 96 kuyucuklu pleyt içerisinde MacroGen (MacroGen Inc.,1001 World Meridian Venture Center, #60-24, Gasan-dong, Geumchun-gu, Seoul, 153-781, Korea) firmasına gönderilmiştir. Firma saflaştırmayı takiben ABI Primse cihazı ile sekans analizini gerçekleştirmiştir. Elde edilen sekanslar gen bankası ile karşılaştırılmıştır. Bu amaçla National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Nucleotide-Nucleotide BLAST programı kullanılmıştır. Bakterilerin 16S rRNS sekansına dayalı moleküler identifikasyonunda

yapılan tüm işlemler aşağıda şematize edilmiştir. Sekans analizi sonucunda koagulaz pozitif ve koagulaz negatif stafilokok suşlarının tür düzeyinde identifikasyonları gerçekleştirilmiştir. Tüm testlerde kalite kontrol suşları olan *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 suşları kontrol olarak kullanılmıştır. Bakterilerin 16S rRNA sekansına dayalı moleküler identifikasyonunun yapılışı Şekil 2. 1.'de gösterilmiştir.



Şekil 2. 1. Bakterilerin 16S rRNA sekansına dayalı moleküler identifikasyonu

2. 2. 4. Disk Difüzyonu Yöntemi ile Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

İzole ve identifiye edilen stafilokok suşlarının antibakteriyel duyarlılık testleri disk difüzyon yöntemi ile yapılmıştır (Bauer 1966). Bunun için izole edilen suşlar %7 koyun kanlı agar besi yerine pasajlanıp, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen yeni kültürlerden tryptic soy broth besiyerlerine 0,5 ml McFarland'a (10^8 bakteri/ml) uygun süspansiyonlar hazırlanmıştır. Her bakteri türü için ayrı hazırlanan süspansiyonlardan 15 dakika içinde steril eküvyon ile inokulum tekniğe uygun olarak 25 ml'lik steril Mueller Hinton Agar besi yerinin üzerine yayılarak ekimleri yapılmıştır. Ekim yüzeyinin kuruması için bir süre beklendikten sonra antibiyotik diskleri ucu alevden geçirilmiş olan pensle besi yerine plak kenarından 15 mm, birbirinden 25–30 mm aralıklarla olacak şekilde yerleştirilmiştir. 37°C'de 18 saat inkübe edilen suşların inhibisyon zon çapları ölçülerek; sonuçlar duyarlı (S) orta derecede duyarlı (I) ve dirençli (R) olarak yorumlanmıştır (CLSI

2006, Comite de L'antibogramme –CASFM- 2007). İzole ve identifiye edilen *Staphylococcus* suşlarının in vitro antibiyotik duyarlılıklarında kullanılan diskler, disk içerikleri, zon çapları ve değerlendirilmesinde kullanılan kriterler Tablo 2. 1'de özetlenmiştir.

Tablo 2. 3. İzole ve identifiye edilen *Staphylococcus* suşlarının in vitro antibiyotik duyarlılıkları

Antibiyotik	Disk içeriği (µg)	Zon çapı (mm)		Değerlendirme
		R	S	
Ampisilin	10	≤28	≥ 29	CLSI 2006
Amoksisilin klavulonik asit	30	≤19	≥ 20	CLSI 2006
Neomisin	30	< 15	≥17	CASFM 2007
Penisilin G	10	≤28	≥29	CLSI 2006
Gentamisin	10	≤12	≥15	CLSI 2006
Enrofloksasin	5	< 17	≥ 22	CASFM 2007
Sefoperazon	30	≤15	≥ 21	CLSI 2006
Tetrasiklin	30	≤14	≥ 19	CLSI 2006
Vankomisin	30	-	≥ 15	CLSI 2006
Sefoksitin				
<i>S. aureus</i>	30	≤19	≥ 20	CLSI 2006
KNS		≤24	≥25	

2. 2. 4. 1. Metisilin Dirençli Stafilokok Suşlarının İdentifikasyonu

İncelenen stafilokok suşlarının metisilin dirençleri sefoksitin diski (30 µg, Oxoid) kullanılarak Kirby-Bauer disk diffüzyon yöntemine Mueller Hinton agarda (Difco) belirlenmiştir. Zon çapı *S. aureus* için 19 mm, KNS için 24 mm'den küçük veya eşit olan suşlar MRSA olarak kabul edilmiştir (CLSI, 2006).

2. 2. 5. Slaym Faktörün Saptanması

Kongo Kırmızılı Agar yönteminde slaym varlığı “Kongo Red Fenomenine” göre değerlendirilmiştir. Bu yöntemi ilk kez bildiren Freeman ve arkadaşları Kongo Red Fenomeninin kesin mekanizmasının bilinmediğini, ama renk değişikliğinin inkübasyonun ileri aşamasında oluşan ikinci bir ürünün olayın içine girebileceği şeklinde ifade etmişlerdir. KKA’da 24 saatlik inkübasyon döneminden sonra oluşan kuru siyah, kahverengimsi koloniler slaym pozitif, pembemsi koloni oluşturanlar ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Freeman ve ark 1989).

2. 2. 6. İstatistiksel Analiz

Koagulaz pozitif ve koagulaz negatif stafilokok suşlarında slaym oluşumunun metisilin direncinde artışa yol açıp açmadığının belirlenmesinde istatistiksel analiz için ki kare testi kullanılmıştır (Sümbüloğlu ve Sümbüloğlu 1993).

3. BULGULAR

3. 1. İzolasyon: Aydın ili Umurlu ilçesinde 23 işletmeden alınan 339 süt örneğinden izole edilen tüm mikroorganizmalar Tablo 3. 1.'de gösterilmiştir.

Tablo 3. 1. Mastitisli sütlerden izole edilen mikroorganizmalar

Etiyolojik etken	Sayı	%
Koagulaz negatif stafilokok	83	24,5
Koagulaz pozitif stafilokok	71	20,9
Maya	41	12,1
<i>Escherichia coli</i>	33	9,8
<i>Streptococcus spp.</i>	21	6,2
<i>Bacillus spp.</i>	19	5,6
<i>Shigella spp.</i>	12	3,5
<i>Pseudomonas spp.</i>	9	2,6
*Diğer mikroorganizmalar	8	2,4
Üreme yok	42	12,4
Total	339	100,0

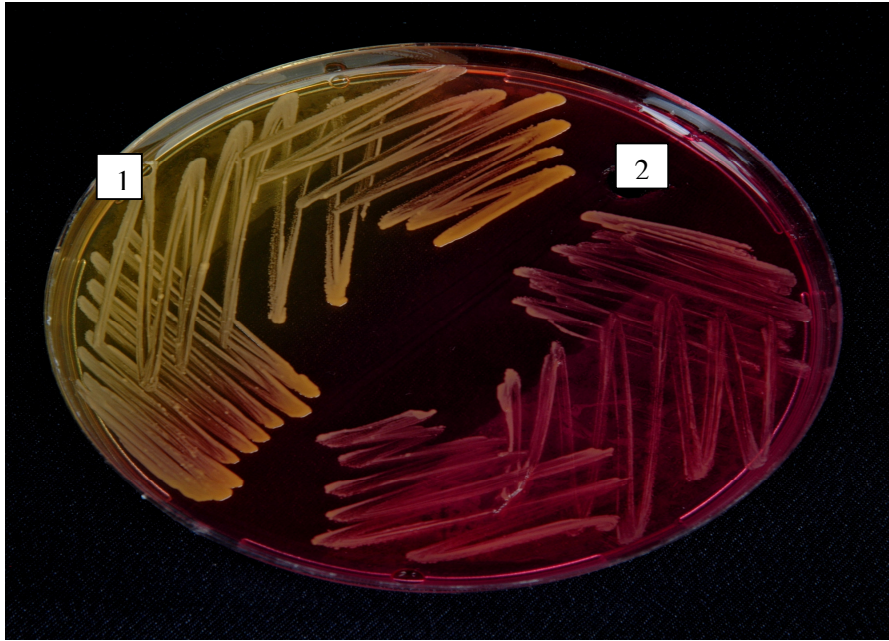
*Diğer mikroorganizmalar: *Enterobacter spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Citrobacter spp.*, *Hafnia spp.*

Tablo 3. 1.'de görüldüğü gibi özellikle *Staphylococcus spp.* yörede sığır mastitislerine neden olan en önemli etken (%45,4) olarak tespit edilmiştir. İncelenen 339 süt örneğinden izole edilen mikroorganizmalar sırasıyla: KNS'lar (%24,5), KPS (%20,9), mayalar (%12,1), *Escherichia coli* (%9,8), *Streptococcus spp.* (%6,2), *Bacillus spp.* (%5,6), *Shigella spp.* (%3,5), *Pseudomonas spp.* (%2,6), ve diğer mikroorganizmalar

(*Enterobacter* spp., *Corynebacterium* spp., *Citrobacter* spp., *Hafnia* spp.) (%2,4) identifiye edilirken; 42 süt örneğinde (%12,4) bakteriyolojik üreme tespit edilememiştir.

3. 2. İzole Edilen Stafilokok Türleri

İncelenen 339 süt örneğinden toplam 154 *Staphylococcus* spp. izole edildi. Bu suşların 83'ü KNS (% 53,9) , 71'i KPS suşu (% 46,1) olarak belirlendi. Koagulaz pozitif ve koagulaz negatif birer suşun mannitol salt agar'da üreyen kolonileri Resim 3. 1'de gösterilmiştir.



