T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİK-YL-2014-0004

SUBKLİNİK MASTİTİSLİ KEÇİLERDEKİ *KOAGULAZ NEGATİF STAFİLOKOKLAR*IN SAPTANMASI VE ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Vet. Hek. Neşe UÇAN

DANIŞMAN
Prof. Dr. Osman KAYA

AYDIN – 2014

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİK-YL-2014-0004

SUBKLİNİK MASTİTİSLİ KEÇİLERDEKİ *KOAGULAZ NEGATİF STAFİLOKOKLAR*IN SAPTANMASI VE ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Vet. Hek. Neşe UÇAN

DANIŞMAN
Prof. Dr. Osman KAYA

AYDIN - 2014

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

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Vet. Hek. Neşe UÇAN tarafından hazırlanan **"Subklinik Mastitisli Keçilerdeki *Koagulaz Negatif Stafilokokların* Saptanması ve Antibiyotik Dirençliliklerinin Belirlenmesi"** başlıklı tez, 16/01/2014 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı ve Soyadı :	**Üniversitesi :**	**İmzası:**
1- Prof. Dr. Osman KAYA	Adnan Menderes Ünv.	
2- Prof. Dr. Hakan YARDIMCI	Ankara Ünv.	
3- Prof. Dr. Şükrü KIRKAN	Adnan Menderes Ünv.	

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

Prof. Dr. Sacide KARAKAŞ
Enstitü Müdürü

Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **09100- AYDIN**
Santral : (256) 218 20 00 **Direkt Telefon :** 218 20 44 ***Fax** : (256) 218 20 44

ÖNSÖZ

Subklinik mastitisli sütçü keçilerde *Koagulaz Negatif Stafilokoklar* süt örneklerindeki izole edilen patojenler açısından dünya genelinde % 44,7-% 95,9 oranlarında morbiditeye sahip olarak rapor edilmiştir. Sütçü keçi çiftliklerinde subklinik mastitis vakalarının ortalama prevalansı ise dünya genelinde % 20-% 35 arasında seyretmektedir ve düşük süt kalitesi ile süt üretimindeki redüksiyondan dolayı önemli ekonomik kayıplarla sonuçlanmaktadır.

Çiftliklerde kullanılan antibiyotiklerin meme içi uygulanması azalmıştır. Çünkü bu durumun kuru dönemdeki küçükbaş hayvanlarda subklinik mastitis tedavisi için etkili olduğu kanıtlanmıştır. Etkili meme içi antibiyotik tedavisi memede biyofilm üreten Stafilokoklar tarafından elimine edilebilmektedir. Süt çiftliklerinde antibiyotiklerin yaygın kullanımı seleksiyona ve antibiyotik dirençli bakteriyel suşların ortaya çıkmasına yol açabilmektedir. Çoklu dirençliliğe sahip suşların ve özellikle metisilin dirençli *Koagulaz Negatif Stafilokok* suşlarının sütlerde belirlenmesi, etkenin potansiyel yayılımı için önemli bir sorun olarak görülmektedir. Metisilin dirençli *Koagulaz Negatif Stafilokok* suşlarında dirençlilik, tüm beta-laktam antibiyotiklere dirençliliği sağlayan düşük-affiniteli penisilin bağlayan proteini (PBP2) kodlayan *mecA* geninin varlığı ile karakterize edilmektedir. Sütçü keçilerde ise *Koagulaz Negatif Stafilokokları*n yayılımı ve söz konusu patojenlerin antibiyotik dirençlilikleri hakkında yapılan araştırmalara sık olarak rastlanamamaktadır.

Bu çalışmada Aydın yöresinde halk elinde bulunan keçilerden süt örnekleri alınarak *Koagulaz Negatif Stafilokok* varlığı açısından kontrol edilmesi ve elde edilen suşların antibiyotiklere duyarlılıklarının saptanması amaçlanmıştır. Böylece yetiştiricilere rehber olunması, ayrıca konvansiyonel ve moleküler metotların eş zamanlı olarak uygulanabilirliğinin ortaya konması amaçlanmaktadır.

Araştırmamız, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından VTF-12028 kodlu proje olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Epidemiyoloji	2
1.2. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri	3
1.3. Kültür Özellikleri	4
1.4. Patojenite Determinantları	4
1.5. Toksin ve Enzimleri	6
1.5.1. Katalaz	6
1.5.2. Koagulaz	7
1.5.3. Penisilinaz (Beta-laktamaz)	7
1.5.4. Diğer Enzimler	8
1.5.5. Hemolizinler	8
1.5.6. Lökosidin	9
1.5.7. Eksfoliatif toksin	9
1.5.8. Toksik Şok Sendrom Toksin-1 (TSST-1)	9
1.5.9. Enterotoksinler	10
1.6. Patogenezis	10
1.7. Teşhis	11
1.7.1. Klinik Teşhis	11
1.7.2. Laboratuvar Muayenesi	11
1.7.2.1. Bakteriyoskopi	11
1.7.2.2. Kültür	11
1.7.2.3. Biyokimyasal Testler	13
1.7.2.3.1.Katalaz Testi	13
1.7.2.3.2. Koagulaz Testi	13
1.7.2.4. Ek Doğrulayıcı Testler	15
1.7.2.4.1. Deoksiribonükleaz (DNAz) Testi	15
1.7.2.4.2. Termostabil Endonükleaz Testi	16
1.7.2.4.3. Mannitol Fermentasyonu	16
1.7.2.5. Diğer Testler	17
1.7.2.6. Slaym Oluşumu	17
1.7.2.6.1. Christensen Yöntemi (Kalitatif Tüp Testi, TT)	17
1.7.2.6.2 Kantitatif Mikrodilüsyon Plak Testi (MT)	17
1.7.2.6.3. Kongo Kırmızılı Agar Yöntemi (KKA)	18
1.8. *Koagulaz Negatif Stafilokokları*n İdentifikasyonu	19

1.8.1. *S. epidermidis* İdentifikasyonunda Fosfataz Üretimi 19
1.8.2. *S. epidermidis* ve *S. hominis*'in İdentifikasyonunda Desferrioksamin Duyarlılığı 20
1.8.3. *S. saprophyticus*'un İdentifikasyonu İçin Novobiosin Duyarlılığı 20
1.8.4. *S. saprophyticus* ve *S. epidermidis* İdentifikasyonunda Trehaloz-Mannitol-Fosfataz Agar 21
1.8.5. *S. aureus, S. epidermidis* ve *S. saprophyticus*'un İdentifikasyonunda Florojenik/Kromojenik Metotlar 21
1.8.5.1. Rapidec Staph 21
1.8.6. Geleneksel İdentifikasyon Prosedürleri 22
1.8.7. Ticari İdentifikasyon Sistemleri 23
1.8.7.1. API Staph-Ident 23
1.8.7.2. API Staph 23
1.8.7.3. ID32 Staph 24
1.8.7.4. Vitek Gram Pozitif İdentifikasyon (GPI) Kartı 24
1.8.7.5. MicroScan Rapid Pos Combo Paneli 24
1.8.7.6. Staph-Sistem 18-R 24
1.8.7.7. Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemi 25
1.8.7.8 Biyolog Mikro Pleyt İdentifikasyon Sistemi 25
1.9. Antibiyotik Dirençliliği 31
1.10. Stafilokoklarda Metisilin Direncinin Mekanizmaları 32
1.10.1. mec DNA 32
1.10.2. mecA 32
1.10.3. mecI ve mecR1 34
1.11. Metisilin Dirençlilik Çeşitleri 35
1.11.1. İntrinsik Metisilin Direnci 35
1.11.2. "Borderline" Metisilin Direnci 37
1.11.3. "Intermediate" Metisilin Direnci 38
1.12. Metisilin Direncinin Düzenlenmesi 38
1.12.1. İç Faktörler 38
1.12.2. Dış Faktörler 41
1.13. Antibiyotik Duyarlılık Testleri 41
1.13.1. Agar Dilusyon Yöntemi 42
1.13.2. Disk Difüzyon Yöntemi 42
1.13.3. E-test 43
2. GEREÇ VE YÖNTEM 44
2.1. Gereç 44

2.1.1. İzolasyon Örnekleri 44
2.1.2. Besiyerleri, Ayıraçlar, Solusyonlar ve Antibiyotik Diskleri 44
2.1.2.1. Besiyerleri 44
2.1.2.1.1. Blood Agar (Merck 1. 10886) 44
2.1.2.1.2. Mannitol Salt Phenol Red Agar (MSA) (Merck 1.05404) 44
2.1.2.1.3. Mueller-Hinton Agar (MHA) (Oxoid CM 129) 45
2.1.2.1.4. Katyonu Ayarlanmış Mueller-Hinton Broth (CAMHB) (Oxoid CM 0405) 45
2.1.2.1.5. Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (% 20 Gliserinli) (Oxoid CM 0225) 45
2.1.2.1.6. Tryptic Soy Broth (CASO) (Merck 1.05459) 45
2.1.2.1.7. DNAse Test Agar (Merck 1.10449) 46
2.1.2.1.8. Urea Broth (Merck 1.08483) 46
2.1.2.1.9. Antibiyotik Sulandırmaları 46
2.1.2.2. Solusyonlar 47
2.1.2.2.1. TAE Elektroforez Buffer 47
2.1.2.2.2. Gel Loading Buffer (6 X) 47
2.1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) 47
2.1.3.1. Kullanılan Cihazlar 47
2.1.3.2. MgCl2, Taq DNA Polymerase, 10X Taq Buffer, dNTP Set 47
2.1.3.3. Primerler 48
2.1.4. Elektroforez Cihazı 48
2.1.4.1. Agarose Jel Hazırlanışı 48
2.1.4.2. Marker 48
2.1.4.3. Etidyum Bromür 49
2.1.4.4. Standart Suşlar 49
2.2. Yöntem 49
2.2.1. Örneklerin alınması 49
2.2.2. *Staphylococcus spp.* izolasyonu 49
2.2.2.1. Gram Pozitif Kokların İdentifikasyon 50
2.2.2.1.1. Katalaz Testi 50
2.2.2.1.2. Basitrasin Duyarlılığı 50
2.2.2.1.3. Koagulaz Testi 50
2.2.2.1.4. Mannitol Fermentasyonu 50

2.2.2.1.6. DNAse Testi 51
2.2.2.2. Antibiyogram 51
2.2.2.2.1. Bakteri İnokulumun Hazırlanması 51
2.2.2.2.2. Broth Mikrodilusyon 51
2.2.3. mecA Geninin Belirlenmesi 51
2.2.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) 52
2.2.3.2. Amplikonların Elektroforez Tankına Yüklenmesi 54
2.2.3.3. Amplikonların Elektroforez Tankında Yürütülmesi 54
2.2.3.4. Görüntüleme ve Değerlendirme 54
3. BULGULAR 55
3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları 55
3.2. Antibiyogram Sonuçları 56
3.3. PCR Bulguları 56
4. TARTIŞMA 59
5. SONUÇ 65
ÖZET 67
SUMMARY 68
KAYNAKLAR 69
ÖZGEÇMİŞ 78
TEŞEKKÜR 79

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	Stafilokok, Mikrokok ve Makrokok türlerinin fenotipik özellikleri	12
Çizelge 1.2.	Novobiosine duyarlı *Koagulaz Negatif Stafilokokları*n identifikasyon karakterleri	26
Çizelge 1.3.	Novobiosine dirençli *Koagulaz Negatif Stafilokokları*n identifikasyon karakterleri	29
Çizelge 1.4.	Metisilin Direnç Seviyesini Etkileyen Kromozomal Genler	40
Çizelge 2.1.	Çalışmada kullanılan primerler	48
Çizelge 2.2.	Mastermiksin hazırlanma oranları	53
Çizelge 2.3.	PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı	53
Çizelge 3.1.	İzole edilen *Koagulaz Negatif Stafilokok* türleri ve oranları	55
Çizelge 3.2.	Antibiyogram sonuçlarının *Koagulaz Negatif Stafilokok* suşlarına göre dağılımı	56
Çizelge 3.3.	PCR pozitif örnek sayıları ve yüzdeleri	57

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	Stafilokoklarda *mec* geni sınıfları	34
Şekil 3.1.	Keçi kökenli *Koagulaz Negatif Stafilokok* izolatlarında *mecA* direnç geni varlığı	58

1. GİRİŞ

Stafilokoklar ilk kez 1878'de Robert Koch tarafından tanımlanmış, 1880'de Pasteur, sıvı besiyerinde üretmiş, 1881 yılında Sir Alexandar Ongston bazı piyojenik apselerde etken olarak gruplar halinde koklar görerek bunları "*Stafilokok*" olarak isimlendirmiştir (Archer 1990). Mikroorganizmanın izole edilmesi ve laboratuvar özellikleri 1884 yılında Rosenbach tarafından gerçekleştirilmiştir. Rosenbach bu mikroorganizmanın iki farklı renkte koloni oluşturduğunu gözlemiş, sarı-portakal renkli kolonileri *S.pyogenes aureus*, beyaz kolonileri *S. pyogenes albus* olarak isimlendirmiştir. 1891 yılında *S. epidermis albus* ismi kullanıma girmiştir (Patrick ve ark 1990). Bakterinin Kraus ve Clairmont tarafından 1900'da alfa toksini, Glenny ve Stevens tarafından 1935'te beta toksini bulunmuştur. Smith ve Price 1938'de gama toksin ve Williams ile Harper 1947'de, delta toksin varlığını açıklamışlardır. Todd ve arkadaşları tarafından 1978'de, yeni bir hastalık olarak "Toksik Şok Sendromu" tanımlanmıştır (Akçam ve ark 2007).

Bergey'in "Manuel of Systematic Bacteriology"kitabının 1986 basımında *Micrococcaceae* ailesi 4 cinsi içermekteydi: *Planococcus, Micrococcus, Stomatococcus ve Staphylococcus.* Daha sonraki genetik çalışmalar (DNA-ribozomal RNA hibridizasyon, 16S rRNA sekanslama) ve kemotaksonomik analizler (hücre duvarı kompozisyonu, hücresel yağ asitleri) bu mikroorganizmaların çeşitliliğini göstermiş ve bu dört cinsin tek bir aileye bağlanmaması gerektiğini ortaya koymuştur. Son Bergey's Manual'e göre Stafiokoklar Bacilli sınıfında (ClassIII) Bacillales takımında yer almaktadır. Bu takımda 7 familya vardır ve Veteriner Hekimlikte önemli olan patojenleri içeren iki familya (Listeriaceae ve Staphylococcaceae) bulunur (Winn ve ark 2006).

Günümüze kadar *Staphylococcus* genusunda 33 tür ve 17 alt tür saptanmıştır. Stafilokok 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 Stafilokok infeksiyonlarına öncelikle *S. aureus* neden olmaktadır. Fırsatçı patojenler olan *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* da sıklıkla infeksiyon oluştururken; daha nadiren S. *haemolyticus, S. hominis, S. warneri, S. saccharolyticus, S. cohnii* ve *S. simulans* da fırsatçı infeksiyonlara sebep olmaktadırlar (Bilgehan 2000, Waldvogel 2000).

1.1. Epidemiyoloji

Çevresel kaynaklarda yaygın olarak bulunan Stafilokok türleri, insan ve hayvanların derisinde, üst solunum yolu, alt sindirim ve ürogenital sistem mukoz membranları ile ilişkili mikroorganizmalardır. İnsan ve hayvanların derilerinde *Koagulaz Negatif Stafilokoklar* (KNS) vardır ve nemli deri kıvrımlarının *S. aureus*'la geçici kolonizasyonu yaygındır. Yeni doğanda kesilmiş göbek kordonu, deri ve perineal bölgenin *S. aureus*'la kolonizasyona sık rastlanır. *S. aureus* ve KNS'lar orofarinks, gastrointestinal sistem (GİS) ve ürogenital sistemde de bulunurlar. Büyük çocuk ve erişkinlerde kısa süreli veya kalıcı *S. aureus* taşıyıcılığı, ön nazofarinkste orofarinksten daha yaygındır. Normal sağlıklı erişkinlerin yaklaşık % 15'inde nazofaringial *S. aureus* tayşıyıcılığı bulunmakla birlikte yatan hastalar, sağlık personeli, ekzematöz deri hastalığı olanlar ve sürekli ilaç kullananlarda daha yüksektir. Mukozal epitele bu mikroorganizmaların yapışması Stafilokokal hücre yüzey adezinleri tarafından sağlanır. Stafilokokların deri ve nazofarinkste bulunmalarından dolayı yayılması kolaydır ve birçok hastane kaynaklı infeksiyondan sorumludurlar. Stafilokok türleri insan ve hayvanlarda fırsatçı patojen olarak tanımlanmalarının yanında, hayvanlarda mastitis, kuzu piyemisi, atlarda botriyomikozis

olmak üzere lokal ve genel irinli enfeksiyonlara neden olurlar. İnsanlarda gıda kaynaklı infeksiyonlara neden olduklarından halk sağlığı açısından önemleri bulunmaktadır. Ayrıca dışarıdan alınan gıdalarla sindirim kanalına geçer ve sistemde de geçici flora bakterisi olarak izole edilebilirler. Bu mikroorganizmalar duyarlı kişilere direkt temas ve kontamine materyallerle transfer edilebilir (Murray ve ark 2005).

Stafilokoklar, özellikle eksudatlardaki kurumaya haftalarca dayanıklıdırlar. Özellikle irin ve süt gibi organik materyallerde, değişik çevresel koşullarda yaşam süreleri 2-3 aydan daha fazla olabilir. Bazı suşlar 60ºC'de 30 dakika canlı kalabilir. Ayrıca, pH 4.0-9.5 arasındaki değişimlere ve % 7.5 tuz konsantrasyonuna oldukça dirençlidir. Stafilokoklar genel amaçlı kullanılan dezenfektanlara duyarlıdır, ancak fenolik bileşikler gibi dezenfektanlara dirençlidir (Waldvogel 2000, Bilgehan 2000).

1.2. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri

Stafilokok türleri kok şeklinde, 0.5-1.5µm (ortalama 1µm) çapında, tek tek, çiftler, veya düzensiz kümeler tarzında görünürler. İsmini Yunanca'dan üzüm salkımı anlamına gelen "Staphylo" kelimesinden almıştır (Aydın ve ark, 2006).

Gram pozitif, hareketsiz, sporsuz, kemoorganotrofik bakterilerdir. Genç kültürler kuvvetli gram pozitiftir, ancak eskiyen kültürler gram negatif boyanabilir. Hem oksidatif hem de fermentatif metobolizmaya sahiptirler. Genellikle katalaz pozitiftirler. Sitokromları bulunur, fakat çoğunlukla oksidaz negatiftir. Nitritleri nitratlara indirger. Lizostafin ile lizise duyarlı olmalarına karşın lizozime duyarlı değildirler. Kapsül oluşumu değişkendir. Genellikle kapsül oluşumu kültür işleminin ilk döneminde (3-4 saatlik dönemde) şekillenirken uzayan kültürlerde kapsül oluşumu görülmemektedir. İki türü *S. aureus subsp. anaerobius* ve *S. saccharolyticus* anaerobiktir ve katalaz negatiftir (Alen ve ark 2008, Bannerman 2006).

1.3. Kültür Özellikleri

Stafilokoklar kültür ortamında çabuk üreyen bakterilerdir. Üretilmeleri için temel besiyerleri yeterlidir. Katı ve sıvı besiyerlerinde bir gecelik inkübasyonlarda yoğun olarak ürerler. Stafilokoklar aerop ve fakültatif anaerobik bakterilerdir. Yüksek tuz konsantrasyonunda (% 10 NaCl) ve 18-40 °C arasında klasik besiyerlerinde üreyebilme özelliklerine sahiptir. Optimal üreme ısısı 30-37°C ve pH: 7-7,5'tir. Katı besiyerlerinde kolonileri kısa sürede şekillenir. Besiyeri ve inkubasyon koşullarına bağlı olarak pigmentli koloniler oluştururlar ve kolonilerin çapı 2-4 mm kadardır. Pigmentleri türden türe değişiklik göstermektedir ve beyaz, krem bazen de sarı-kırmızı olabilir. Koloniler, S tipli, kenarları düzgün, yuvarlak ve parlak görünümlüdür. Kanlı agarda üretildiklerinde birçok patojen tür hemoliz oluşturur. CO_2 hemolizin oluşumunu arttırır. Sıvı ortamlarda ise homojen bulanıklık yaparak ürerler ve üreme süresi arttıkça bulanıklık düzeyi de artar ve dipte tortu oluşur. Stafilokok pigmentlerinin suda erimemesi nedeniyle, katı ortamlarda pigmentli olan kolonilerin buyyonda üretilmesi sonrasında pigment oluşumu görülmez. Mikroskopta katı kültürlerden hazırlanan preperatlarda üzüm salkımı şeklinde kok kümeleri görülürken, çalkalanmış sıvı ortamlarda tek tük koklar görülmektedir (Alen ve ark 2008, Bannerman 2006).

1.4. Patojenite Determinantları

Stafilokok türlerinde antijenik yapı oldukça komplekstir ve farklılıklar gösterir. Bu yapıların en önemli özelliklerinden biri, Stafilokoklar ile mikrokokların taksonomik ayrılması için yarar sağlamasıdır. Peptidoglikan; polisakkarit polimer içeren bağlı altbirimler, hücre duvarının sert iskeletini oluşturur. Peptidoglikan kuvvetli asitlerle veya lizozime maruz bırakarak parçalanılır. Bu infeksiyonların patogenezisi açısından önemlidir. Bu monositler tarafından opsonik antikorların ve interleukin-1'in (endojenik pirojen) üretimini aydınlatmaktadır. Bu polimorfnükleer lökositler için kimyasal atraktant olabilir, endotoksin benzeri aktiviteye sahip olabilir, lokalize Shwartzman fenomeni üretebilir ve komplementi aktive edebilir. Gliserol veya ribitol fosfatın polimeri olan teikoik asit peptidoglikana bağlıdır. Protein A, IgG3 dışındaki tüm IgG moleküllerinin Fc kısmına bağlanan *S. aureus* suşlarının hücre duvarı komponentidir ve bazı KNS'larda da bulunur. Protein A'nın engellediği IgG'nin Fab kısmı spesifik antijen ile kombinasyon için serbesttir.

Protein A immunoloji ve diagnostik laboratuvar teknolojisinde önemli bir reaktif olmuştur; örneğin, spesifik bakteriyel antijenlere karşı Ig molekülüne bağlanan protein A bakteriyi aglütine eder (koaglütinasyon) (Brooks ve ark 1997, Aydın ve ark 2006).

Bazı Stafilokok türleri spesifik antikorlar olmadığında polimorfonükleer lökositlerin yaptığı fagositozu inhibe eden kapsüle sahiptir. Birçok *S. aureus* suşunda polisakkarid yapıda bir mikrokapsül bulunmaktadır. Bu ekzopolisakkarid bakteriyi fagositozdan korur ve konak hücrelerine adherensini sağlar (Tünger 2004). Stafilokok türlerinin bir kısmı hücre duvarı yüzeyinde koagulaz veya clumping faktöre sahiptir; koagulaz enzimsel reaksiyon olmadan fibrinojene bağlanır, bakterinin kümelenmesini sağlar (Brooks ve ark 1997).

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 arkadaşları (2003), mastitisli inek sütlerinden ve tavuklardaki lezyonlardan izole edilen patojenik KNS suşlarının, sağlıklı hayvanlardan izole edilen kontrol suşlarına oranla daha fazla oranda slaym oluşturduklarını 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 kullanılabilmektedir (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).

1.5. Toksin ve Enzimleri

Stafilokoklar hem çoklu ve hızlıca dokulara yayılabilir hem de birçok ekstrasellüler substansların üretimi vasıtasıyla hastalık oluşturabilir. Toksinlerin birçoğu plazmidlerin genetik kontrolü altındadır; bir kısmı hem kromozomal hem de ekstrakromozomal kontrol altında olabilir; diğerlerinin genetik kontrolünün mekanizması tam olarak tanımlanamamıştır. Stafilokok türleri ekzoprotein üretimi bakımından oldukça aktiftirler. En aktif tür olan *S. aureus* incelendiğinde, Stafilokokların ekzoproteinleri hakkında detaylı bilgi edinilmesi mümkündür (Brooks ve ark 1997). Bunları genel olarak iki grupta incelemek yararlıdır. İlk grupta suşların virulansını belirleyen yapılar bulunur ve bunlar; koagulaz, hemolizinler (alfa, beta, gamma, delta), nükleazlar (DNAz), proteazlar, esteraz, lipazlar, stafilokinazlar (plazminojen aktivatörü), fosfolipaz, hyaluronidaz ve kollegenazdır. Bu proteinlerin temel görevleri, konakçı dokuda bakteriyel üreme için gerekli olan besinleri ve etkenlerin üremesi için uygun ortamı sağlamaktır. Yukarıda belirtilen ekzoproteinlerden farklı olarak bazı suşlar, bir veya birden daha fazla ilave ekzoprotein sentezler. Bunlar ise; toksik şok sendrom toksin-1 (TSST-1), Stafilokokkal enterotoksnler (SEA, SEB, SECn, SED, SEE, SEG, SEH, SEI), eksfoliatif toksinler (ETA, ETB) ve lökosidin olarak tanımlanmaktadır. Bu toksinlerin her biri immun sistem hücreleri üzerine güçlü etkilere sahiptir (Aydın ve ark 2006).

1.5.1. Katalaz

Stafilokoklar hidrojen peroksidi su ve oksijene dönüştüren katalazı üretir (Brooks ve ark 1997). Hemoprotein yapısındadır. Süperoksit dismutaz ve indirgenmiş flavoproteinlerin oksitlenmesi sırasında bakteri hücresi içerisinde açığa çıkan toksik hidrojen peroksiti su ve oksijene katalize eder (Cauwelier ve ark 2004).

1.5.2. Koagulaz

Stafilokoklar bağlı ve serbest olmak üzere 2 tip koagulaza sahiptir. Ekstraselluler bir proenzimdir. Stafilokok hücre duvarına bağlı koagulaz doğrudan fibrinojeni fibrine dönüştürebilir ve stafilokoklarda kümelenmeye sebep olur. Serbest koagulaz ise bir plazma globulin faktörü (Coagulase Reacting Factor) ile reaksiyona girerek bir trombin benzeri faktör (Staphylothrombin) oluşturur. Bu faktör fibrinojeni fibrine dönüştürerek bağlı koagulazla aynı sonucu oluşturur. Koagulaz, stafilokok absesinin çevresinde fibrin oluşumuna sebep olur ve böylece infeksiyon lokalize edilerek organizma fagositozdan korunur. Stafilokokların başka türleri de koagulaz üretebilir fakat bunlar genellikle hayvan patojenleridir ve nadiren insan infeksiyonuna neden olurlar (Zscheck ve ark 1993).