Resim 3. 1. MSA'da *S. aureus* (1) ve *S. chromogenes* (2)

İzolasyonları yapılan suşların sekansa dayalı tür düzeyindeki identifikasyon sonuçları Tablo 3. 2.'de verilmiştir.

Tablo 3. 2. İdentifiye edilen stafilokok türlerinin dağılımı

Tür	Sayı	%
<i>S. aureus</i>	71	46,1
<i>S. chromogenes</i>	23	14,9
<i>S. haemolyticus</i>	17	11,0
<i>S. pseudointermedius</i>	10	6,5
<i>S. simulans</i>	9	5,8
<i>S. epidermidis</i>	8	5,3
<i>S. pasteurii</i>	6	3,9
<i>S. sciuri</i>	3	1,9
<i>S. vitulus</i>	2	1,3
<i>S. equorum</i>	2	1,3
<i>S. xylosus</i>	2	1,3
<i>S. warneri</i>	1	0,7
Toplam	154	100,0

Tablo 3. 2.'de de görüldüğü gibi 12 farklı stafilokok türü izolasyonu yapılmıştır. İzole ve identifiye edilen toplam 154 *Staphylococcus* spp. içerisinde *S. aureus* 71 adet (%46,1) identifiye edilerek tür düzeyinde sıralamada en yüksek oranda izole edilen tür olmuştur. Bununla birlikte toplam 83 adet (%53,9) KNS suşu izolasyonu yapılmıştır. KNS'ları tür düzeyindeki dağılımları ise 23 *S. chromogenes* (%14,9), 17 *S. haemolyticus* (%11,0), 10 *S. pseudointermedius* (%6,5), 9 *S. simulans* (%5,8), 8 *S. epidermidis* (%5,3), 6 *S. pasteurii* (%3,9), 3 *S. sciuri* (%1,9), 2 *S. vitulus* (%1,3), 2 *S. equorum* (%1,3), 2 *S. xylosus*, (%1,3), 1 *S. warneri* (%0,7) şeklinde olmuştur.

3. 3. *Staphylococcus* Türlerinin Antibiyotik Dirençleri

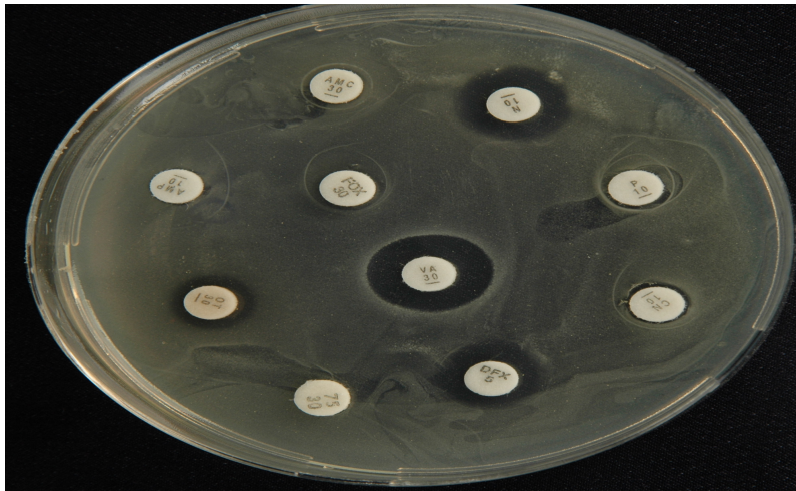
İncelenen 154 adet stafilokok suşunun hepsi vankomisine duyarlı bulunurken, 10 (%6,5)'u enrofloksasine, 11 (%7,2)'i sefoperazona, 16 (%10,4)'sü sefoksitine, 20 (%13,0)'si gentamisine, 22 (%14,4)'si tetrasikline, 29 (18,8)'u amoksisilin klavulanik asite, 31 (%20,1)'i ampisiline, 39 (%25,4)'u penisiline, 40 (%25,9)'ı neomisine dirençli olarak belirlenmiştir. İncelenen 154 suşun 72 (%46,8)'si kullanılan tüm antibiyotiklere duyarlı bulunurken; 82 (%53,2)'sinde direnç tespit edilmiştir. Direnç belirlenen 39 (%25,4)

suşta tek antibiyotiğe karşı; 43 (%27,9) suşta çoklu antibiyotik direnci (13'ünde ikili, 11'sinde üçlü, 5'inde dördü, 2'sinde beşli, 4'ünde altılı, 3'ünde yedili, 5'inde sekizli) belirlenmiştir. Tablo 3. 3.'de antibiyotik duyarlılık ve dirençliliklerinin *Staphylococcus* türlerinde dağılımı gösterilmiştir.

3. 4. Metisilin Direnci

İzole ve identifiye edilen toplam 154 stafilokok suşundan 16 (%10,4)'sı metisilin dirençli, 138'i metisilin duyarlı stafilokok suşu (%89,6) olarak belirlenmiştir.

Metisilin dirençli stafilokok suşlarının antibiyotik duyarlılık ve dirençliliklerinin dağılımı ise Tablo 3. 4.'de, metisilin dirençli aynı zamanda çoklu antibiyotik dirençli bir stafilokok suşunun antibiyogramı Resim 3. 2.'de gösterilmiştir.



Resim 3. 2. Metisilin dirençli aynı zamanda çoklu antibiyotik dirençli *Staphylococcus* suşu

İncelenen onaltı metisilin dirençli stafilokok suşunun hepsi vankomisine duyarlı bulunmuştur. Bununla birlikte incelenen suşların 4 (%25,0)'ü neomisine, 9 (%56,2)'u enrofloksasine, 10 (%62,5)'u tetrasikline, 11 (%68,8)'i sefoperazona, 11 (%68,8)'i amoksisilin klavulanik asite, 12 (%75,0)'si gentamisine, 12 (%75,0)'si ampisiline, 14 (%87,5)'ü penisiline dirençli olarak tespit edilmiştir. Metisilin dirençli stafilokok suşlarının hepsinde aynı zamanda çoklu antibiyotik direnci (1'inde iki, 1'inde üç, 1'inde dört, 2'sinde beş, 4'ünde altı, 3'ünde yedi, 4'ünde sekizli) belirlenmiştir.

Tablo 3. 3. Stafilokok türlerinde antibiyotik duyarlılık ve dirençliliklerinin dağılımı

Tür (İzolat Sayısı)	AMP		AMC		N		P		CN		ENR		CFP		TET		VAN		FOX		MRS
	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S			
<i>S. aureus</i> (71)	18	53	16	55	21	50	17	54	7	64	5	66	5	66	16	55	0	71	5	66	24
<i>S. chromogenes</i> (23)	3	20	4	19	4	19	4	19	5	18	2	21	1	22	2	21	0	23	3	20	6
<i>S. haemolyticus</i> (17)	6	11	4	13	3	14	10	7	2	15	2	15	3	14	3	14	0	17	3	14	5
<i>S. pseudointermedius</i> (10)	2	8	2	8	4	6	2	8	2	8	0	10	0	10	1	9	0	10	2	8	2
<i>S. simulans</i> (9)	0	9	1	8	1	8	3	6	1	8	1	8	1	8	0	9	0	9	2	7	2
<i>S. epidermidis</i> (8)	0	8	0	8	5	3	0	8	3	5	0	8	0	8	0	8	0	8	0	8	3
<i>S. pasteurii</i> (6)	2	4	2	4	2	4	1	5	0	6	0	6	1	5	0	6	0	6	1	5	1
<i>S. sciuri</i> (3)	0	3	0	3	0	3	2	1	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0
<i>S. vitulus</i> (2)	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0
<i>S. equorum</i> (2)	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0
<i>S. xylosus</i> (2)	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0
<i>S. warneri</i> (1)	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
Toplam (154)	31	123	29	125	40	114	39	115	20	134	10	144	11	143	22	132	0	154	16	138	43

AMP: Ampisilin, **AMC:** Amoksisilin klavulanik asit, **N:** Neomisin, **P:** Penisilin, **CN:** Gentamisin, **ENR:** Enrofloksasin,

CFP: Sefoperazon, **TET:** Tetrasiklin, **VAN:** Vankomisin, **FOX:** Sefoksitin, **MRS:** Çoklu dirençli stafilokok suşu sayısı