1.5.3. Penisilinaz (Beta-laktamaz)

Beta-laktamaz enzimi, Penisilinler, Sefalosporinler ve benzeri Beta-laktam antibiyotikleri hidrolize ederek, bu antibiyotiklere direnç gelişimine neden olur. Betalaktam halkasındaki karbonil grubu ile bir ester köprüsü oluşturan bu enzimler, siklik amid bağını bozar ve bir açil-enzim türevi oluştururlar. Bu reaksiyonları sonucunda beta-laktam antibiyotiklerle reaksiyona giren üç grup protein vardır:

1- Karboksi peptidazlar (Düşük molekül ağırlıklı PBP'ler).

2. Transpeptidazlar (Yüksek molekül ağırlıklı PBP'ler)

3. Beta-laktamazlar (Berger-Bachi ve Rohrer 2002)

Geniş bir enzim grubu olan beta-laktamazlar moleküler yapılarına ve işlevsel özelliklerine göre sınıflandırılırlar. Bu güne kadar dört farklı moleküler sınıf (A, B, C, D) tanımlanmıştır. A, C ve D moleküler sınıflarında yer alan Beta-laktamazlar yukarıda açıklanan serin-ester aracılıklı mekanizma ile işlev görürler. Sınıf B Beta-laktamazlar ise kofaktör olarak çinko gerektiren metalloenzimlerdir. A sınıfı, tercihen substratı penisilinler olan beta-laktamazlardan oluşur. Bu grup enzimler içerisinde *S. aureus*'un beta-laktamazları (Grup 2a) da yer alır. Gram (+) bakteriler arasında Beta-laktamaz üreten en önemli patojen Stafilokoklardır. Stafilokokal beta-laktamazlar tercihen penisilinleri hidrolize ederler. Çoğu indüklenebilir ve ekstrasellüler olarak salınabilen enzimlerdir. Stafilokokal Beta-laktamazlar genellikle küçük plazmidlerle veya transpozonlarla

taşınmakla beraber, büyük plazmidlerin kodladığı beta-laktamazlar ve diğer direnç mekanizmaları da bulunmaktadır. Bu Beta-laktamaz enzimini kodlayan genler sadece *S. aureus'*lar arasında değil, *S. aureus* ve *Staphylococcus epidermidis* arasında da konjugasyonla transfer edilebilir (Kuyucu 2007).

1.5.4. Diğer Enzimler

Hyaluronidaz; yayılma faktörü olarak bilinir ve bakterilerin dokulara yerleşmesinde önemli bir faktördür. Bağ dokusunun aseluler matriksindeki asit mukopolisakkaridler olan hiyaluronik asidi hidrolize eden enzimlerdir (Tünger 2004). Lipaz derideki yağ asitlerinin koruyucu etkisini azaltarak deride ve deri altında apse oluşturmaya ortam hazırlar. Stafilokinaz (fibrinolizin) , kollagenaz, streptokinaz, beta laktamaz virulans ile ilgili diğer yapılardır (Brooks ve ark 1997).

1.5.5. Hemolizinler

Stafilokok suşlarında alfa, beta, gamma ve delta olmak üzere 4 farklı hemolizin tanımlanmaktadır. Hemolizinler antijenik, biyokimyasal ve farklı hayvan türlerinin alyuvarlarına etkilerine göre farklılık gösterirler. Alfa hemolizin; eritrositleri lize edebilen ve trombositlere zarar veren heterojen proteindir, muhtemelen ekzotoksinin letal ve dermonekrotik faktörleri ile aynıdır. Alfa hemolizin lipid memranlar üzerine etkilidir, in vitro hemolitiktir ve koloni etrafında tam bir hemoliz zonu oluşturur. Beta hemolizin (sfingomiyelinaz C); sfingomyelini indirger ve insan kırmızı kan hücreleri de dahil birçok hücre türü için toksiktir. Geniş kısmi veya tam olmayan hemoliz oluşturur. Sıcak-soğuk lizis ile geniş hemoliz zonları görülür. Gama hemolizin; agar ve kolesterolün varlığında baskılanan bir aktiviteye sahiptirler. Delta hemolizin; farklı türlere ait eritrositleri deterjan benzeri bir etki ile lize eder fakat serum ile inhibe olur.Antijenik özelliğe sahip değildir (Pereira ve ark 2007).

1.5.6. Lökosidin

Birçok hayvanda bu toksin beyaz kan hücrelerini öldürür. Patogenezdeki rolü tam olarak bilinmemektedir. Çünkü patojen Stafilokoklar lokösitleri öldüremeyebilir ve patojen olmayan çeşitler kadar fagositoz yapabilir. Bununla birlikte onlar aktif intrasellüler multiplikasyonu yapabilir, oysa patojenik olmayan organizmalar hücre içinde ölmeye eğilimlidir. Lökosidin antikorları tekrarlayan Stafilokok infeksiyonlarına karşı direnç oluşturmada rol oynayabilir (Brooks ve ark 1997).

1.5.7. Eksfoliatif toksin

Eksfoliatin A ve B (ETA ve ETB-Stafilokokkal eksfoliatin toksin, sET) bazı *S. aureus* ve *S. hyicus* (shET) suşları tarafından üretilir. ETA ısıya dirençli ve geni kromozomaldir. ETB ise ısıya duyarlı ve plazmid aracılıdır (Bilgehan 2000, Aydın ve ark 2006). Ultrastrüktürel çalışmalar, serin proteazlar olan bu toksinlere maruz kalma sonucunda epidermisin stratum granülosum tabakasındaki intraselllüler köprüler (desmozomlar)'in ayrılmasının gerçekleştiğini göstermiştir. Bu olayın tam mekanizması hala bilinmemektedir. Bu toksinler hücre yıkımı veya inflamasyonla ilişkili değildir. Bu yüzden epidermisin etkilenen tabakasında ne Stafilokoklar ne de lökositler bulunmamaktadır. Epidermisin toksine maruz kalması sonucu koruyucu nötralizan antikorlar gelişir (Livermore 2000). *S. hyicus* bebeklerde Stafilokokkal haşlanmış-deri sendromuna (SSSS) ve domuzlarda da dermatitise yol açar. Spesifik antikorlar toksinin eksfoliatif etkisine karşı koruma sağlar (Aydın ve ark 2006).

1.5.8. Toksik Şok Sendrom Toksin-1(TSST-1)

Önceleri, enterotoksin F ve pirojenik enterotoksin C olarak bilinen TSST-1, ısı ve proteolize dirençli, 22 kD'luk kromozom aracılı bir ekzotoksindir. TSST-1 toksik şok sendromunun çok yönlü manifestasyonlarını destekleyen prototipik süperantijendir. İnsanlarda toksin, deskuamatif deri döküntüsünü de kapsayan multi sistem etkileşimlere, şok ve ateşe neden olur (Brooks ve ark 1997). TSS'li hastalarda ölüm, multiorgan yetmezliğine neden olan hipovolemik şok nedeniyledir (Livermore 2000). Tavşanlarda ise

ateş, bakteriyel lipopolisakkaritlerin etkisiyle duyarlılığın artmasına ve toksik şok sendromuna benzer diğer biyolojik etkilere yol açar, ancak deri döküntüsü ve deskuamasyon oluşmaz (Brooks ve ark 1997).

1.5.9. Enterotoksinler

Stafilokokal gıda zehirlenmeleri, enterotoksijenik özelliğe sahip stafilokokların gıdalarda 10^6 kob/g veya daha yüksek sayıya ulaşması sırasında sentezlenen bir ekzotoksin olan enterotoksinin, alimenter yol ile alımı sonucu oluşmaktadır. *S. aureus* enterotoksijenik stafilokoklar içerisindeki en önemli türdür. *S. aureus* dışında *S. intermedius*, *S. hyicus* ve *S. epidermidis* türleri de enterotoksin oluşturma özelliğine sahiptir (Bilgehan 2000). Bu toksinler Presipitin testleri (jel difüzyon) ile belirlenebilir (Brooks ve ark 1997).

1.6. Patogenezis

Deride oluşan bir yaralanmayı takiben oluşan infeksiyonda yangısal reaksiyonlar infeksiyon bölgesine nötrofillerin gelmesiyle başlar. Bakteri hücre duvarında bulunan peptidoglikan, yangısal cevabın oluşmasında önemli bir faktör olarak görev yapar. İnfeksiyonun ilk aşamasında, bakteriler tarafından salgılanan enzim ve toksinler (hyaluronidaz, hemolizin gibi), dokuda ve kan hücrelerinde hasara neden olur. Lezyonların şiddetlenmesinde ve devamlılığında DNAz, lipaz, koagulaz ve üreazın da önemi büyüktür. *S. epidermidis* gibi non-patojenik, non-invaziv Stafilokoklar koagulaz negatiftir ve non-hemolitik olmaya eğilimlidir. Bu gibi organizmalar nadir iltihaplanmaya yol açar; ancak ortopedik veya kardiovasküler proteazları infekte edebilir ya da immunsuprese kişilerde hastalık nedeni olabilir (Aydın ve ark 2006).

1.7. Teşhis

1.7.1. Klinik Teşhis

Stafilokok türlerinin neden olduğu infeksiyonlarda klinik bulgular diğer bakterilerle oluşturulan tablolara benzerlik gösterdiğinden dolayı, kesin teşhis ancak laboratuvar işlemleri ile gerçekleştirilir (Aydın ve ark 2006).

1.7.2. Laboratuvar Muayenesi

Teşhis amacıyla materyal olarak irinli infeksiyonlarda etkilenen dokulardan svablar, apse içeriği, mastitislerde süt örnekleri, tracheal aspirat ve kan alınmalıdır. Materyal alma aşamasında, Stafilokokların deride ve çevresel kaynaklarda bulunduğu dikkate alınarak olası bulaşmalar engellenmelidir. Alınan örnekler soğuk zincirde laboratuvara ulaştırılmalıdır (Brooks ve ark 1997).

1.7.2.1. Bakteriyoskopi

Örneklerden hazırlanan preperatlar gram yöntemiyle boyandıklarında, Gram pozitif tekli veya kümeler tarzında koklar görülür (Brooks ve ark 1997).

1.7.2.2. Kültür

Laboratuvara ulaşan materyallerden genel amaçlı besiyeri olarak kanlı agar ve McConkey agara ekimler yapılır. Ayrıca çok kontamine ortamlardan Stafilokokların izolasyonu için selektif-ayırıcı besiyerleri de (mannitol salt agar, feniletil alkol agar) kullanılabilir. Köpeklerden deri infeksiyonlarından alınan materyallerde purple agarın kullanılması, *S. aureus* ile *S. intermedius* suşlarının çabuk tanısında yarar sağlar (Brooks ve ark 1997).Ekim işleminin ardından 37˚C'de 24-48 saat aerobik olarak inkubasyondan sonra kanlı agarda Stafilokoklar genellikle beyaz, opak ve 2-4mm çapında koloniler oluşturur. Bazı *Koagulaz Negatif Stafilokok*'ların kolonileri pigmentli olabilir. Koloniler etrafında hemoliz alanları da gözlenebilir. Besiyerinde üreyen kolonilerin, makroskobik ve

mikroskobik morfolojileri, hemolizin varlığı veya yokluğu, MacConkey agarda üreme, katalaz, koagulaz ve biyokimyasal özellikleri değerlendirilerek cins ve tür düzeyinde identifikasyonları gerçekleştirilir (Brooks ve ark 1997, Aydın ve ark 2006).

Genel olarak diğer bakterilerden kolay ayrılmalarına rağmen, Streptokok, Mikrokok ve Enterokok türlerinden ayrılmalıdır. Stafilokoklar genellikle katalaz pozitiftir ve bu reaksiyon katalaz negatif olan Streptokok türlerinden ayrılır. Bu tür mikroorganizmaların mikroskobik görünümleri de belirleyicidir. Stafilokok türleri genellikle düzensiz kümeler yaparken streptokoklar ve Enterokoklar zincir tarzında, Mikrokoklar ise dörtlü gruplar şeklinde görülürler. O-F testinde, Streptokoklar fermentatif özellik gösterirler; ancak katalaz negatif olmaları ayırıcı özelliğidir. Basitrasine (0.004 U), Stafilokok ve Streptokoklar dirençli iken Mikrokok türleri duyarlıdır. Ayrıca Stafilokoklar lizostafine duyarlı iken genel olarak Mikrokoklar dirençlidir. *S. saprophyticus* ve çok nadir olarak izole edilen bazı *Koagulaz Negatif Stafilokoklar* (*S. cohnii*, *S. lentus*, *S. sciuri ve S. xylosus*) novobiosine dirençli olduğu halde *S. epidermidis* ve *S. aureus* duyarlıdır (Anonim 1, Bilgehan 2000). Stafilokokların, Mikrokok ve Makrokoklardan ayrılmasını sağlayan yöntemler Çizelge 1.1.'de özetlenmiştir.

Çizelge 1.1. Stafilokok, Mikrokok ve Makrokok türlerinin fenotipik özellikleri (Bilgehan 2000, Waldvogel 2000).

Karakteristik özellik	***Staphylococcus spp.***	***Micrococcus spp.***	***Macrococcus spp.***
Koloni büyüklüğü	0.6-1.5 µm	1-1.8 µm	1.3-2.5 µm
Lizostafin duyarlılığı	Duyarlı	Dirençli	Duyarlı
Furozolidon (100µg) duyarlılığı	Duyarlı	Dirençli	Duyarlı
Basitrasin (0.04 U) duyarlılığı	Dirençli	Duyarlı	Dirençli
Modifiye oksidaz testi	-*	+	+
Anaerobik ortamda glikozdan asit oluşturma	+	-	-

*: Oksidaz pozitif olan *S. lentus*, *S. sciuri* ve *S. vitulinus* dışındaki Stafilokok türleri oksidaz negatiftir.

1.7.2.3. Biyokimyasal Testler

1.7.2.3.1.Katalaz Testi

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

1.7.2.3.2. Koagulaz Testi

Lam ve tüp koagulaz testi olmak üzere 2 yöntemi vardır. Bu testlerde Stafilokok süspansiyonu tavşan plazması ile lamda veya tüpte karıştırılır ve tavşan plazmasındaki fibrinojen koagulaz ile fibrine çevrilir (Winn ve ark 2006, Brown 2005).

Lam testi; bağlı koagulaz veya clumping faktörün (CF) varlığı belirlenir. Bu test kanlı agar, Columbia Colistin Nalidixic Agar ya da diğer nonselektif nutrient besiyerinde üreyen kolonilerden yapılabilir. Mannitol salt agar gibi yüksek tuz içeriği olan besiyerinde üremiş koloniler kullanılmamalıdır. Çünkü yüksek tuz konsantrasyonu *S. aureus*'un bazı suşlarında otoaglutinasyona neden olmaktadır. Clumping faktörü eksik olan suşlar genellikle serbest koagulaz ürettiklerinden dolayı, lamda negatif çıkan suşlar tüp koagulaz yöntemiyle doğrulanmalıdır. Ayrıca *S. lugdunensis* ve *S. schleiferi* gibi bazı koagulaz negatif suşlar climping faktör üretirler ve lam testi pozitif çıkabilir (Winn ve ark 2006, Brown 2005).

Tüp testi; serbest koagulaz veya plazmaya bakteri tarafından salınan koagulazı saptar. Bu metot ile saptanan koagulaz ekstrasellüler olarak salınır ve bir kompleks oluşturmak için plazmadaki Coagulase-Reacting Factor (CRF) ile reaksiyona girerek stafilotrombin oluşturur. Stafilotrombin de fibrinojenle reaksiyona girerek fibrin oluşumunu tetikler. Bazı suşlar, 35°C'de uzayan inkübasyon periyodunda pıhtının çözülmesine sebep olan fibrinolizin üreteceği için testler 35°C'de 4 saat inkübasyondan sonra oda ısısına alınmalıdır ve 18–24 saat sonra tekrar okunmalıdır. Tüp koagulaz testi *S. aureus* identifikasyonu için referans testidir. Bu test, pozitif sinyal veren kan kültüründen

doğrudan tavşan plazması içerisine inokule edilerek de yapılabilir (Winn ve ark 2006). Nadir *S. aureus* suşları koagulaz negatif olabilir ve bazı hayvan izolatları (*S. intermedius, S. hyicus, S. dephini* ve *S. schleiferi subsp coagulans*) tüp koagulaz pozitif olabilir (Winn ve ark 2006, Brown 2005).

Son günlerde *S. schleiferi subsp. schleiferi*'nin hem clumping faktör hem de tüp koagulaz testi pozitif olduğu gösterilmiştir. Bu izolat aynı zamanda ısıya dirençli DNAz ürettiğinden dolayı *S. aureus* olarak yanlış tanımlanabilir. Bu KNS, *S. aureus*'tan maltoz, laktoz, mannitol, sukroz ve trehalozdan asit üretmemesi ile ayrılabilir (Winn ve ark 2006, Dündar ve ark 2002).

Hem tüp hem de lam koagulaz testi için önerilen ortam EDTA'lı tavşan plazmasıdır. Sitratlı plazma kullanılmamalıdır, çünkü enterokoklar gibi bazı bakteriler sitratı kullandığından testin pozitif sonuçlanmasına ve Stafilokok olarak tanımlanmasına neden olabilir. Bu hata her zaman önce katalaz testi uygulanarak önlenebilir. İnsan plazması çeşitli miktarda CRF ve antiStafilokokal antikorlar içerdiğinden koagulaz testi yapmada kullanılmamalıdır (Winn ve ark 2006).

Lateks aglütinasyon; bu yöntemde plazma ile kaplanmış lateks parçacıkları kullanılır. Fibrinojen latekse bağlanarak clumping faktörü tespit eder. Ek olarak Stafilokok hücre duvarı proteini olan IgG moleküllerinin Fc bölgelerine bağlanabilen Protein A'da, parçacıkta bulunan immunglobulin molekülleri ile tespit edilebilir. Bir agar plağından alınan kolonilerin test materyali ile karışması sonucu lateks-mikroorganizma süspansiyonu hızlı bir kümeleşme gösterir. Ayrıca *S. lugdunensis* ve *S. schleiferi*'nin bazı suşları da clumping faktör üretir ve bu test ile pozitif reaksiyon verebilir (Winn ve ark 2006).

Pasif hemaglütinasyon; eritrositler ya da sentetik olarak hazırlanmış polistiren lateks gibi parçacıklar, çeşitli yöntemlerle çok çeşitli antijenlerle kaplanabilirler. Bu şekilde kaplanmış olduğu antijenin taşıyıcısı durumuna gelen eritrosit ya da parçacıklar, elektrolitli ortamda bu antijenlerin antikorları ile karşılaştıklarında aglütinasyon verirler. Dolaylı hemaglütinasyon denilen bu testler çok duyarlı olup, ortamda çok az antikor bulunması bile sonuç vermek için yeterlidir. *S. aureus* hücrelerinin yüzeyindeki clumping faktörü saptamak için fibrinojen ile sensitize edilmiş koyun eritrositleri bu amaçla kullanır (Winn

ve ark 2006). Bazı *S. saphyticus* suşları lateks veya hemaglütinasyon koagulaz testinde yanlış pozitif sonuç verirler. Bu *S. saphyticus* suşlarının yüzeyinde bulunan hemaglutinin varlığı ile açıklanabilir (Winn ve ark 2006).

Florejenik koagulaz testi; substrat içeren küçük bir kupulu inokule ederek gerçekleştirilen bu test, üretici firmanın "aurase" olarak isimlendirdiği maddeyi tespit eder. Aurase, koagülasyonun proteolitik enzimidir; protrombin ile raksiyona girer ve stafilotrombin ile kompleks oluşturur. Stafilotrombin daha sonra test kupulunda bulunan florejenik peptide enzimatik olarak bağlanır, böylece ulraviyole ışık altınta floresans veren radikal ve peptid salınır. Substratı olmayan kompleks kuplesi ile karşılaştırıldığında test kuplesindeki yüksek floresans *S. aureus'*un tanımlanmasını sağlar. Bu testin özgüllük ve duyarlılığının yüksek olduğu saptanmıştır (Winn ve ark 2006, Brown 2005).

1.7.2.4. Ek Doğrulayıcı Testler

1.7.2.4.1. Deoksiribonükleaz (DNAz) Testi

Bazı *S. aureus* suşları zayıf ya da şüpheli tüp koagulaz reaksiyonu oluşturabilirler ve nadiren gerçekten koagulaz negatif olabilirler. Bu vakalarda koagulaz ile çok iyi uyum gösteren ek testler yapmak gerekebilir. *S. aureus* endonükleolitik ve ekzonükleolitik aktiviteye sahip olan DNAz ve termostabil nükleaz üretir (Gudding 1983). Bu enzimlerin her ikisi de nükleik asiti hidrolize eder. DNAz içeren bakteriler, DNA içeren besiyerinde DNA'yı parçalayıp oligonükleotidler oluştururlar. Bu deneyde DNA'lı plak besiyerine saf kültürden çizgi ekimi yapılıp 35°C'de 18-24 saat bekletildikten sonra plak yüzeyine 1 N HCl damlatılmasına dayanır. Bakteri DNAz üretiyorsa ekim çizgisinin çevresinde saydam bir zon oluşur. Endikatör olarak besiyerine toluidin mavisi konulmuş ise DNAz varlığında bakteriler ekim çizgisi çevresinde parlak pembe bir zon oluştururlar. İndikatör olarak Methyl green konmuş besiyerinde ekim çizgisi etrafında besiyerinin yeşil rengi açılır (Brakstad ve ark 1995). Besiyerine katılan toluidin mavisi DNAz aktivitesini maskeleyebildiği için % 0.005'i aşmamalıdır. Bu test *S. aureus*'un identifikasyonunda ek bir test olarak yardımcı olmakla birlikte başka Stafilokoklar da pozitif DNAz reaksiyonu verebilir (Winn ve ark 2006, Brown ve ark 2005).

1.7.2.4.2. Termostabil Endonükleaz Testi

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

1.7.2.4.3. Mannitol Fermentasyonu

S. epidermidis ve diğer koagulaz negatif türlerin aksine, *S. aureus* mannitolü fermente edebilir. *S. aureus*'un dışkı, çevre ve nasal taşıyıcılarda taranmasında bu özelliği kullanılır. Kullanılan besiyeri "mannitol salt agar"dır. Bu besiyeri mannitol (% 1), NaCl (% 7.5), fenol kırmızısı ve peptonlar içerir. Bu yüksek tuz konsantrasyonu, enterekoklar dışındaki diğer mikroorganizmaların üremesini engeller ve seçici olarak Stafilokoklar ürer. İzole edilen *S. aureus* kolonileri, çevresinde mannitolden asit oluşumunu gösteren sarı bir zon varlığı ile saptanabilir. Nadiren başka Stafilokok türleri de mannitolden asit üretebilir. Bu sebeple bu besiyerinde üretilen mannitol pozitif organizmalar kanlı agar besiyerine pasajlanıp koagulaz üretimi açısından test edilmelidir (Winn ve ark 2006). *S. aureus*'un identifikasyonunu sağlayan moleküler yöntemlerin çoğu PZR bazlıdır. İlk testlerde identifikasyonu doğrulamak için amplifikasyon ürünlerinin Southern blotlama tekniği ile değerlendirilmesi gerekmekteydi (Brown ve ark 2005). Fakat daha sonra, türe spesifik hedef bölgelerin amplifikasyonu için düzenlenmiş, protein genleri gibi hedef bölgeler içeren primer aralığı geliştirildi. Nükleaz (*nuc*), koagulaz (*coa*), protein A (*spA*) ve yüzey-ilişkili fibrinojen-bağlayan protein genleri gibi genler de *S. aureus*'un tanımlanmasında önemlidir. Ayrıca Stafilokokal Metisilin direncinin tespiti için *mecA* ve 16S rRNA gibi spesifik gen bölgelerini değerlendiren multipleks PZR yöntemi de mevcuttur (Grisold ve ark 2002). Ticari olarak bulunan real-time PZR ile başarı sağlanmıştır (Levi ve ark 2003).

Real-time PZR, ekipmanı olmayan rutin laboratuvarlarda PZR'ye alternatif sunmak için bir kolorimetrik mikrokuyucuk formatında, *coa* geninden mRNA transkripsiyonunun izotermal sinyal aracılı amplifikasyonu kullanan yeni moleküler bir yöntem de gösterilmiştir (Levi ve ark 2003).

1.7.2.5. Diğer Testler

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

1.7.2.6. Slaym Oluşumu

1.7.2.6.1. 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).

1.7.2.6.2 Kantitatif Mikrodilüsyon Plak Testi (MT)

Plastik mikroplakların çukurlarına bakteri suspansiyonu konarak inkubasyona bırakılır. Bu çukurların içi, daha sonra, mikroplaklar 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 değerin üstünde olan kuyucuklar slaym "pozitif" olarak değerlendirilir. Plastik doku kültür plakları ile slaym oluşumunu kantitatif olarak inceleyen bir yöntemdir (Christensen ve ark 1982).

1.7.2.6.3. 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,

—CO_2 içeriği ve oksijenizasyon, gibi çeşitli faktörlere bağımlı olarak, değişiklik gösterebilmektedir (Christensen ve ark 1994).

Denyer ve arkadaşları (1990) % 5 CO_2'li ortamda bakteriyel aderansın azaldığını göstermişlerdir. Bazı araştırıcılar da anaerop ortamda slaym üretimini göstermişlerdir. (Songür ve ark 1998, Kaleli ve ark 1999). Kaleli ve Demir (1999), 100 adet *Koagulaz Negatif Stafilokok* (KNS) suşunda slaym üretiminin, aerop, anaerop ve % 5–10 CO_2'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 CO_2'li ortamlarda slaym oluşumu bakımından yöntemler arasında bir önemli bir farklılık olmadığını saptamışlardır. KNS'ler içinde en fazla *S. epidermidis'*in slaym ürettiği de bildirilmiştir.

*Koagulaz Negatif Stafilokoklar*da slaym faktör pozitifliği ile ilgili çok sayıda araştırma vardır. Delialioğlu ve Gedikoğlu (2001), çeşitli klinik örneklerden soyutlanan 327 KNS suşunun slaym faktör oluşturup oluşturmadıklarını değerlendirmişler; *S. epidermidis'*in185 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. Aydınlı ve arkadaşları (1997), 131 *S. epidermidis*'ten 62'sinde slaym faktör pozitifliğini bildirmişlerdir.