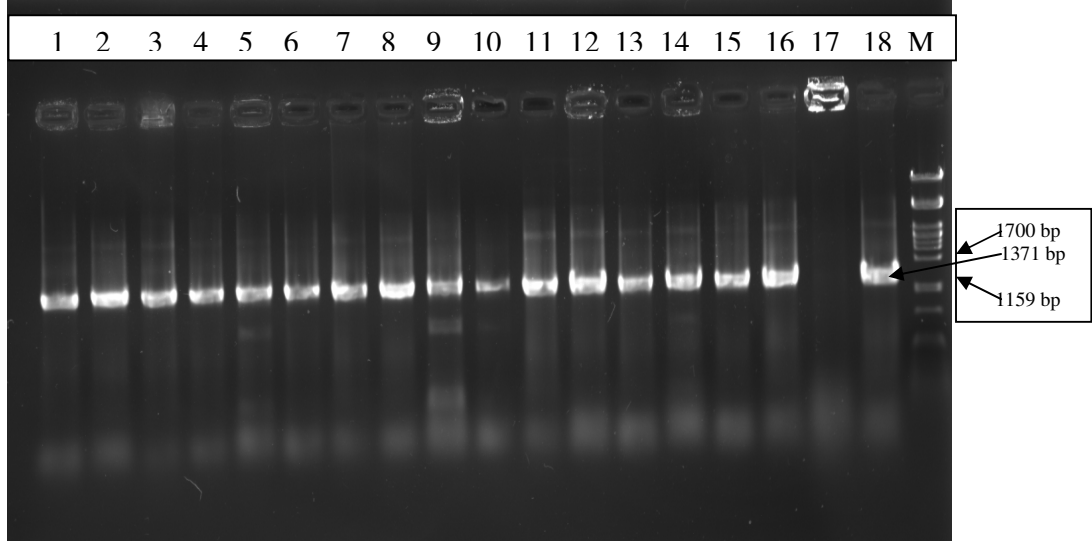
Tablo 3. 4. Metisilin dirençli stafilokok suşların antibiyotik duyarlılık ve dirençliliklerinin dağılımı

Tür (İzolat Sayısı)	AMP		AMC		N		P		CN		ENR		CFP		TET		VAN		FOX		MRS
	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	
<i>S. aureus</i> (6)	5	1	5	1	2	4	4	2	6	0	4	2	6	0	6	0	0	6	6	0	6
<i>S. haemolyticus</i> (3)	2	1	1	2	1	2	3	0	2	1	1	2	1	2	1	2	0	3	3	0	3
<i>S. chromogenes</i> (2)	2	0	1	1	0	2	2	0	1	1	2	0	2	0	2	0	0	2	2	0	2
<i>S. pseudintermedius</i> (2)	2	0	2	0	0	2	2	0	1	1	0	2	0	2	1	1	0	2	2	0	2
<i>S. simulans</i> (2)	0	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	2	0	2	2	0	2
<i>S. pasteurii</i> (1)	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1
TOPLAM (16)	12	4	11	5	5	11	13	3	11	5	9	7	11	5	10	6	0	16	16	0	16

AMP: Ampisilin, **AMC:** Amoksisilin klavulanik asit, **N:** Neomisin, **P:** Penisilin, **CN:** Gentamisin, **ENR:** Enrofloksasin, **CFP:** Sefoperazon **TET:** Tetrasiklin, **VAN:** Vankomisin, **FOX:** Sefoksitin, **MRS:** Çoklu dirençli stafilokok suşu sayısı

3. 5. PZR Ürünlerinin Elektroforez ile Ayrımı

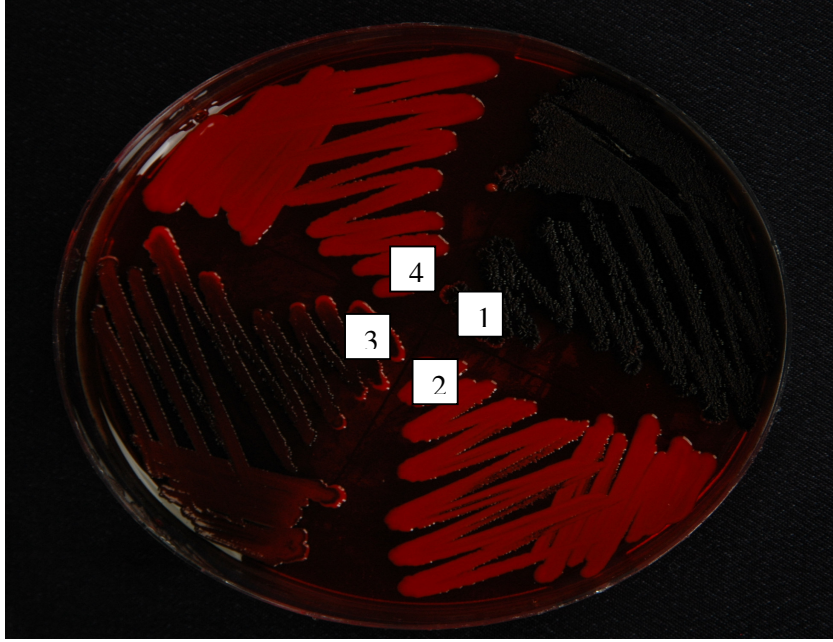
16S üniversal primerleri kullanılarak yapılan PZR'da 1371 bp uzunluğunda bant görülmüştür (Resim 3. 3.).



Resim 3. 3. 16S primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PZR. **1-16:** *Staphylococcus* izolatları, **17:** Negatif Kontrol, **18:** Pozitif Kontrol, **M:** PstI enzimi ile kesilmiş lambda faj DNA'sı

3. 6. Slaym Pozitifliği

İzole ve identifiye edilen toplam 154 stafilokok suşundan 55 (%35,7)'i slaym pozitif, 99 (%64,3)'u ise slaym negatif olarak belirlenmiştir. Slaym oluşturan ve oluşturmeyan stafilokok türlerinin KKA'daki görünümü Resim 3. 4.'de, izole edilen suşlarda slaym pozitifliği ve metisilin direncinin türlere göre dağılımı Tablo 3. 5'te, slaym oluşturan ve oluşturmeyan stafilokok türlerinde metisilin duyarlılık ve direnç durumu Tablo 3. 6.'da gösterilmiştir.



Resim 3. 4. Slaym pozitif (1, 3) ve negatif (2, 4) suşlar

Tablo 3. 5. İzole edilen suşlarda slaym pozitifliği ve metisilin direncinin türlere göre dağılımı

Tür (N)	SPSS	MRSS
<i>S. aureus</i> (71)	27	6
<i>S. chromogenes</i> (23)	7	2
<i>S. haemolyticus</i> (17)	6	3
<i>S. pseudointermedius</i> (10)	3	2
<i>S. simulans</i> (9)	3	2
<i>S. epidermidis</i> (8)	3	0
<i>S. pasteurii</i> (6)	3	1
<i>S. sciuri</i> (3)	2	0
<i>S. vitulus</i> (2)	0	0
<i>S. equorum</i> (2)	0	0
<i>S. xylosum</i> (2)	1	0
<i>S. warneri</i> (1)	0	0
Toplam (154)	55	16

N: İzolat sayısı

SPSS: Slaym pozitif suş sayısı, MRSS: Metisilin dirençli suş sayısı

Tablo 3. 6. Slaym oluşturan ve oluşturmeyan stafilokok türlerinde metisilin duyarlılık ve direnç durumu

	Metisilin	<i>Staphylococcus spp.</i>		Toplam		
		KNS	KPS			
SLİME	Pozitif	Duyarlı	26 (53,0)	23 (47,0)	49	
		Dirençli	2 (33,3)	4 (66,7)	6	55
	Negatif	Duyarlı	47 (52,8)	42 (47,2)	89	
		Dirençli	8 (80,0)	2 (20,0)	10	99
Toplam			83	71	154	154

3. 7. İstatistiksel Analiz

Koagulaz pozitif ve koagulaz nefatif stafilokok suşlarında slaym oluşumunun metisilin direncinde artışa yol açmadığı belirlenmiştir (KNS için $X^2=0,99$; $p=0,33$, KPS için $X^2=2,25$; $p=0,13$).

4. TARTIŞMA

Mastitis, süt ineklerinin yaygın olarak görülen ve mali külfeti en yüksek olan meme dokusu hastalığıdır. Sığır mastitislerinden 150 civarında mikroorganizma izole edildiği bildirilmesine karşın (Bradley ve ark. 2002), en sık izole edilen etkenler *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp. ve *E. coli*'dir (Baştan 2002). Bilindiği gibi *S. aureus* hem nozokomiyal hem de toplum kökenli infeksiyonlarda en sık karşılaşılan etkenlerden birisidir. Stafilokoklar spor oluşturmeyen bakteriler arasında en dirençli olanlardandır. Kurumuş klinik materyallerden aylarca sonra bile izole edilebilirler, ısıya dirençlidirler ve yüksek tuz oranına sahip besiyerlerinde üreyebilirler (Anonim 1).

Türkiye'de ve dünyada değişik yıllarda yapılan çalışmalarda mastitislerden *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *Actinomyces pyogenes*, *E. coli*, *C. bovis*, *Pasteurella multocida*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* ve *Micrococcus* spp. en sık izole edilen etkenler olmuştur (Ak ve ark. 2000, Gülcü ve Ertuş 2004, Bayar 2007, Tel ve ark. 2009). Bu çalışmada, incelenen 339 süt örneğinden koagulaz negatif stafilokoklar (%24,5), koagulaz pozitif stafilokoklar (%20,9), mayalar (%12,1), *E. coli* (%9,3), *Streptococcus* spp. (%6,2), *Bacillus* spp. (%5,6), *Shigella* spp. (%3,5), *Pseudomonas* spp. (%2,6), ve diğer mikroorganizmalar (*Enterobacter* spp., *Corynebacterium* spp., *Citrobacter* spp., *Hafnia* spp.) (%2,4) izole ve tanımlanmıştır. Mastitise neden olan mikroorganizmalar yöresel farklılıklar gösterebildiğinden bakteri izolasyon oranları diğer araştırmacıların izolasyon oranları ile karşılaştırılmamıştır.