Stafilokoklarda slaym oluşumu, genotipik olarak da belirlenebilmektedir. Polisakkarit sentezi genetik kontrol altındadır ve spesifik intersellüler adezyon (*ica*) bölgelerini ve özellikle de *ica*A, *ica*B, *ica*C ve *ica*D genlerini içerir (Arciola ve ark 2002).

1.8. *Koagulaz Negatif Stafilokokları*n İdentifikasyonu

Kit sistemleri birçok insan, hayvan ve çevresel kaynaklı Stafilokokların laboratuarlarda identifikasyonuna olanak sağlamaktadır (Koneman 1997).

1.8.1. *S. epidermidis* İdentifikasyonunda Fosfataz Üretimi

Koagulaz Negatif Stafilokok identifikasyonunda geleneksel yöntem olan fosfataz aktivitesi, *S. epidermidis* ve *S. xylosus* suşlarında pozitif, diğer *Koagulaz Negatif Stafilokok*larda negatif olarak rapor edilmiştir. Bununla birlikte, diğer Stafilokok türleri de fosfataz enzimi üretebilmektedir. Langlois ve arkadaşları, 4 farklı metot kullanarak tüm *S. aureus,* koagulaz pozitif *S. hyicus* ve *S. intermedius* suşları ve en çok karşılaşılan suşlardan olan *S. epidermidis, S. chromogenes,* koagulaz negatif *S. hyicus, S. sciuri, S. simulans, S. xylosus* ve *S. warneri/hominis* suşlarında 24-48 saat inkubasyondan sonra fosfataz aktivitelerini bulmuşlardır. Fosfataz üretimi besiyerindeki inorganik fosfatın (P_i) varlığından ve pH değerinden etkilenmektedir. Soro ve arkadaşları, üreme besiyerinde P_i yokluğu ve pH 8'de yapılan bir testte çeşitli Stafilokok türlerinde fosfataz tespit etmiştir. %3 P_i eklenmiş besiyeri kullanıldığında, sadece *S. aureus, S. epidermidis* ve *S. xylosus* suşlarında fosfataz pozitif çıkmıştır. Bu çalışmalar fosfataz aktivitesinin daha önce düşünenlerden daha yaygın bir özellik olduğu, bu aktivitenin bazı türlerde esas olabildiği ve diğerlerinde fosfataz ile bastırılmış olabilir (Langlois ve ark 1984).

Birçok ticari kit sistemleri biyokimyasal test bünyesinde fosfataz testi (API Staph-IDENT, API Staph, ID32 Staph, RapiDEC Staph) içerdiği halde, Stafilokoklarda fostaz aktivitesinin belirlenmesi için bağımsız testler yoktur.geary ve Stevens, pH 5.6-5.8 arasında p-nitrofenil fosfat (0.495mg/ml) içeren Mueller-Hinton agar olarak tek agar metotunu (PNP agar) rapor etmiştir. Besiyeri 18-24 saat inokubasyondan sonra okunur. İnokulum altında parlak sarı renk varlığı fosfataz pozitif olduğunu gösterir (Koneman ve ark 1997).

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

Lindsay ve arkadaşları *S. epidermidis* ve *S. hominis*'in spesifik identifikasyonu için yeni bir test rapor etmiştir (Lindsay ve ark 1993). Test, akut ve kronik demir yüklenmesinin tedavisinde kullanılan ve *Streptomyces pilosus* tarafından üretilen desferrioksamine duyarlılığı belirlenir. Test, furozolidon ve basitrasin duyarlılık testlerine benzer disk difüzyon testi gibi uygulanır. 0.5 McFarland türbidite standardı ile aynı organizma süspansiyonu hazırlandıktan sonra, BHI agar pleyti inokulum üzerine yerleştirilen süspansiyon ve 1mg desferrioksamin diski ile birlikte inokule edilir. 35˚C'de 1 saat inkübasyondan sonra, pleyt diskin etrafındaki zon incelenir. Lindsay ve Riley'in çalışmasında 95 KNS'un 57'si *S. epidermidis* ve 4 *S. hominis* izolatları desferrioksamine duyarlı, kalan 34 izolat ise dirençli bulunmuştur. Desferrioksamin ticari olarak uygun olmasına rağmen, standardize edilmiş duyarlılık test diskleri kurum içi hazırlanmış olmalıdır (Koneman ve ark 1997).

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

11 Stafiokok türü (*S. saprophyticus, S. cohnii subsp., S. xylosus, S pulvereri, S. sciuri, S. lentus, S. gallinarum, S. kloosii, S. equorum, S. arlattae* ve *S. vitulus*) 1.6 µg/ml veya daha fazla MİK değeri ile novobiosine dirençlidir. *S. saprophyticus* dışındaki novobiosin dirençli türlere nadir rastlanıldığı için, novobiosin duyarlılık testi *S. saprophyticus* identifikasyonu için kullanışlı bir metottur. Novobiosine dirençli türlerde 6mm (hiç zon yok)-12mm, duyarlı türlerde ise 16-27mm zon oluşur. Bu test P agar adında besiyeri kullanılarak hazırlanır (Koneman ve ark 1997).

Janda ve arkadaşları tüm *S. saprophyticus* izolatlarını novobiosine dirençli, 74 *S. epidermidis* suşlarının ise 4'ünün novobiosine dirençli olduğunu belirlemiştir (Janda ve ark 1994).

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

Trehaloz-mannitol-fosfataz agar (TMPA) *S. saprophyticus* ve *S. epidermidis*'in belirlenmesinde yardımcı olması için formule edilmiştir (292). *S. epidermidis* trehaloz ve mannitolden asit üretmez ve çoğu suşu (% 90-96) fosfatazn pozitiftir. *S. saprophyticus*'un trehaloz ve mannitolden asit üretimi değişkendir ve fosfataz negatiftir. TMPA'da asit üretimi, besiyerinde mordan sarıya renk değişimi ile belirlenir ve alkalin fosfataz aktivitesi 1N amonyum hidroksit ile nemlendirilmiş filtre kağıdı üzerine besiyerinden (fenolfitaleyn difosfat içerir) taranan koloniler ile belirlenir. Fosfataz pozitif koloniler filtre kağıdı üzerinde pembe renk üretir. Bu besiyeri ile birlikte novobiosin disk duyarlılık testi birleştirildiğinde *S. saprophyticus* ve *S. epidermidis* identifiye edilebilir. Ayrıca Knapp ve Washington tarafından tasarlanmış trehaloz ve mannitol broth, 2 saat içinde *S. epidermidis*'i diğer KNS'lardan ayırabilir (Knapp ve ark 1989).

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

1.8.5.1. Rapidec Staph

Bu yöntem *S. aureus, S. epidermidis* ve *S. saprophyticus*'u 2 saat içinde identifiye eden kit sistemidir. İdentifiye edilecek izolat suda emülsiyon haline getirilir ve süspansiyon 4 kuyucuğa dağıtılır. İlk kuyucuk kontroldür, diğerleri sırasıyla floresan koagulaz substratı, alkalin fosfataz substratı (PAL) ve β-galaktosidaz substratıdır (BGAL). 2 saatlik inkubasyondan sonra, kuyucuklar ultra viole ışık altında incelenir. Eğer ilk kuyucuğa göre 2. Kuyucukta daha fazla floresan belirlenirse, izolat *S. aureus* olarak identifiye edilir. Eğer bu test negatifse, diğer kuyucuklar ya direkt olarak (kuyucuk 3) ya da reaktiflerin tespiti için gerekli ilavelerden sonra (kuyucuk 4) incelenir. Kuyucuk 3'teki pozitif reaksiyon izolatın *S. epidermidis* (alkalin fosfataz pozitif), kuyucuk 4'teki pozitif reaksiyon ise izolatın *S. saprophyticus* (β-galaktosidaz pozitif) olduπunu gφsterir. Hem PAL hem de

BGAL'da oluώan pozitif sonuη, *S. xylosus* veya *S.intermedius*'un olası identifikasyonunu sağlar. Son zamanlarda yayınlanan ölçümlerde, RapiDEC STAPH, 130 *S. aureus* suşunun % 100 doğru identifiye etmiştir; ancak 74 *S. epidermidis* suşunun % 70'ini ve 32 *S. saprophyticus* suşunun % 81'ini doğru identifiye etmiştir. Diğer koagulaz negatif 62 izolatın testinde, *4 S. sciuri* suşu *S. epidermidis* olarak, 8 izolat (1 *S. hominis*, 3 *S. cohnii*, 3 *S. simulans* ve 1 *S. kloosii*) *S saprophyticus* olarak yanlış identifiye edilmiştir. RapiDEC STAPH'daki PAL testi *S. epidermidis*'de fosfataz varlığını belirlemede oldukça spesifik olduğu gösterilmiştir; ancak fosfataz negatif veya düşük oranda enzim üreten bu türlerin suşları bu yöntemle *S. epidermidis* olarak identiifiye edilemez. Dolayısıyla, *S. epidermidis* identifikasyonunda RapiDEC STAPH'ın sensivitesi ve verimliliği populasyondaki PAL pozitif ve negatif suşların prevalansına bağlıdır (Koneman ve ark 1997).

1.8.6. Geleneksel İdentifikasyon Prosedürleri

Stafilokokların identifikasyonundaki biyokimyasal reaksiyonlar Çizelge 1.2.'de bulunmaktadır. Kısaca, biyokimyasal testler nitrat broth, üreaz agar ve arjinin dihidrolaz besiyeri gibi enterik besiyeri kullanarak gerçekleştirilir. Karbonhidrat kullanma testleri % 1 steril karbonhidrat içeren purple broth agarda gerçekleştirilir. Maya özütü ilavesi (% 1-2) nazlı suşların daha fazla üremesi için gerekli olabilir. Biyokimyasal testler ve karbonhidratlardan asit üretim testlerine ek olarak, Habert ve arkadaşları Enterokokların ve KNS'ların identifikasyonuna yardımcı olan polymyxin B (300 U disk), basitrasin (10 U disk) ve pyrrolidonyl arylamidase (PYR)testleri gibi antimikrobiyal ajanlara duyarlılığı göstermiştir (Hebert 1988). Bu reaksiyonlar tabloda gösterilmiştir. Son zamanlarda, Rhoden ve arkadaşları, API-Staph-IDENT sisteminden kromojenik enzim substrat seçme tastleriyle birlikte Mikrokokların karbonhidrat kullanımı ve biyokimyasal testlerin kullanımı ile değiştirilmişyeni bir formulasyon yapmıştır. Bu formulasyon önceki referans identifikasyon metotu ile ters düşmektedir. Tarama testleri morfoloji (Gram boyama), familya belirlenmesi (katalaz testi), cins gruplaması (glikoz fermentasyonu) ve bağlı ve serbest koagulazın (lam ve tüp koagulaz, Staph Aurex lateks aglütinasyon testi) varlığını belirlemede kullanılır (Rhoden ve ark 1993).

1.8.7. Ticari İdentifikasyon Sistemleri

Çeşitli ticari kitler KNS'ların identifikasyonu için uygundur. Bu kriterlerin tümü organizmanın identifikasyonu için karbonhidrat fermentasyon testleri (nitrat redüksiyonu, üreaz, voges proskoer) ve kromojenik enzim substrat testleri kullanılır. Bu sistemler üretici tarafından belirli formatlar kullanılarak uyarlanmıştır (Koneman ve ark 1997).

1.8.7.1. API Staph-Ident

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

1.8.7.2. API Staph

Bu yöntem hem Mikrokoklar hem de Stafilokoklar için 18-24 saatlik bir identifikasyon sistemidir.bu sistem bant formatında, 19 dizili testi içerir ve kit ile birlikte konulan pepton-maya özütü broth besiyerinde hazırlanan organizma süspansiyonu inokule ediliri veri tabanı 25 sıradanoluşur, insan ve veteriner orjinli Stafilokokları, Mikrokokları ve *S. muclaginosus*'u içerir. API STAPH'ın 277 KNS'dan % 73'ünü doğru olarak identifiye ettiğini bulmuştur. Burada *S. aureus*'su % 100 olarak tespit etmişken, diğer izolatlarda yetersiz kalmıştır (Koneman ve ark 1997).

1.8.7.3. ID32 Staph

Bu yöntem Mikrokokların identifikasyonu için 24 saatlik bir bant sistemidir ve 26 biyokimyasal test içerir. ID32 Staph tüm sistemlerden en kapsamlı veri tabanına sahiptir ve tüm insan ve hayvan Stafilokok türlerini (*S. saccharolyticus* hariç) kapsar. Sistem ayrıca 6 Mikrokok türü ve *S. mucilaginosus*'u identifiye eder. 8 laboratuvarda 792 suşla yürütülmüş uluslarası bir çalışmada ID32 Staph'ın % 95.5 izolatı doğru identifiye ettiği tespit edilmiştir. Bu sistem henüz onaylanmadığı için United States klinik laboratuarlarında kullanıma uygun değildir (Koneman ve ark 1997).

1.8.7.4. Vitek Gram Pozitif İdentifikasyon (GPI) Kartı

Bu sistem otomatik Vitek bakteriyel identifikasyon duyarlılık test sistemi ile birlikte kullanmak üzere tasarlanmış, Gram pozitif organizmaların identifikasyon kartıdır. Kart Stafilokok, Streptokok ve birçok Gram pozitif basil türlerinin identifikasyonu için substrat içeren 30 mikropleyt içerir. KNS'ların identifikasyonu genel olarak 10-13 saat sürer. Ancak şu anda veri tabanında bulunmayan *S. lugdurensis* gibi organizmalar ya yanlış identifiye edilmekte ya da hiç identifiye edilmemektedir (Koneman ve ark 1997).