Bu çalışmada 42 (%12,4) süt örneğinden yapılan ekimler sonucunda bakteriyolojik izolasyon gerçekleştirilememiştir. Yapılan diğer çalışmalarda bu oran %38,0 ile %7,3 arasında değişmektedir (Bartlett ve ark. 1992, Kuyucuoğlu ve Uçar 2001, Giannechini ve ark. 2002, Tel ve ark. 2009). Alınan süt örneklerinde aerobik bakteri izole edilememesinin nedeni olarak; etkenin viral ya da mikotik olabileceği, aerobik koşullarda üremeyen bir

mikroorganizma olabileceği, özel besiyerlerinde üreyebilen bakteriyel bir etken olabileceği düşünülmektedir.

Bazı araştırmacılar mastitis olgularında bulaşıcı patojenlerin yaygın olduğunu (Giannechini ve ark. 2002, Rişvanlı ve Kalkan 2002, Pitkala ve ark. 2004), bazı araştırmacılar ise çevresel patojenlerin izolasyon oranlarının daha yüksek olduğunu görmüşlerdir (Ak et al 2000, Kuyucuoğlu and Uçar 2001, Tel et al. 2009, Lakew et al 2009). Çevresel patojenlerin neden olduğu mastitis olgularında tedavi etkenlerin septisemi veya toksemiye neden olarak hayvanların ölümüne sebep olmaları nedeni ile güçtür ve ölümlerle sonuçlanabilir (Bradley 2002). Bu çalışmada sığır mastitislerinden izole edilen stafilokok suşlarında metisilin direnci ve slaym oluşumunun saptanması, bununla birlikte slaym oluşumunun metisilin direncine etkisinin olup olmadığının incelenmesi amaçlandığından stafilokok suşları dışında izole edilen etkenlerin tür düzeyinde identifikasyonları yapılmamıştır. Ancak, çevresel patojen olarak da kabul edilen KNS türlerinin % 24,5'lük izolasyon oranı ile yörede sığır mastitislerinden en sık izole edilen etken olduğu belirlenmiştir. Koagülaz negatif stafilokokların eskiden derinin normal florasında bulunan zararsız patojenler olduğu kabul edilmekle birlikte; günümüzde mastitise neden olan önemli fırsatçı patojen bir grup mikroorganizma oldukları bilinmektedir (Taponen ve Pyörala 2009). Bu çalışmada da 71 izolat (%20,9) ve toplam 11 tür KNS (23 (%14,9) *S. chromogenes*, 17 (%11,0) *S. haemolyticus*, 10 (%6,5) *S. pseudointermedius*, 9 (%5,8) *S. simulans*, 8 (%5,3) *S. epidermidis*, 6 (%3,9) *S. pasteurii*, 3 (%1,9) *S. sciuri*, 2 (%1,39) *S. vitulidis*, 2 (%1,3) *S. equorum*, 2 (%1,3) *S. xylosum*, , 1 (%0,7) *S. warneri*) identifikasyonu yapılmıştır. İzolasyon yapılan bölgeye göre az çok değişmekle birlikte genel olarak *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hyicus*, *S. simulans* ve *S. xylosum* mastitislerinden en sık izole edilen KNS türleridirler (Taponen ve ark. 2006).

Türkiye'de ve dünyada değişik yıllarda yapılan çalışmalarda mastitislerde *S. aureus* genellikle tür düzeyinde en sık izole edilen bulaşıcı mastitis etkeni olmuştur (Giannechini et al. 2002, Shitandi et al. 2004, Tel et al. 2009). *S. aureus*'un ülkemizde yapılan önceki çalışmalarda izolasyon oranları %28,3 ile %47,5 arasında değişmektedir (Kuyucuoğlu and Uçar 2001, Bademkiran et al. 2005, Tel et al. 2009). Bu çalışmada da tüm örnekler içerisinde

% 20,9 oranında izole edilerek diğer çalışmalarla paralel olarak tür düzeyinde en sık izole edilen etken olarak bulunmuştur.

Bu çalışmada da diğer çalışmalara benzer bir şekilde koliform grubu mikroorganizmalar KNS türlerinin ardından en çok görülen çevresel patojen etkenler olarak bulunmuştur (Ak et al. 2000, Kuyucuoğlu ve Uçar 2001, Shitandi et al. 2004, Tel et al. 2009). Bu sonuç yine sağımlı yapılan işletmelerde hijyene yeterince dikkat edilmediğini göstermektedir. Çevresel *Streptococcus* spp. içinde de en önemli türlerin *S. uberis* ve *S. dysgalactiae* olduğu bildirilmiştir (Ak et al. 2000, Kuyucuoğlu et al. 2001, Pitikala et al. 2004). Pek çok çalışmada, bu çalışmada olduğu gibi streptokokların tür düzeyinde identifikasyonlarını yapmak güç olduğundan cins düzeyinde izolasyonlar yapıldığı görülmüştür (Shitandi et al. 2004, Tel et al. 2009). Bununla birlikte; *S. uberis* ve *S. parauberis* gibi biyokimyasal yöntemlerle tanımlanamayan mikroorganizmaların (Jayarao et al. 1991) identifikasyonlarının yapılmasında sekans yönteminin oldukça faydalı olduğu söylenebilir.

Hayvanlarda ilk MRSA suşu 1972 yılında mastitisli sığırlarda bildirilmiştir (Devriese ve Hommez 1975). İlerleyen yıllarda da bu sayı artmıştır (Juhász-Kaszanyitzky ve ark 2007, Leonard ve Markeley 2008). Türkiyede mastitisli süt örneklerinde metisilin direncinin incelendiği sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır ve bu çalışmalar arasında MRSA bulunmasında oransal açıdan farklılıklar bulunmaktadır. Ak ve ark. (2000) İstanbul'da ve Güler ve ark. (2004) Konya'da izole ettikleri mastitise neden olan stafilokok suşlarında oksasillin direnci bulunmadığını bildirirlerken; Kireççi ve Çolak (2002) Erzurum yöresinde metisilin dirençli 5 (%5,8) suş olduğunu bildirmiştir. Kırcan ve ark. (2005) ise Aydın yöresinde yaptıkları çalışmada inceledikleri *S. aureus* suşlarında oksasillin direncinin %60; Türkyılmaz ve ark. (2009) ise yine aynı yörede yaptıkları çalışmada sefoksitin direncinin *S. aureus* suşlarında %17,2 olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise toplam 154 *Staphylococcus* spp., 6 KPS ve 10 KNS olmak üzere toplam 16 (%10,4) stafilokok suşu metisilin dirençli olarak bulunmuştur. Bu suşlardan 6'sı KPS (*S. aureus*), 10'u KNS (3 *S. chromogenes*, 2 *S. haemolyticus*, 2 *S. pseudointermedius*, 2 *S. simulans*, 1 *S. pasteurii*) olarak tanımlanmıştır. Yoshida ve ark. (1998) mastitis vakalarından elde ettikleri 80 stafilokok suşununun 4'ünün metisilin dirençli KNS (2. *S. epidermidis*, 1 *S. xylosum*, 1 *S. lentus*) olduğunu bildirmişlerdir.

Mastitis tedavisinde yoğun antibiyotik kullanımının en önemli etkisi antibiyotiklere dirençli bakterilerin sayısının artmasıdır. İnsanoğlunun penisilinin keşfiyle başlattığı savaşta, stafilokoklar da enzimleriyle bu antibiyotiklerden korunmaya devam etmektedirler. Stafilokoklar 1944 yılında penisilinaz üretimi başlayan bu karşı koyuşun bugün gelinen noktada çoklu antibiyotik direnci gösteren, tedavileri zor olan “sorunlu” mikroorganizmalar olarak bilinmektedirler (Ehlert ve ark 1999). Metisiline dirençli suşların tüm β -laktam grubu antibiyotiklere dirençli olmaları nedeni ile stafilokokal mastitisler için yapılan antibiyotik duyarlılık testlerinde metisilin dirençliliğinin de araştırılması gerektiği düşünülmektedir. Bugün beşeri hekimlikte stafilokok suşlarında metisilin direncinin tespiti tedavide önemli bir ölçüt olarak değerlendirilmektedir.

Metisilin dirençli *S. aureus* suşlarının en önemli özelliklerinden birisi, çeşitli antibiyotiklere karşı gösterdikleri yüksek orandaki dirençlilikleridir (Leonard ve Markey 2008). Bu aynı zamanda, MRSA infeksiyonlarındaki yüksek mortalitenin de nedenlerinden birisi olarak düşünülmektedir. Sığır mastitislerinden izole edilen 154 stafilokok suşunun disk difüzyon testi ile incelenmesi sonucunda metisilin dirençli 16 suşun hepsinde çoklu antibiyotik direncinin bulunduğu belirlenmiştir. Metisilin dirençli 16 adet suşun 6 (%37,5)'sının slaym faktör oluşturduğu görülmüştür. Ayrıca hem MRSA olup hem de slaym faktör oluşturan toplam dört adet suş tespit edilirken; iki adet KNS suşunun (1 *S. haemolyticus*, 1 *S. pasteurii*) hem metisilin dirençli hem de slaym faktör oluşturduğu belirlenmiştir.

Slaym oluşturan bakterilerde antibiyotik dirençliliği konusu oldukça önemlidir (Brandt ve ark. 1995). Bazı araştırmacılar ise slaym üretimi ile patojenik suşlar arasında epidemiyolojik bir ilişki olduğu konusunda görüş birliği içerisindedirler (Kristinsson ve ark. 1986, Nourizadeh ve Sultan 1993). Patojen suşlarda slaym oluşturma oranları daha yüksek bulunmuştur (Christensen ve ark. 1982, Christensen ve ark. 1985, Diaz-Mitoma ve ark. 1987). Yapılan bir çalışmada slaym faktör sıklığı ile infeksiyon oluşturma potansiyeli arasında paralel bir ilişki olduğu bildirilmiştir (Baussard ve ark. 1993). Bakteriyemili hastalardan izole edilen KNS'larda slaym pozitifliğinin patojen suşlarda %75–93, kontaminant suşlarda ise %23–63 oranlarında değiştiğine işaret edilmektedir (Christensen ve

ark. 1994). Kotilainen (1990) septisemili 62 hastadan izole edilen patojen KNS'lerde %53, kontaminantlarda %29 slaym oluşumunu saptamıştır. Aygen ve ark. (1996) ise slaym oluşumunu patojen KNS'lerde %29,6 ve kontaminantlarda %10,3 oranlarında bulmuşlardır. Bu çalışmada ise incelenen 154 stafilokok suşunun 55 (% 35,7)'inin slaym faktör oluşturduğu, bu suşların 27 (%49,0)'sinin KPS, 28 (%51,0)'inin KNS olduğu belirlenmiştir.

Yapılan bazı çalışmalarda metisilin direncinin slaym faktor oluşturan suşlarda daha fazla olduğu gözlenmiştir (Baussard ve ark. 1993, Elçi ve ark. 1996); bazı çalışmalarda (elik ve ark. 2005a, elik ve ark. 2005b) ise bu çalışmada olduğu gibi metisilin direnci ve slaym oluşumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

5. SONUÇ

Aydın yöresi Umurlu ilçesinde sığır mastitislerine neden olan aerobik bakteriyel etkenlerin belirlenmesi, izole edilen stafilokok suşlarında metisilin direncinin ve slaym oluşumunun incelenmesi amacı ile gerçekleştirilen bu çalışmada; KNS'ın en sık izole edilen mastitis etkenleri olması açısından önem taşıkları, izole edilen stafilokok suşlarının %35,7'sinin slaym pozitif, %10,4' ünün metisilin dirençli olduğu; metisilin dirençli 16 suşun 6'sında slaym faktör oluşumu belirlenirken, bu suşların hepsinin çoklu antibiyotik direncine sahip oldukları belirlenmiştir. Yörede sığır sütlerinden izole edilen stafilokok suşları arasında artık metisilin dirençli suşların bulunduğu ve bir sorun teşkil etmeye başlayacağı düşünülmektedir. İlerleyen yıllarda insan hekimliğinde olduğu gibi, metisilin direnç gelişimi daha da artabileceğinden stafilokokal mastitis tedavisinde metisilin direncinin önemli bir faktör olarak dikkate alınması gerekeceği düşünülmekle birlikte; bu konuda yapılacak daha geniş kapsamlı epidemiyolojik çalışmaların metisilin dirençli stafilokok suşlarının neden oldukları infeksiyonların Türkiye'deki durumunu açıklığa kavuşturacağı sonucuna varılmıştır.

ÖZET

Sığır Mastitislerinden İzole Edilen Stafilokoklarda Metisilin Direnci ve Slaym Pozitifliği

Bu çalışmanın amaçları sığır mastitislerine neden olan aerobik bakteriyel etkenlerin belirlenmesi, izole edilen stafilokok suşlarında metisilin direncinin ve slaym oluşumunun incelenmesidir. Materyal olarak, Aydın ili Umurlu ilçesinde, 152 sağmal inekten alınan 339 mastitisli süt örneği alınmıştır. İzole edilen mikroorganizmaların cins düzeyinde identifikasyonu standart biyokimyasal yöntemlerle; koagulaz pozitif (KPS) ve koagulaz negatif (KNS) stafilokok suşlarının tür düzeyinde identifikasyonları ise sekans analizi ile yapılmıştır. Stafilokok suşlarının metisilin dirençleri sefoksitin diski kullanılarak disk difüzyon yöntemi ile slaym varlığı Kongo Red Agar yöntemine göre belirlenmiştir. KPS ve KNS suşlarında slaym oluşumunun metisilin direncinde artışa yol açıp açmadığının belirlenmesinde istatistiksel analiz için ki kare testi kullanılmıştır. Mastitis etkeni olarak ilk sırayı KNS (23 *S. chromogenes*, 17 *S. haemolyticus*, 10 *S. pseudointermedius*, 9 *S. simulans*, 8 *S. epidermidis*, 6 *S. pasteurii*, 3 *S. sciuri*, 2 *S. vitulis*, 2 *S. equorum*, 2 *S. xylosum*, 1 *S. warneri*)'lar alırken (%24,5), bunu KPS (71 *S. aureus*)'lar (%20,9) takip etmiştir. Bunlardan 16 (%10,4) suş metisilin dirençli, 55 (%35,7) suş slaym pozitif olarak saptanırken; KPS ve KNS suşlarında slaym oluşumunun metisilin direncinde artışa yol açmadığı tespit edilmiştir. Metisilin direncinin Aydın yöresinde bir sorun oluşturmaya başladığı, bundan sonraki yıllarda stafilokokal mastitis tedavisinde metisilin direncinin önemli bir faktör olarak dikkate alınması gerekeceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Mastitis, Metisilin Direnci, Slaym, *Staphylococcus* spp.

SUMMARY

Methicillin Resistance and Slime Positivity of Staphylococci Isolated from Bovine Mastitis

The aims of this study were to determine the aerobic bacterial agents cause bovine mastitis, to investigate the slime formation and methicilline resistance in isolated staphylococcus species. Material of this study was consisted of 339 mastitis suspected milk samples taken from 152 dairy cattle rearing in Umurlu county of Aydın Province. Identifications of isolated microorganisms on genus basis were performed with standart biochemical methods while sequence analysis was used for species basis identification of coagulase negative (CNS) and coagulase positive (CPS) staphylococcus strains. Methicilline resistance of staphylococcus strains were performed with disk diffusion method by using

cefoxitin disk and slime formation was detected with Congo Red Agar method. Chi-Square Test was used for analysing the effect of slime formation on methicilline resistance between CNS and CPS staphylococcus strains. CNS (23 *S. chromogenes*, 17 *S. haemolyticus*, 10 *S. pseudointermedius*, 9 *S. simulans*, 8 *S. epidermidis*, 6 *S. pasteurii*, 3 *S. sciuri*, 2 *S. vitulus*, 2 *S. equorum*, 2 *S. xylosum*, , and 1 *S. warneri*) were the most common cause (24.5%) of mastitis in cows while CPS (*S. aureus*) were the most second (20.9%). 16 (10.4%) staphylococcus strains were found as methicilline resistance while 55 (35.7%) were slime positive from 154 staphylococcus strains. It was determined that slime formation has no effect on methicilline resistance in CNS and CPS staphylococcus strains. It was thought that methicilline resistance is beginning a problem and methicilline resistance may be the most important factor in the treatment of staphylococcal mastitis in the near future in Aydın.

Key words: Mastitis, Methicillin Resistance, Slime, *Staphylococcus* spp.

KAYNAKLAR

Ak S, Horoz H, Ilgaz A (2000) *Trakya Bölgesinde Sığır Mastitislerinden Sorumlu Bulaşıcı ve Çevresel Bakteriyel Etkenler ve Antibiyotik Duyarlılıkları*. Ist Unv Vet Fak Derg, 26: 353–65.

Akyar L, Fidan I, Rota S, Türet S (1998) *Koagülaz Negatif Stafilokoklarda Slaym Faktör Yapımının Üç Farklı Yöntemle Araştırılması, Tür Tayini ve Antibiyotik Direnci*. Mikrobiyol Bül, 32: 15–22.

Anonim 1 (2009) *Staphylococcus*

Erişim Adresi: <http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/944101100.pdf>

Erişim Tarihi: 15. 06. 2009

Anonim 2 (2009) *Laboratory Detection of Oxacillin/Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus.*

Erişim Adresi: http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar_lab_mrsa.html

Erişim Tarihi: 25. 06. 2009

Anonim 3 (2009) *Bakterilerin Sınıflandırılması*

Erişim Adresi: [http://tip.erciyes.edu.tr/Ders Notlari/ Temel tip/ Mikrobiyoloji/ Huseyin_Kilic/BAKTER%C4%B0LER%C4%B0N%20SINIFLANDIRILMASI.pdf](http://tip.erciyes.edu.tr/Ders%20Notlari/Temel%20tip/Mikrobiyoloji/Huseyin_Kilic/BAKTER%C4%B0LER%C4%B0N%20SINIFLANDIRILMASI.pdf)

Erişim Tarihi: 15. 06. 2009

Anonim 4 (2009) *MLST Staphylococcus aureus*

Erişim Adresi: <http://saureus.mlst.net/misc/info.asp>

Erişim Tarihi: 15. 06. 2009

Akalın E (1994) *Klinik Uygulamada Antibiyotikler ve Diğer Antimikrobiyal İlaçlar.* 1. Baskı. Günel Kitabevleri.