1.8.7.5. MicroScan Rapid Pos Combo Paneli

Bu sistem çeşitli test substratları ve karbonhidratlarla fikze edilmiş filtre kağıdı diskleri kullanılır. Mikrokok, Stafilokok ve Streptokok identifikasyonu için tasarlanmıştır. KNS'ların % 86'sını identifiye ettiği tespit etmiştir. *S epidermidis* türlerinden ise % 96'sını tespit etmiş, diğer türlerin tespitinde ise testin doğruluğu izin vermemiştir. Sonuç olarak sistem Stafilokok türlerinin çeşitliliğinde testin seçiciliği optimal değildir (Koneman ve ark 1997).

1.8.7.6. Staph-Sistem 18-R

Bu sistem 18 modifiye geleneksel substrat içeren plastik tabakadan oluşmaktadır. Kuyucuklar organizma süspansiyonu ile birlikte inokule edilir, panel inkube edilir ve 18-24

saat sonra değerlendirilir. Bu kit sistemlerinin birçoğunda olduğu gibi, *S. lugdunensis* ve *S. schleiferi* gibi önemli izolatların identifikasyonu için veri tabanının düzenlenmesine ve daha fazla teste gereksinim duyulduğu belirtilmiştir (Koneman ve ark 1997).

1.8.7.7. Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemi

Bakterinin identifikasyonunda hücresel yağ asitleri türevlerinin yüksek çözünürlükte gaz likit kromatografisinde (GLC) kullanılır. Sistemin veri tabanı çeşitli bakterinin hücresel yağ asitleri profilinin analizlerini içerir. Sistem *S. epidermidis, S. intermedius, S. cohnii, S. lugdunensis, S. schleiferi, S. simulans,S. sciuri* ve *S. xylosus* tüm suşlarını identifiye eder (Koneman ve ark 1997).

1.8.7.8 Biyolog Mikro Pleyt İdentifikasyon Sistemi

Bu sistem çeşitli substratların oksidasyonunu baz alarak mikroorganizmaları identifiye eder. 95'i substratlı, kontrol kuyucuğunda substrat olmayan toplam 96 kuyucuk mikrotitre tabakası kullanılır. Eğer organizma her bir kuyucukta substratı oksidezide ederse, substrat oksidatif asimilasyon sırasında organizmanın respirasyonu tetrazolium indikatör boyanın redüksiyonuna neden olur ve renksiz kuyucuk mor renge dönüşür. Bu sistem 569 Gram negatif tür identifikasyonu için GN micro pleyt ve veri tabanında 225 Gram pozitif organizma içeren GP biyolog mikro pleyt içermektedir. Birçok çalışma sonucu bu sistemin KNS'ların ve ilgili organizmaların identifikasyonu için rutin metot olarak kullanımında yeterince doğru olmadığı tespit edilmiştir (Koneman ve ark 1997).

Çizelge 1.2. Novobiosine duyarlı*Koagulaz Negatif Stafilokokları*n identifikasyon karakterleri (Koneman ve ark 1997).

Türler	Koagulaz	Clumping faktör	Thioglukolatta anaerobik üreme	Endonükleaz	Alkalin fosfataz	Arjinin dihidrolaz	Ornithin dekarboksilaz	Pirolidonil arilamidaz	Nitrat redüksiyonu	Üreaz	β-glikosidaz	β-glikuronidaz	β- galaktosidaz	Polimiksin B	Basitrasin	Oksidaz	Maltoz	Fruktoz	Sukroz	Laktoz	D-mannitol	D-mannoz	Rafinoz	D-trehaloz	D-selobioz	D-ksiloz	ksilitol	Riboz	L-arabinoz
S. epidermidis	-	-	+	-	+	v	v^{sl}	-	+	+	v	-	-	R	S	-	+	+	+	v	-	+^{sl}	-	-	-	-	-	v	v^{sl}
S. haemolyticus	-	-	+^{sl}	-	-	+	-	+	+	-	v	v	-	S	R	-	+	v	+	v	v	-	-	+	-	-	-	v	-
S. hominis	-	-	-	-	-	v	-	-	v	+	-	-	-	S	S	-	+	+	+	v	-	-	-	v	-	-	-	-	-
S. capitis																													
subsp. capitis	-	-	+^{sl}	-	-	v	-	-	v	-	-	-	-	S	S	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
subsp. ureolyticus	-	-	+^{sl}	-	-	+	-	v	+	+	-	-	-	NA	NA	-	+	+	v	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
S. warneri	-	-	+	-	-	v	-	-	v	+	+	v	-	S	S	-	+^{sl}	+	+	v	v	-	-	+	-	-	-	v	-
S. auricularis	-	-	+^{sl}	-	-	v	-	v	v^{sl}	-	-	-	v	S	S/R	-	+^{sl}	+	v	-	-	-	-	+^{sl}	-	-	-	-	-

Çizelge 1.2. (Devamı)

Türler	Koagulaz	Clumping faktör	Thioglukolatta anaerobik üreme	Endonükleaz	Alkalin fosfataz	Arjinin dihidrolaz	Ornithin dekarboksilaz	Pirolidonil arilamidaz	Nitrat redüksiyonu	Üreaz	β-glikosidaz	β-glikuronidaz	β- galaktosidaz	Polimiksin B	Basitrasin	Oksidaz	Maltoz	Fruktoz	Sukroz	Laktoz	D-mannitol	D-mannoz	Rafinoz	D-trehaloz	D-selobioz	D-ksiloz	ksilitol	Riboz	L-arabinoz
S. simulans	-	-	+	-	v	+	-	+	+	+	-	v	+	S	S	-	+[sl]	+	+	+	+	v	-	v	-	-	-	v	v
S. lugdunensis	-	+	+	-	-	-	+	+	+	v	+	-	-	S/R	S/R	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
S. saccharolyticus	-	-	+	-	v	+	NA	NA	+	NA	-	-	-	NA	NA	-	-	NA	-	-	-	+ [sl]	-	-	-	NA	NA	NA	-
S. schleiferi	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	S	S	-	-	+[sl]	-	-	-	+	-	v	-	-	-	-	-
subsp. schleiferi	+	-	+	+	+	+	-	NA	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	NA	v	v	v	+	-	-	-	NA	NA	-	-
subsp. coagulans																													
S. hyicus	v	-	+	+	+	+	-	-	+	v	v	+	-	R	S	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-
S. chromogenes	-	-	+	-	+	+	-	v	+	+	v	-	-	R	S	-	v	+	+	+	v	+	-	+	-	-	+	v	-

Çizelge 1.2 (Devamı)

Türler	Koagulaz	Clumping faktör	Thioglukolatta anaerobik üreme	Endonükleaz	Alkalin fosfataz	Arjinin dihidrolaz	Ornithin dekarboksilaz	Pirolidonil arilamidaz	Nitrat redüksiyonu	Üreaz	β-glikosidaz	β-glikuronidaz	β- galaktosidaz	Polimiksin B	Basitrasin	Oksidaz	Maltoz	Fruktoz	Sukroz	Laktoz	D-mannitol	D-mannoz	Rafinoz	D-trehaloz	D-selobioz	D-ksiloz	ksilitol	Riboz	L-arabinoz
S. caprae	-	-	+[sl]	-	+[sl]	+	-	v	+	+	-	-	-	S	S	-	v[sl]	-	-	+	v	+	-	+[sl]	-	-	-	-	-
S. felis	-	-	+	-	+	+	NA	NA	+	+	-	-	+	NA	NA	-	-	NA	v	+	+	+	-	+	-	-	v	NA	-
S. caseolyticus	-	-	+[sl]	NA	-	v	-	+	+	-	-	-	-	S	S	+	+	+	v	+	-	-	NA	v	-	-	+	-	-
S. muscae	-	-	+	-	+	-	-	NA	+	-	NA	NA	-	NA	NA	-	-	NA	+	-	-	-	-	+	+	NA	NA	+	-
S. piscifermentas	-	-	+	-	+	+	NA	NA	+	+	+	-	v[w+]	NA	NA	-	-	NA	+	-	-	-	-	+	+	NA	NA	+	-
S. pasteuri	-	-	+	-	-	v	-	-	v	+	+	+	-	NA	NA	-	v[sl]	NA	+	v	v	-	-	+	-	NA	NA	v[sl]	-

Çizelge 1.3. Novobiosine dirençli *Koagulaz Negatif Stafilokokları*n identifikasyon karakterleri (Koneman ve ark 1997)

Türler	Koagulaz	Clumping faktör	Thioglukolatta anaerobik üreme	Endonükleaz	Alkalin fosfataz	Arjinin dihidrolaz	Ornithin dekarboksilaz	Pirolidonil arilamidaz	Nitrat redüksiyonu	Üreaz	β-glikosidaz	β-glikuronidaz	β- galaktosidaz	Polimiksin B	Basitrasin	Oksidaz	Maltoz	Fruktoz	Sukroz	Laktoz	D-mannitol	D-mannoz	Rafinoz	D-trehaloz	D-selobioz	D-ksiloz	ksilitol	Riboz	L-arabinoz
S. saprophyticus	-	-	$+^{sl}$	-	-	-	-	-	-	+	v	-	+	S	S/R	-	+	+	+	v	v	-	-	+	-	-	v	-	-
S. cohnii																													
subsp. cohnii	-	-	$v+^{sl}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S/R	-	v^{sl}	+	-	-	v	v	-	+	-	-	v	-	-
subsp. ureolyticum	-	-		-	+	v	-	+	-	+	+	-	-	NA	NA	-	$+^{sl}$	+	-	+	+	+	-	+	-	-	v	-	-
S. xylosus	-	-	+	-	v	-	-	v	v	+	+	+	+	S	S/R	-	+	+	+	v	+	+	-	+	-	+	v^{sl}	-	v
S. sciuri	-	-	$+^{sl}$	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	S	R	+	v^{sl}	+	+	v^{sl}	+	v^{sl}	-	+	+	v^{sl}	-	+	v
S. gallinarum	-	-	$+^{sl}$	-	$+^{sl}$	-	-	-	+	+	+	v	v	S	S	-	+	+	+	v	+	+	+	+	+	+	v	+	+
S. lentus	-	-	$+^{sl}$	-	$+^{sl}$	-	-	-	+	-	+	-	-	S	S	+	v	$+^{sl}$	+	v	+	$+^{sl}$	+	+	+	$+^{sl}$	-	+	v

Çizelge 1.3. (Devamı)

Türler	Koagulaz	Clumping faktör	Thioglukolatta anaerobik üreme	Endonükleaz	Alkalin fosfataz	Arjinin dihidrolaz	Ornithin dekarboksilaz	Pirolidonil arilamidaz	Nitrat redüksiyonu	Üreaz	β-glikosidaz	β-glikuronidaz	β- galaktosidaz	Polimiksin B	Basitrasin	Oksidaz	Maltoz	Fruktoz	Sukroz	Laktoz	D-mannitol	D-mannoz	Rafinoz	D-trehaloz	D-selobioz	D-ksiloz	ksilitol	Riboz	L-arabinoz
S. arlettae	-	-	-	-	+[sl]	-	-	-	-	-	NA	+	v	NA	NA	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
S. equorum	-	-	-	-	+[sl]	-	-	-	+	+	NA	+	v	NA	NA	-	v	+	+	v	+	+	-	+	v[sl]	+	-	+	+
S. vitulus	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	v	-	-	NA	NA	+	-	+	+	-	+	-	-	v[sl]	v	v	-	NA	-
S. kloosii	-	-	-	-	v	-	-	v	-	v	v	v	v	S	S	-	v	+	+[sl]	v[sl]	+	-	-	+	-	v[sl]	v	+	v

+, pozitif suş ≥ %90 ; -, negatif suş ≥ %90; +[sl], yavaş reaksiyon gösteren pozitif suş ≥ %90; v, %11-89 arasındaki pozitif suşlar; v[sl], yavaş reaksiyon gösteren %11-89 arasındaki pozitif suşlar; NA, veriler uygun değildir.

Polymiksin (300 U disk): S, ≥10mm; R, < 10mm.

Basitrasin (10 U disk): S ≥11mm; R, < 11mm

1.9. Antibiyotik Dirençliliği

Stafilokok türleri genel olarak birçok antibakteriyele karşı duyarlı olmalarına karşın antibiyotik dirençliliği, zamana bağlı olarak artmaktadır. Antibiyotik çağının başlamasından günümüze doğru kronolojik olarak incelendiğinde, Stafilokoklar ile gelişen infeksiyonların tedavisinde kullanılan ilaçların büyük bir değişim geçirdiği gözlenmektedir. Bunun başlıca 3 nedeni vardır; 1. Stafilokoklar nazokomiyal patojen olarak önemli morbidite ve mortalite nedenidir, 2. Hastanelerdeki hasta populasyonu (çok yaşlı, bağışıklık yetmezliği olanlar, bağışıklığı baskılanmış olanlar) tipi infeksiyon riskini arttırma yönünde değişmektedir, 3. Stafilokoklar kendilerine karşı kullanılan antibiyotiklere direnç geliştirmeyi sürdürmektedir (Derbentli 2005).