Alaçam E (1988) *Sığır Hastalıkları.* E. Alaçam, M Şahal (Editör) s: 389–425. Medisan Yayınları, Ankara, TÜRKİYE.

Anğ Küçüker AM, Tümbay E, Anğ Ö, Erturan Z (2002) *Tıbbi Mikrobiyoloji.* (Franz H, Kayser A, Bienz A, Eckert J, Zinkernagel RM) 9. Baskı. Nobel Tıp Kitapevileri. s: 210.

Arciola RC, Campoccia D, Montanaro L (2002) *Detection of Biofilm-Forming Strains of Staphylococcus epidermidis and S. aureus.* Expert Rev Mol Diagn, 2: 478–84.

Arciola CRA, Campoccia D, Baldassarri L, Donati ME, Pirini V, Gamberini S, Montanaro L (2006) *Detection of Biofilm Formation in Staphylococcus epidermidis from Implant Infections. Comparison of a PCR-Method that Recognizes the Presence of ica Genes with Two Classic Phenotypic Methods.* J Biomed Mater Res A, 76: 425–30.

Atasever S, Erdem H (2008) *Süt Sığırlarında Mastitis İle Sütün Elektriksel İletkenliği Arasındaki İlişkiler.* OMU Zir Fak Derg, 23: 131–6.

Aybay C, Çağlar K, İmir T (1997) *Staphylococcus epidermis Kaynaklı Slaym Maddesinin Makrofajlardan Nitrik Oksit Salınımına Etkisi.* İnfeksi Derg, 11: 353–6.

Aydınlı A, Durmaz G, Akgün Y (1997) *Koagülaz Negatif Stafilokoklarda Slaym Faktör Yapımının Kongo Kırmızılı Agar Yöntemi İle Araştırılması.* Flora, 1: 41–4.

Aygen B, Sekmen E, Sümerkan B, Doğanay M (1996) *Koagülaz Negatif Stafilokoklarda Slaym Yapımı ve Aderans.* Türk Mikrobiyol Cem Derg, 26: 67–70.

Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M (1966) *Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method.* Am J Clin Pathol, 45: 493.

Bademkiran S, Yeşilmen S, Gürbulak K (2005) *Sütçü İneklerde Günlük Sağım Sayısının Klinik Mastitis ve Süt Verimi Üzerine Etkisi*. YYÜ Vet Fak Derg, 16: 17–21.

Bartlett PC, Miller GY, Lance SE, Heider LE (1992) *Managerial determinants of intramammary coliform and Environmental Streptococci Infections in Ohio dairy herds*. J Dairy Sci, 75: 1241-52.

Baussard P, Pithsy A, DevleeschowwerMJ (1993) *Relationship Between Slaym Production, Antibiotic Sensitivity and the Phagotype of Coagulase-Negative Staphylococci*, J Clin Pharm Ther, 18: 271–4.

Baştan A (2002) *İneklerde Meme Hastalıkları*. Hatipoğlu Basım ve Yayım San. Tic. Ltd. Şti. ANKARA.

Bayar S (2007) *Süt Örneklerinden Staphylococcus ve Streptococcus Türlerinin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Antibiyotik Dirençlerinin Belirlenmesi*. T.C Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi. Kahramanmaraş. Temmuz.

Bekar M (1997) *Enterobacteriaceae Familyası Mikroorganizmaların Genel Karakterleri ve Tanı Yöntemleri*. Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Ankara, TÜRKİYE. Yayın No: 97–105, s: 5–45.

Bilgehan H (1992) *Klinik Mikrobiyoloji. Özel Bakteriyoloji ve Bakteri İnfeksiyonları*. Barış Yayınları, Fakülteler Kitabevi, İzmir, TÜRKİYE.

Bilgehan H (2000) *Gram Olumlu Koklar*. Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. Fakülteler Kitabevi, İzmir, TÜRKİYE. s: 239–68.

Bradley A J (2002) *Bovine Mastitis: An Evolving Disease*. Vet J, 164: 116–28.

Brandt CM, Rouse MS, Tallan BM, Laue NW, Wilson WR, Steckelberg, JM (1995) *Effective Treatment or Cephalosporin-Rifampicin Combinations Against Cryptic Methicillin-Resistant Beta-Lactamase-Producing Coagulase-Negative Staphylococcal Experimental Endocarditis*. Antimicrob Agents Chemother, 39: 1815–9.

CASF (2007) *Comite de l'antibiogramme de la Societe francaise de microbiologie: communique*.

Catalanotti P, Lanza M, Del Prete A, Lucido M, Catania MR, Galle F, Boggia D, Perfetto B, Rossano F (2005) *Slime-Producing Staphylococcus epidermidis and S. aureus in Acute Bacterial Conjunctivitis in Soft Contact Lens Wearers*. New Microbiol, 28: 345–54.

Cauwelier B, Gordts B, Descheemaeker P, Van Landuyt H (2004) *Evaluation of a Disk Diffusion Method with Cefoxitin (30 microg) for Detection of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 23: 867–8.

Cengiz AT (1999) *Staphylococcus*. Ustaçelebi Ş. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Güneş Kitabevi, Ankara, TÜRKİYE. s: 339–46.

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

Cengiz AS, Us E, Cengiz AT (2006) *The Clinical Importance of Slime Production*. İnönü Üniv Tıp Fak Derg, 13: 193–97.

Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH (1982) *Adherence of Slime Producing Strains of Staphylococcus epidermidis to Smooth Surfaces*. Infect Immun, 37: 318–26.

Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH (1985) *Adherence of Coagulase-Negative Staphylococci to Plastic Tissue Culture Plates: A Quantitative Model For The Adherence of Staphylococci to Medical Devices*. J Clin Microbiol, 22: 996–1006.

Christensen GD, Baldassari L, Simpson WA (1994) *Colonization of Medical Devices by Coagulase-Negative Staphylococci*. Bisno A, Waldvogel FA, editors. Infections associated with indwelling Medical devices. 2 nd ed. Washington DC: ASM Pres, USA. p: 45–78.

Chai H, Archambault M, Prescott JF (2003) *16S Ribosomal RNA Sequence-Based Identification of Veterinary Clinical Bacteria*. J Vet Diagn Invest, 15: 465–69.

Chambers HF (1997) *Methicillin Resistance in Staphylococci: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications*. Clin Microbiol Rev, 10: 781–91.

CLSI (2005) *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement*. CLSI Document M100-S15 Pennsylvania.

CLSI (2006) *Clinical and Laboratory Standards Institute 2006 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 15th informational supplement. Approved standard MS100-S16*. Wayne, PA.

Costa EO, Melville PA, Ribeiro AR, Watanabe ET, Pardo RB, Paroları MCF (1995) *Prototheca spp. Bovine Mastitis Emergent Pathogens*. In: Proc. 3 rd International Mastitis Seminar. IDF; Tel Aviv, 2- 72.

Çelik İ, Cihangiroğlu M, Çabalak M, Sevim E, Akbulut A, Kılış SS (2005a) *Hastane Kaynaklı Koagülaz Negatif Stafilokoklarda Fosfamisin Duyarlılığı ile Metisilin Direnci ve Slaym Yapımı Arasında İlişki*. Ankem Derg, 19: 139–43.

Çelik İ, Cihangiroğlu M, Sevim E, Çabalak M, Akbulut A (2005b) *Sağlık Çalışanlarının Burunlarından İzole Edilen Koagülaz Pozitif ve Koagülaz Negatif Stafilokoklarda Metisilin Direnci ve Slaym Pozitifliği*. Fırat Tıp Derg, 10: 123–26.

Delialioğlu N, Gedikoğlu S (2001) *Koagölaz Negatif Stafilokoklarda Slaym Yapımı ve Klinik Uyum Arasındaki İlişki*. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 31: 136–42.

Denyer SP, Davies MC, Evans JA, Finch RG, Smith DG, Wilcox MH, Williams P (1990) *Influence of Carbon Dioxide on The Surface Characteristics and Adherence Potential of Coagulase-Negative Staphylococci*. J Clin Microbiol, 28: 1813–7.

Devriese LA, Hommez J (1975) *Epidemiology of Methicillin Resistant Staphylococcus aureus in Dairy Herds*. Res Vet Sci, 19: 23–7.

Diaz-Mitoma F, Harding GK, Hoban DJ, Roberts RS, Low DE (1987) *Clinical Significance of a Test for Slime Production in Ventriculoperitoneal Shunt Infections Caused by Coagulase-Negative Staphylococci*. J Infect Dis, 156: 555–60.

Doebbeling BN (1994) *Nazal and Hand Carriage of Staphylococcus aureus in Healthcare Workers*. J Chemother, 6 Suppl 2: 11.

Erdem H, Atasever S (2004) *Süt Sığırlarında Mastitisin Tanımı, Teşhisi ve Korunma Yolları*. Ondokuz Mayıs Üniv. Ziraat Fakültesi Derg 19: 100–8.

Elçi S, Gül K, Özel F, Suay A, Mete Ö. (1996) *Koagölaz Negatif Stafilokoklarda Makro ve Mikro Yöntemle “Slaym” Oluşumunun Saptanması ve Antibiyotik Direncinin Araştırılması*. İnfek Derg, 10: 203–6.

Ehlert K (1999) *Methicillin-Resistance in Staphylococcus aureus Molecular Basis, Novel Targets And Antibiotic Therapy*. Curr Pharm Des, 5: 45.

Falk D, Guering S J (1983) *Differentiation of Staphylococcus and Micrococcus spp. with the Taxo A Bacitracin Disk*. J Clin Microbiol, 18: 719–21.

Felten A, Grandy B, Lagrange PH, Casin I (2002) *Evaluation of Three Techniques for Detection of Low Level Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA): A Disk Diffusion Method with Cefoxitin and Moxalactam, the Vitek 2 System, and the MRSA-Screen Latex Agglutination Test*. J Clin Microbiol, 40: 2766–71.

Freeman, DJ, Falkiner FR, Keane CT (1989) *New Method for Detecting Slime Producing by Coagulase Negative Staphylococci*. J Clin Pathol, 42: 872–74.

Giannechini R, Concha C, Rivero R, Delucci I, López M J (2002) *Occurrence of Clinical and Sub-Clinical Mastitis in Dairy Herds in the West Littoral Region in Uruguay*. Acta Vet. Scand, 2002, 43, 221–30.

Grinholc M, Wegrzyn G, Kurlenda J (2007) *Evaluation of Biofilm Production and Prevalance of the icaD Gene in Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus Strains Isolated from Patients with Nasocomial Infections and Carriers*. FEMS Immunol Med Microbiol, 50: 375–9.

Gülcü HB, Ertuş HB (2004): *Bacteriological Investigation of Udder Lobes of Cows with Mastitis Slaughtered in the Elazığ Region*. Tr J Vet Anim Sci, 28: 91–4.

Güler L, Ok Ü, Gündüz K, Gülcü Y, Hadimli HH (2005) *Antimicrobial Susceptibility and Coagulase Gene Typing of Staphylococcus aureus Isolated from Bovine Clinical Mastitis Cases in Turkey*. J Dairy Sci, 88: 3149–54.

Hartman BJ, Tomas A (1984) *Low-Affinity Penicillin-Binding Protein Associated With -Lactam Resistance in Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 158: 513–6.

Hartstein AI, Mulligan ME (1986) *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*. In: Glen Mayhall C, ed. Hospital Epidemiology and Infection Control. Maryland: Williams and Wilkins, p: 290–306.

Hebert GA, Cooksey RC, Clark NC, Hill BC, Jarvis WR, Thornsberry C (1988) *Biotyping Coagulase-Negative Staphylococci*. J Clin Microbiol, 26: 1950–6.

Hiramatsu K, Katayama Y, Yuzawa H, Ito T (2002) *Molecular Genetics of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*. Int J Med Microbiol, 292: 67–74.

Jayarao BM, Doré JJ, Baumbach GA, Matthews KR, Oliver SP (1991) *Differentiation of Streptococcus uberis from Streptococcus parauberis by Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of 16S Ribosomal DNA*. J Clin Microbiol, 29: 2774–78.

Jevons MP (1961) *'Celbenin'-Resistant staphylococci*. Br Med J, 1: 124–5.

Jones TO, Heath PJ (1985) *β -laktamase Production in Staphylococcus aureus Isolated from Bovine Mastitis Milk*. Vet Rec, 117: 340.

Juhász-Kaszanyitzky É, Jánosi S, Somogyi P, Dán Á, Bloois L G, Duijkeren E, . Wagenaar J A (2007) *MRSA Transmission Between Cows and Humans*. E Infec Dis, 13: 630–2.

Kaleli İ, Demir M (1999) *Koagülaz Negatif Stafilokoklarda Slaym Faktör Yapımının İki Ayrı Yöntem ile ve Farklı Atmosfer Ortamlarında Araştırılması*. Türkiye Tıp Derg, 6: 226–30.

Karaca N, Koç AN, Karagöz S (2001) *Kan ve Vajen Örneklerinden İzole Edilen Candida Türlerinin Slaym Aktiviteleri*. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 31: 224–6.

Keskin O, Altay G, Akan M (2003) *Farklı Hayvansal Kaynaklardan İzole Edilen Koagülaz Negatif Stafilokoklarda Slime Üretimi ve Adherans*. Turk J Vet Anim Sci, 27: 253–7.

Kırkan Ş, Göksoy EÖ, Kaya O (2005) *Identification and Antimicrobial Susceptibility of Staphylococcus aureus and Coagulase Negative Staphylococci From Bovine Mastitis in The Aydın Region of Turkey*. Turk J Vet Anim Sci, 29: 791–6.

Kiraz N (1993) *Koagülaz Negatif Stafilokokların “Slaym” Oluşturmaları ve Bazı Antibiyotiklerin “Slaym” Oluşumuna Etkileri*. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 23: 219–25.

Kireççi E, Çolak A (2002) *Kuru Dönem Başlangıcında Subklinik Mastitisli İneklerden İzole Edilen Stafilokok Suşlarında Metisilin Direnci*. Kafkas Üniv Vet Fak Derg, 98–100.

Kloos WE, Bunnerman TL (1995) *Staphylococcus and Micrococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 6.th ed. Washington DC: ASM Press: 282–98.

Koneman E W, Allen S D, Janda W M, Schreckenberger P C, Winn W C (1997). *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. The gram-positive cocci: Part–1: Staphylococci and related organisms. Lippincott, New York, Fifth Edition, p: 539–76.

Kotilainen P (1990) *Association of Coagulase-Negative Staphylococcal Slime Production and Adherence with the Development and Outcome of Adult Septicemias*. J Clin Microbiol, 28: 2779–85

Köksal İ (1992) *Metisiline Dirençli Stafilokokların Epidemiyolojisi ve Diğer Antibiyotiklere Duyarlılığı*. Ankem Derg, 6: 292–5.

Kristinsson KG, SpencerRC, BrownCB (1986) *Clinical Importance of Production of Slime by Coagulase-Negative Staphylococci in Chronic Ambulatory Peritoneal Dialysis*. J Clin Pathol, 39: 117–8.

Kuyucuoğlu Y, Uçar M (2001) *Afyon Bölgesi Süt İneklerinde Subklinik ve Klinik Mastitislerin Görülme Oranları ve Etkili Antibiyotiklerin Tespiti*. Vet Hek Mikrobiyol Derg, 1: 19–24.

Lakew M, Tolosa T, Tigre W (2009) *Prevalence and Major Bacterial Causes of Bovine Mastitis in Asella, South Eastern Ethiopia*. Trop. Anim. Health. Prod. DOI 10.1007/s11250-009-9343-6.

Lassen J (1975) *Rapid Identification of Gram Negative Rods Using a Three-Tube Method Combined with a Dichotomic Key*. Acta Pathol Microbiol Scand Sect B, 83: 525–533.

Leonard FC, Markey BK (2008) *Meticillin-Resistant Staphylococcus aureus in Animals: A review*. Vet J, 175: 27–36.

Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gaudochon V, Vandenesch F, Etienne J. (1999) *Involvement of Panton-Valentine Leukocidin-Producing Staphylococcus aureus in Primary Skin Infections and Pneumonia*. Clin Infect Dis, 29: 1128–32.

Ludwig W, Schleifer KH (1992): *Bacterial Phlogeny Based on 16S 23sRNA Sequence Analysis*. FEMS Microbiol Rev, 15: 155–73.

Malm A, Biernasiuk A, Los R, Kosikowska U, Juda M, Korona-Glowniak I, Gorniewski G (2005) *Slime Production and Cell Surface Hydrophobicity of Nasopharyngeal and Skin Staphylococci Isolated from Healthy People*. Pol J Microbiol, 54: 117–21.

Matsunaga T, Kamata S, Kakiichi N, Uchida K (1993) *Characteristics of Staphylococcus aureus Isolated from Peracute, Acute and Chronic Bovine Mastitis*. J Vet Med Sci, 55: 297–300.

Mehndiratta PL, Bhalla P, Ahmed A, Sharma YD (2009) *Molecular Typing of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Strains by PCR-RFLP of SPA gene: a Reference Laboratory Perspective*. Indian J Med Microbiol, 27: 116–122.

Morgan M (2008) *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus and Animals: Zoonosis or Humanosis*. J Antimicrob Chemoth, doi: 10.1093/jac/dkn405.

Myllys V, Aspulund K, Brofeldt E, Hirvela-Koski V, Honkanen-Buzalski T, Junttila J, Kulkas L, Myllykangas O, Niskanen M, Saloniemi H, Sandholm M, Saranpa T (1998) *Bovine mastitis in Finland in 1988 and 1995 Changes in Prevalence and Antimicrobial Resistance*. Acta Vet Scand, 39: 119–26.

NCCLS (2003) *Methods for Dilution Antimicrobial Disk Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard*. 6th ed. NCCLS Document M7–A6 (ISBN 1–56238–486–4). Wayne, Pennsylvania.

Nourizadeh E, Sultan N (1993) *Koagulaz-Negatif Stafilokoklarda Slaym Faktör Yapımının Çeşitli Yöntemlerle Gösterilmesi*. İnfeksiyon Derg, 7: 31–4.