İlk kez 1945 yılında penisilinaz oluşturarak penisiline direnç kazanmış olan *S. aureus* suşları ortaya çıkmış ve bu suşlar 1950'li yılların sorun yaratan bakterileri olmuştur. Penisilinaza dirençli penisilinlerin 1960'da kullanıma girmesinden iki yıl sonra ilk metisiline dirençli *S. aureus* izolatı saptanmıştır. İlk kez 1995 yılında Fransa'da VISA (vancomycin intermediate *S. aureus*), 1996'da Japonya'da hetero-VISA ve sonunda 2002 yılında A.B.D.'nde VRSA (vancomycin resistant *S. aureus*) suşlarının saptanması ile, Stafilokoklarda çoğul antimikrobiyal direnci sorunu daha da ürkütücü hale gelmiştir (Baddour ve ark 2007).

*Koagulaz Negatif Stafilokoklar*da antibiyotiklere direnç gelişimi, özellikle hastane infeksiyonlarının tedavisi ve eradikasyonu açısından problem oluşturmaktadır (Franciolli ve ark 1991, Maple ve ark 1989, Auwera ve ark 1990, Gray ve ark 1984, Kotilainen ve ark 1990, Younger ve ark 1987). Stafilokoklar sporsuz bakteriler içerisinde en dirençli bakterilerdendir (Boussard ve ark 1993). Penisilinlerin kullanılmaya başlandığı yıllarda *S. epidermidis* suşlarının % 80'i penisiline duyarlıyken, 1940'lardan sonra bu direnç giderek artmış, bugün için % 85-90 oranlarına ulaşmıştır (Kloos ve ark 1994, Ludlam ve ark 1989). Ülkemizde Ulusoy ve arkadaşlarının 1995 yılında çeşitli klinik örneklerden izole ettiği *Koagulaz Negatif Stafilokok* suşlarında penisilin direncini % 79.9, Kurt ve arkadaşları 1992 yılında % 64 olarak bildirmişlerdir. Böylesine yüksek oranda direnç oluşum mekanizmasıyla ilgili daha önce yapılan çalışmalarda en büyük rolü plazmidler aracılığı ile aktarılabilen beta laktamaz enziminin oynadığı saptanmıştır (Boussard ve Pithsy 1993,

Degener ve ark 1994, Johnson ve ark 1986). Araştırma sonuçları ülkemizde yüksek oranda bulunan penisilin direncinin önemli bir sorun olduğunu göstermekte ve beta laktamaz içeren Stafilokokların sebep olduğu enfeksiyonlarda bilinçsizce penisilin grubu antibiyotik kullanımının antibiyotik duyarlılık testleri yapılarak önlenmesi gerektiğini vurgulamaktadır. *Koagulaz Negatif Stafilokok'lar*da 1980'li yıllarda penisilin direnci % 41-74 olarak bildirilmiştir. Diğer yandan *Koagulaz Negatif Stafilokoklar'*ın (KONS) girişimsel tanı ve yöntemlerinin kullanımının artması ile fırsatçı enfeksiyon etkeni olarak artan sayıda saptanmakta, bu bakterilerdeki metisilin direncide önem kazanmaktadır (Willke 1992). Bazı hastanelerde Stafilokok prevalansının endemik hale gelmesiyle problemin boyutları dramatik olarak büyümüştür. Bu da tedavide kullanılabilecek antimikrobiyalleri önemli ölçüde sınırlandırmıştır. Metisilin dirençli Stafilokokların etken olduğu infeksiyonların morbidite ve mortalitesinin yüksek olması ve yüksek ek maliyet, çoğul antimikrobiyal dirençli Stafilokokların hemen her ülkede izlenmesine yol açmıştır (Derbentli 2005).

1.10.Stafilokoklarda Metisilin Direncinin Mekanizmaları

1.10.1. *mec* DNA

Stafilokokların duyarlı suşlarında bulunmayan yaklaşık 30-50 kb ilave kromozomal DNA, mec metisilin dirençli suşlarda vardır. Mec mecA, penisilin bağlayan protein 2a (PBP2a) için strüktürel gen; mecI ve mecR1, mecA transkripsiyonun regülatör element kontrölü; ve 20-45 kb mec-birleşik DNA içerir (Chambers 1997).

1.10.2. *mecA*

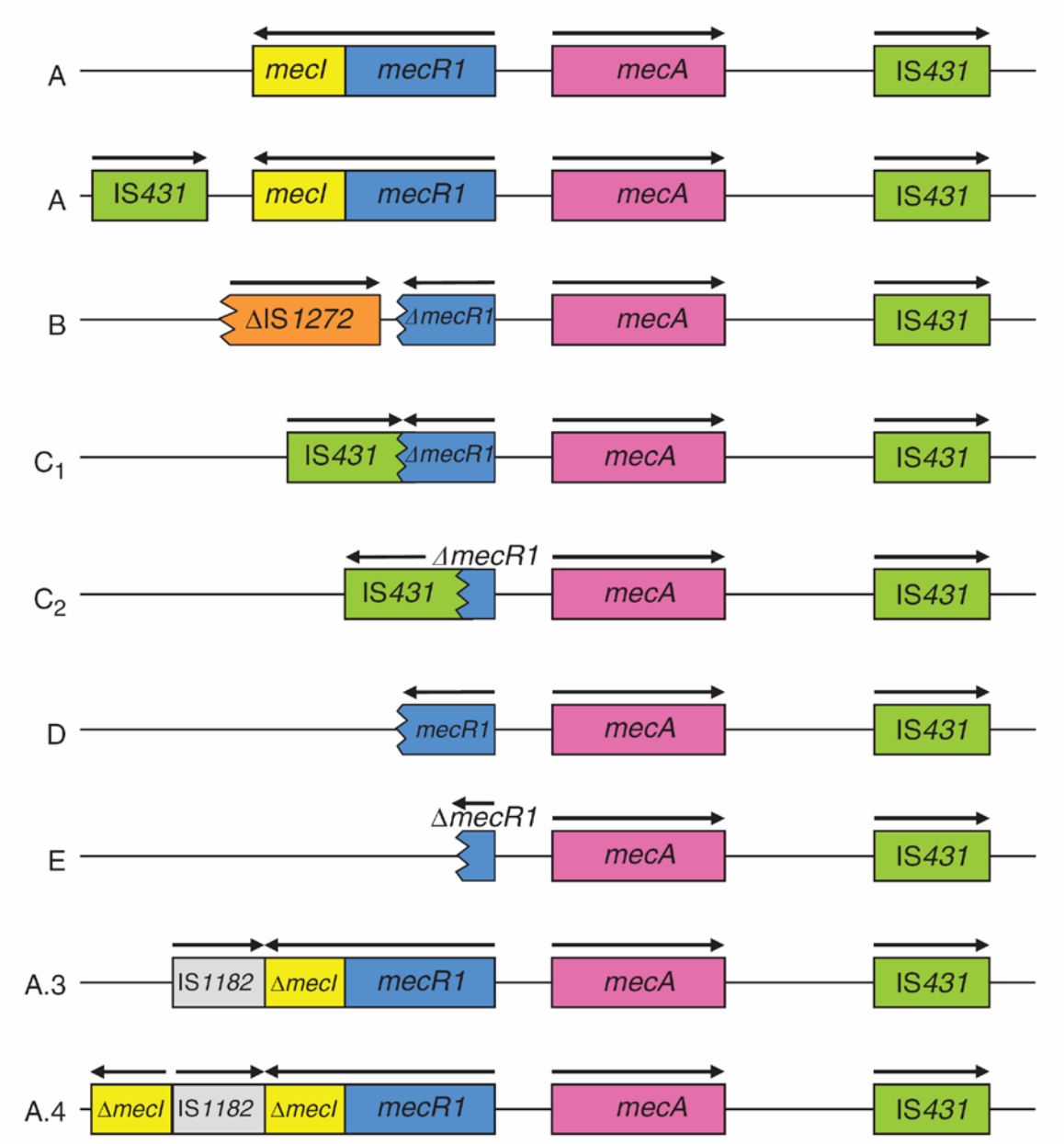
mecA metisilin dirençliliği belirleyen indüklenebilir 76-kDa PBP olan PBP2a'yı (ayrıca PBP2' de denir) kodlar. Duyarlı suşlarda mecA'nın homoloğu bulunmaz. Hem duyarlı hem de dirençli *S. aureus* suşları 4 major PBPs (PBPs1, 2, 3, 4) içerir. PBPs srein proteazdan evrimselleşmiş membran engelli DD-peptidazdır ve onların biyokimyasal yapısı serin proteazlara benzemektedir. Bu enzimler bakteriyel hücre duvarının çapraz bağ peptidoglikan olan transpeptidasyon reaksiyonunu katalizler. Beta-laktam antibiyotikler serin aktif bölge PBP'sine kovalent bağlarla bağlanmış substrat analoglarıdır, enzim

yaklaşık olarak MIC'ler ile aynı konsantrasyon oranlarında inaktive olur. Çoğu beta-laktam atibiyotiklere yüksek affinitesi olan PBPs 1, 2, 3 hücre büyümesinde ve duyarlı suşların hayatta kalabilmesinde esansiyeldir ve bu PBPs'ler ile bağlanmış beta-laktamlar ölümcül olabilmektedir. Metisilin dirençli hücrelerde, beta-laktam anitibiyotiklere düşük affinite ile bağlanan PBP2a, diğer letal antibiyotiklerin konsantrasyonlarında yüksek affiniteli PBPs'lerin esansiyel fonksiyonlarını yapabilir (Weller 1999).

mecA geni, Stafilokok türleri arasında oldukça iyi korunmuştur. *mecA* gen ürünü olan PBP2a yüksek moleküler ağırlıklı PBP'dir. Yüksek afiniteli PBP'lerde mevcut olan Penisilin bağlayıcı bölgenin aynısı PBP2a'da da bulunmaktadır. *mecA* geninin ilk 300 nükleotidlik promoter bölgesi ve regulator genleri dizi olarak Stafilokokların Beta-laktamaz bölgeleriyle benzerdir (Mallorqu ve ark 2004).

mecA'nın orjininin anlaşılması güçtür. Metisiline dirençli Stafilokokların *mecA* molekülü ile%88 oranında aminoasit benzerliği taşıyan bir *mecA* homoloğu *Staphylococcus sciuri'*detespit edilmiştir (Chambers 1997, Couto ve ark 2000, Lowy 2003, Japoni ve ark 2004). İlginçtir ki, *mecA* homoloğu bu türlerde yaygındır, fakat onun fenotipi duyarlıdır. Bunlar ve diğer veriler *mecA*'nın *S. scuri'*yeyakın bir *Koagulaz NegatifStafilokok* türünden meydana geldikleri tezini desteklemektedir. Metisiline dirençli tüm *S. aureus* suşları *mecA'*yıkazanan 50k az sayıdaki ata suşların soyundan gelen klonal suşlardır (Chambers 1997).

mecA 'nın Metisiline dirençli Stafilokoklar tarafından nasıl kazanıldığı tam olarak bilinmemektedir (Chambers 1997).



Şekil 1.1. Stafilokoklarda *mec* geni sınıfları (Hanssen ve ark 2006).

1.10.3. *mecI* ve *mecR1*

mecI ve mecRI genleri, *mecA* promotorunun hemen yukarı kısmında lokalize olup farklı yönde eksprese olan düzenleyici genlerdir (Kuwahara ve ark 1996, Hakenbeck ve Coyette 1998, Kobayashi ve ark 1999, Weller 1999, Mallorqu ve ark 2004). Moleküler düzen, yapı, fonksiyon ve regülasyon mekanizması açısından Stafilokokal Beta-laktamaz regülatör elemanları olan *blal* ve *blaRF'*yebenzerlik gösterirler. *blal,* Beta-laktamaz geninin transkripsiyonunu baskı altında tutan DNA bağlayıcı bir proteindir. *blaRl* ise Beta-

laktam antibiyotiklerinin varlığında Beta-laktamaz geninin transkripsiyonunu indükleyen bir PBP'dir. Mecl ve MecRl da *blal* ve *blaRl*'yebenzer bir mekanizma ile *mecA*'nınregülasyonunda rol oynarlar (Chambers 1997).

1970'ten önceki klinik izolatların büyük kısmında *mecRl'*inPenisilin bağlayıcı bölgesinde ve tam *mecl* geninin büyük bir kısmında delesyonlar mevcuttur. Bu suşlarda PBP2a üretimi sürekli olmaktadır. 1980'den beri izole edilen suşların çoğunda ise düzenleyici genlerdeki delesyonların yerini *mecl* genindeki polimorfizmler ve *mecA* promoter bölgesindeki mutasyonlar almıştır (Chambers 1997).

1.11. Metisilin Dirençlilik Çeşitleri

1.11.1. İntrinsik Metisilin Direnci

Bu tip direnç gösteren Stafilokoklara MRS denir. MRS suşlarındaki dirençlilik; bu bakterilerin normal penisilin bağlayan proteinlerden (PBP) farklı olarak beta-laktam antibiyotiklere daha düşük affinitesi olan, PBP2a veya PBP2 adı verilen PBP'leri nedeniyledir. Bilindiği gibi PBP'ler hücre membranında bulunan, bakteride penisilin etkisinin primer biyokimyasal hedefleridir. Bu proteinler aynı zamanda hücre duvar sentezi sırasında peptidoglikan polimerlerinin çapraz bağlanma reaksiyonunu katalizleyen enzimlerdir. Beta-laktamlar PBP'lerin aktif kısımlarından kovalent bağlarla bağlanırlar. Metisiline duyarlı Stafilokoklarla arasındaki esas farklılık PBP'lerindeki farklılıktır. MRS'lardaki PBP2a'nın diğer PBP'lerden molekül ağırlığı çok az farklıdır, ancak beta-laktam antibiyotiklere bağlanma eğilimi düşüktür. Diğer yandan PBP2a yüksek antibiyotik yoğunluğunda muhtemelen bakterideki diğer PBP'lerin fonksiyonunu da üstlenmektedir, aksi takdirde normal PBP fonksiyon eksikliği nedeniyle bakterinin ölümü söz konusu olacaktır (Lyon ve ark 1987, Hackbarth ve ark 1989).