Pitkala A, Haveri M, Pyorala S, Myllysi V, Honkanen-Buzaski T (2004): *Bovine Mastitis in Finland 2001-Prevalance, Distribution of Bacteria, and Antimicrobial Resistance*. J Dairy Sci, 87: 2433–41.

Rantakokko-Jalava K, Nikkari S, Jalava J (2000) *Direct Amplification of RNA Genes in Diagnosis of Bacterial Infections*. J Clin Microbiol, 38: 32–9.

Rich M, Roberts L, Kearns AM (2005) *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Isolates from Companion Animals*. Vet Microbiol; 105: 313–4.

Rişvanlı A, Kalkan C (2002) *Sütçü İneklerde Yaş ve Irkın Sublinik Mastitisli Memelerin Sütlerindeki Somatik Hücre Sayıları ile Mikrobiyolojik İzolasyon Oranlarına Etkisi*. YYÜ Vet Fak Derg, 13: 84–87.

Schalm OW, Noorlander DO (1957) *Experiments And Observations Leading To Development Of The California Mastitis Test*. J Am Vet Med Assoc: 130: 199–207.

Schroeder JW (1997) *Clinical Mastitis can Affect Reproductive Performance*. North Dakota State University NDSU Extension Service. 7: 1–6.

Schaberg DR, Culver DH, Gaynes RP (1991) *Major Trends in the Microbial Etiology of Nosocomial Infection*. Am J Med, 91 (suppl 3B), 72.

Schmitz FJ, Jones ME (1997) *Antibiotics for Treatment of Infections Caused by MRSA and Elimination of MRSA Carriage. What are the choices?* Int J Antimicrob Agents, 9: 1–19.

Sghir A, Antonopoulos D, Mackie RI (1998) *Design and Evaluation of a Lactobacillus Group-Specific Ribosomal RNA-Targeted Hybridization Probe and Its Application to the Study of Intestinal Microecology in Pigs*. Syst Appl Microbiol, 21: 291–296.

Shitandi A, Anakalo G, Galgalo T, Mwangi M (2004) *Prevalence of Bovine Mastitis Amongst Small Holder Dairy Herds in Kenya*. Israel J Vet Med, 59: 1–6.

Songür M, Sayan M, Yüce A, Yuluğ N (1998) *Koagülaz Negatif Stafilokoklarda Slaym Üretimi İle Değişik İnkübasyon Ortamlarının İlişkisi*. İnfeksiyon Derg, 12: 29–33.

Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon J J, Gibson G, Collins MD, Dore J (1999) *Direct rDNA Community Analysis Reveals a Myriad of Novel Bacterial Lineages within the Human Gut*. Appl Environ Microbiol, 65: 4799–4807.

Sümbüloğlu V, Sümbüloğlu K (1993) *Biyoistatistik*. Özdemir Yayıncılık. Ankara, TÜRKİYE. s: 156–74.

Swenson JM, Fred CT, and the Cefoxitin Disk Study Group (2005) *Results of Disk Diffusion Testing with Cefoxitin Correlate with Presence of mecA in Staphylococcus spp.* J Clin Microbiol, 43: 3818–23.

Taponen S, Simojoki H., Haveri M., Larsen HD, Pyorala S (2006) *Clinical Characteristics and Persistence of Bovine Mastitis Caused by Different Species of Coagulase Negative Staphylococci Identified with API or AFLP*. Vet Microbiol, 115: 199–207.

Taponen S, Pyorala S (2009) *Coagulase-Negative Staphylococci as Cause of Bovine Mastitis—Not so different from Staphylococcus aureus?* Vet Microbiol, 134: 29–36

Tel OY, Keskin O, Zonturlu KA, Kaya NBA (2009): *Şanlıurfa Yöresinde subklinik mastitislerin Görülme Oranı, Aerobik Bakteri İzolasyonu ve Duyarlı Antibiyotiklerin Belirlenmesi*. FÜ Sağ Bil Vet Derg, 23: 101–106.

Telli M, Sümerkan B, Eşel D (2006) *Staphylococcus aureus'ta Metisilin Direncinin Belirlenmesinde Sefoksitin Disk, Oksasilin Disk, Oksasilin Agar Tarama ve PB2a Lateks Testlerinin Karşılaştırılması*. İnfeksiyon Derg, 20: 93–6.

Tekeli T (2005). *Mastitis. AB Sürecinde Kaliteli Süt Üretimi ve Somatik Hücre Sayısı*. Güzelış Matbaası, Konya. s: 19–35.

Tünger A (2004) *Staphylococcus aureus: Mikrobiyoloji, Patogenez ve Epidemiyoloji*. Ulusoy S,Usluer G, Unal S. Gram-Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, TÜRKİYE. s: 9–68.

Tünger A, Çavuşoğlu C, Korkmaz M (2005) *Asya Mikrobiyoloji*. Asya Tıp Kitapevi, İzmir, TÜRKİYE. S: 6.

Türütoğlu H, Erçelik S, Öztürk D (2006) *Antibiotic Resistance of Staphylococcus aureus and Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Bovine Mastitis*. Bull Vet Inst Pulawy, 50: 41–45.

Türkyılmaz, S, Eskiüzmirli S (2006) *Detection of Slime Factor Production and Antibiotic Resistance in Staphylococcus Strains Isolated from Various Animal Clinical Samples*. Turk J Vet Anim Sci, 30: 201–6.

Türkyılmaz S, Tekbıyk S, Oryasin E, Bozdoğan B (2009) *Molecular Epidemiology and Antimicrobial Resistance Mechanisms of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Isolated from Bovine Milk*. Zoonoses Public Hlth, Baskıda.

Ünal S (1996) *Stafilokoklarda Metisilin Direnç Mekanizmaları ve Metisilin Direnç Tespit Yöntemleri*. Flora, 1: 14–7.

Ünal S (2006) *Toplumda Kazanılmış Metisilin Dirençli Staphylococcus aureus: Genetik Özellikler*. Ankem Derg, 20: 100–1.

Ünal S, Akhan S (1996) *Stafilokok İnfeksiyonları*, Editörler: Wilke Tally FP, 1993, Staphylococci: Abscesses and Other Diseases, Schaechter, M., Medoff, G., Einstein Bl. eds. Mechanisms of Microbiol Disease, Williams and Wiskins, Maryland, USA. p: 187.

Vasudeva P, Kumar M, Nair M, Annamalai T, Venkitanarayanan KS (2003) *Phenotypic and Genotyping Characterization of Bovine Mastitis Isoletes of Staphylococcus aureus for Biofilm Formation*. Vet Microbiol, 92: 179–85.

Waldvogel FA (2000) *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Mandell, Douglas and Bennet's Principles and Practice of Infectious Diseases. New York: Churchill Livingstone, USA. p: 2069–92.

Watts JL, Salmon AS (1997) *Activity of Selected Antimicrobial Agents Against of Staphylococcus aureus Isolated from Bovine Intramammary Infections that Produce β -Lactamase*. J Dairy Sci, 80: 788–91.

Witte W (1999) *Antibiotic Resistance in Gram-Positive Bacteria: Epidemiological Aspects*. J Antimicrob Chemother, 44: 1–9.

Woo PC, Leung AS, Leung KW, Yuen KY (2001) *Identification of Slide Coagulase Positive, Tube Coagulase Negative Staphylococcus aureus by 16S Ribosomal RNA Gene Sequencing*. Mol Pathol, 54: 244–7.

Yıldırım N, Sezen Y, Ardıç N, İleri Ç. (2008) *Farklı Klinik Örneklerden İzole Edilen Koagulaz Negatif Stafilokoklarda Slaym Faktör Üretiminin ve Bazı Antibiyotiklere Duyarlılıklarının Araştırılması*. İnfeksiyon Derg, 22: 209–14.

Yoshida M, Kashiwagi Y, Okuda M, Tsumagari F (1998) *Differantion of Coagulase Negative Staphylococci (CNS) from Cases of Bovine Mastitis and Their Antibiotic Sensitivity*. J Vet Med, 51: 893–6.

ÖZGEÇMİŞ

1972 yılında Aydın'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Aydın'da tamamladı. 1991 yılında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni kazandı ve 1996 yılında mezun oldu. Askerlik Görevini Şırnak Akçay'da Gıda Kontrol Subayı ve Muayene Komisyon Üyesi olarak yaptı. 2000 yılından itibaren sahada serbest klinisyen olarak çalışmaktadır.

Evli, iki çocuk babası ve İngilizce bilmektedir.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez konusunun seçimi ve çalışmaların yürütülmesinde yardımlarını esirgemeyen, tez danışmanım Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ'a, çalışmalarımda desteklerini gördüğüm Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Osman KAYA ve diğer Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri ile özellikle Araştırma Görevlisi Uğur PARIN'a, ADÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda ve Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezileri'de görevli bulunan Doç. Dr. Bülent BOZDOĞAN'a, ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü yüksek lisans öğrencisi Emel İNEGÖL'e, Fen Bilimleri Enstitüsü doktora öğrencisi Erman ORYAŞIN'a ve öğrenci Ömer YILDIZ'a, materyal temininde kolaylık sağlayan işletme sahiplerine, ayrıca tezimin her aşamasında manevi desteğini esirgemeyen sevgili eşime ve küçük oğullarıma teşekkürler ederim.