Metisilin dirençli Stafilokoklarda PBP2a oluşturulması kromozomal kontroldedir; çoğu zaman metisilin veya diğer beta-laktamların varlığında indüklenebilir (inducible), bazen de yapısaldır (constituve).

Yapısal oluşturulan PBP2a içeren MRS'ların direnç fenotipi homojendir, yani bakteri topluluğundaki tüm bireyler dirençlidir.

İndüklenebilir PBP2a içeren MRS'larda direnç fenotipi heterojendir, aynı bakteri topluluğunda dirençli suş oranı 10^3-10^6 arasında değişir (Dündar 2000). Buna heterorezistans da denir (Hackbarth ve ark 1989). Heterojen populasyondaki yüksek seviyede direnç gösteren bu hücre azınlığı, *mec* elementi dışında oluşan *chr* olarak belirtilen ilave kromozomal mutasyonları taşırlar. chr'deki mutasyonların homojen metisilin direncine katkısı bilinmemekle beraber yeni tanımlanan *hmr* lokusundaki mutasyonlar bazı direnç mekanizmalarının sorumlusu olabilir (Berger-Bachi ve ark 2002, Akcam ve ark 2007). Heterojenik suşlarda hücrelerin çoğunluğu (genelde % 99.9 veya daha fazlası) beta-laktam antibiyotiklere düşük konsantrasyonlarda duyarlıdır. Bütün klinik izolatlar rutin üreme şartlarında bu heterojen yapıyı sergilemektedir. Bununla birlikte heterojen suşlar kültür koşullarında (NaCl veya sükroz veya 30˚C ile desteklenen hipertonik kültür besiyerinde üreme gibi) homojen görülebilir (50µg/ml metisilin konsantrasyonunda üreyen hücreler). 37-43˚C'de inkubasyon veya EDTA ilavesi (pH5.2) heterojen yapıyı destekler ve bütünüyle dirençliliği bastırabilir. Bu değişim geçici ve fenotipiktir. Beta-laktam antibiyotiklerin varlığında heterojen suşların pasajı yüksek dirençli mutant klonları seçerek direnç fenotipini değiştirir. Bu klonlar yüksek dirençli hücrelerin homojen suşlarından üretilir ve bu yüksek dirençli hücreler 50-100µg/ml'deki metisilin konsantrasyonlarında üreyebilir. Antibiyotik bulunan besiyerinde tekrarlanan subkültürler ile yüksek dirençli hücrelerin oranı kademeli olarak azalır ve orijinal heterojen örnekler yeniden ortaya çıkar (Chambers 1997).

Yapılan genetik çalışmalarda PBP2a'nın mecA ya da mecA geni adı verilen bir kromozomal genin 2.1 kilobase'lik bir kısmı ile kodlandığı gösterilmiştir. Kontrandüksiyon çalışmaları ile MSS'larda mecA'ya alel gösterilememiştir (Lyon ve ark 1987).

Yapılan çalışmaların verileri PBP2a geninin, Stafilokokların beta-laktamaz geni ile diğer cins bakterilerin PBP genlerinin füzyonu ile oluştuğunu düşündürmektedir (Lyon ve ark 1987, Hackbarth ve ark 1989).

MRS'larda mec geninin ekspresyonunu etkileyen, fenotipi belirleyen en az 3 regülasyon mekanizması vardır. Birincisi; PBP2a oluşumunun bakteride hem *mecA* geni hem de beta-laktamaz plazmidi varsa, beta-laktamlar tarafından indüklendiği gözlemine dayanmaktadır. Bu nedenle beta-laktamaz geninin kontrolü ile PBP2a geninin benzer olduğu düşünülmektedir. İkincisi; mec geni içindeki bir kısmın PBP2a yapımını regüle ettiği, bunun da fenotipi etkilediği, üçüncüsü ise mecA dışında bir yerde lokalize olan femA geni tarafından metisilin direncinin ekspresyonunun belirlendiğidir (Lyon ve ark 1987, Hackbarth ve ark 1989).

1.11.2. "Borderline" Metisilin Direnci

Buna kazanılmış metisilin direnci de denmektedir. Metisiline karşı bakteri direncinin azalmasının bir diğer mekanizması 1984'de McDougal ve Thornsberry tarafından tanımlanan, Stafilokokların aşırı beta-laktamaz üretimine bağlı dirençliliğidir. Bu suşlar metisiline sınırda bir direnç gösterdiği için bunlara "borderline" denmektedir. Penisilinaza dirençli penisilinler (PRP) aslında Stafilokokların penisilinaz enzimlerinin hidrolitik etkilerine dayanıklıdırlar. Ancak bazı Stafilokok suşları aşırı miktarda panisilinaz oluşturarak metisilin ve oksasilini yavaş fakat önemli ölçüde parçalar. Ortama sulbaktam veya klavulanat eklendiğinde bu suşlara karşı PRP'lerin minimum inhibitör konsantrasyonları (MIC) birkaç misli düşmektedir. BORS suşları PBP2a oluşturmamaları ve direnç kontrolünün plazmide bağımlı olmasıyla MRS'lardan farklıdırlar (McDougal ve ark 1986). Borderline suşlar *mecA*'nın olup olmaması baz alınarak ikiye ayrılabilir. *mecA* içeren suşlar PBP2a üreten aşırı derecede heterojen metisilin dirençli suşlardır. Bu suşlar yüksek ilaç konsantrasyonunda üreyebilir ve küçük oldukları halde hücreler dirençli subpopulasyonlara sahiptir (Chambers 1997). *mecA* içermeyen suşları heterojen *mecA* pozitif suşlardan fenotipik olarak farklı olabilir.mecA negatif suşlardaki borderline dirençlilik Stafilokokkal beta-laktamaz'ın aşırı üretiminin veya normal PBP genlerinin modifikasyonunun sonucu olduğu varsayılmaktadır (McDougal ve Thornsberry 1986).

Modifiye PBPs'nin borderline dirençliliğini üretebildiğine dair kanıtlar bulunmaktadır. Tomasz ve arkadaşları *mecA* negatif, beta-laktamaz negatif klinik izolatlarında, PBPs 1, 2, ve 4 tarafından penisilin bağlamanın değişimini rapor etmiştir. Berger-Böchi ve arkadaşları antibiyotik içinde pasaj ile seçilmiş dirençli mutantlarda PBPs 2 ve 4'ün değişimlerini bulmuştur (Chambers 1997).

1.11.3. “Intermediate” Metisilin Direnci

Stafilokoklarda modifiye PBP’lere bağlı metisiline duyarlılık azalmasıdır. Bu tip dirençli suşlara MODS denmektedir. MODS suşları normal yapıda PBP1 ve PBP2 içerirler; ancak bu PBP’lerin beta-laktam antibiyotiklere affinitesi düşüktür. Ayrıca MODS suşlarında normalden fazla miktarda PBP4 vardır (Willke 1992).

1.12. Metisilin Direncinin Düzenlenmesi

PBP2a’nın sentezi MecI ve MecR1 proteinleriyle ve eğer varsa regulatör *blaZ* sistem proteinleriyle düzenlenir. Aynı zamanda iç ve dış faktörler de metisilindirencini etkiler (Berger-Bachi ve ark 2002, Stapleton ve ark 2002).

1.12.1. İç Faktörler

PBP2a metisilin direncini düzenlemede esas olduğu için, *mecA* geninin ekspresyonu ile ya da PBP2a’nın aktivitesi ile ilişkili olan her faktör metisilin direncine etkili olabilir. Genetik ve biyokimyasal çalışmalar PBP2a’nın katı bir substrat gereksinimine sahip olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak bu substratların oluşumunu etkileyen herhangi bir faktör metisilin direncine müdahale edebilir. Bu durumda fosfomisin, β-kloro-D-alanin ve D-sikloserin gibi hücre duvar sentezinin erken inhibitörlerinin metisilin direncini azalttığı bulunmuştur. Çalışmalar PBP2a’nın aşağıdakilere gereksinim duyduğunu göstermektedir:

Belli uzunlukta glikan zinciri: PBP2a, PBP2’nin transglikozilaz aktivasyonuna bağımlıdır. beta-laktamlar yüksek moleküler ağırlıklı PBP’lerin transpeptidaz bölgelerini inhibe ederler. Ancak transglikozilaz bölgesini etkilemezler. PBP2’nin transglikozilaz bölgesinin inaktivasyonu, uzunluğu daha kısa glikan zincirlerinde bir artışa ve metisilin direncinde belirgin bir düşüşe sebep olur (Stapleton ve ark 2002).

Ana peptidlerin normal peptid konfigürasyonuna sahip olması gerekir: Besiyerine glisin eklenmesi, peptidoglikan ana peptidlerinin iki alanin rezidüsüyerine, iki glisin

rezidüsünde son bulmasına yol açar. Bu da metisilin direncindeazalmaya ve çok dirençli homojen suşların heterojen fenotiplere dönüşmesine yolaçar (Stapleton ve Taylor 2002).

Pentaglisin çapraz köprülerinin sağlam olması gerekir: femA, femB ve *femX*'in hepsi glikan zincirlerini birbirine bağlayan, pentaglisin çapraz köprülerinin kurulmasında rol oynarlar. *femX* ilk glisini ekler, *femA* glisin 2 ve 3'ü ve *femB* glisin 4 ve 5'i ekler. *femA* ve *femB* birbirlerinin görevini yapamaz. Bu proteinleri kodlayan genlerin herhangi birinin inaktivasyonu, sırasıyla mono ya da triglisin çapraz köprüleri içeren hücre duvarlarıyla sonuçlanır. *femA* ve *femB* genlerinin herhangi birisinin inaktivasyonunun letal olduğu düşünülmektedir ancak tamamlayıcı mutasyonlar hücre canlılığını yeniden düzenleyebilir. *femA* ya da *femB*'nin inaktivasyonu metisilin direncinde büyük oranda azalmaya yol açar. Sonuç olarak *femA* ve *femB* proteinleri, MRSA infeksiyonları için yeni ilaç çalışmalarının hedefi olabilirler. *femA* ve *femB*'nin inaktivasyonunun ek bir avantajı da aynı zamanda virulans faktörlerin sekresyonunu etkileyerek infeksiyon yapabilme özelliğini kısıtlar (Stapleton ve ark 2002). Peptidoglikan sentezi, biyosentetik enzimlerin eşgüdümlü fonksiyonlarının yanı sıra, aynı zamanda peptidoglikanın yeniden şekillenmesini ve hücre bölünmesi ile ilgili var olan litik enzimlerin fonksiyonlarını da gerektirir. Metisilin direnci, hücrelerin otolitik enzim aktivitelerini etkileyen genlerin inaktivasyonundan da etkilenir. Bilinmeyen fonksiyonlu proteinleri kodlayan *llm* geninin inaktivasyonu homojen suşları, heterojen fenotipe dönüştürür ve artan sayıda otolitik aktivite ile ilişkilidir. Sar, Agr ve SigmaB gibi global düzenleyici proteinlerin aktivitelerinin metisilin direncini etkilediği bilinmektedir. Bu proteinlerin etkileri muhtemelen hücre duvarı ve ekzoproteinlerin sentezinde görev yapan kontrol genleri aracılığıyladır (Stapleton ve ark 2002). Metisilin direnç seviyesini etkileyen kromozomal genler Çizelge 1.4.'de özetlenmistir.

Çizelge 1.4. Metisilin Direnç Seviyesini Etkileyen Kromozomal Genler (Deurenberg ve ark 2007)

GEN	**Fonksiyonu veya metisilin direnç seviyesine etkisi**
fmhB (femX)	İnterpeptid formasyonu; ana peptide ilk glisini ekler, inaktivasyonu letaldir
femA	İnterpeptid formasyonu; ana peptide 2. Ve 3. Glisini ekler, inaktivasyonu metisilin direncini ortadan kaldırır.
femB	İnterpeptid formasyonu; ana paptide 4. Ve 5. Glisini ekler, inaktivasyonu metisilin direncini azaltır.
femC (glnR)	Glutamin sentezini baskılar; inaktivasyonu metisilin direncini azaltır.
femD	Fosfoglukozamin mutaz; glukozamin-6-fosfatın, glukozamin-1-fosfata dönüşümünü katalize eder, sitoplazmik peptidoglikan prekürsörüdür, inaktivasyonu metisilin direncini azaltır
femE	Fonksiyonu bilinmiyor; inaktivasyonu metisilin direncini kısmen azaltır.
femF (murE)	Peptidoglikan ana peptide lizinin birleştirilmesini katalizler; inaktivasyonu metisilin direncini azaltır.
fmtA	Membran proteini, inaktivasyonu peptidoglikan çapraz bağlarında azalmaya ve metisilin direncinde azalmaya yol açar.
fmtB (mrp)	Hücre yüzey proteini; fonksiyonu bilinmemektedir, inaktivasyonu metisilin direncini azaltır.
fmtC (mrpF)	Membran ilişkili protein; inaktivasyonu metisilin direncini azaltır.
Llm	Fonksiyonu bilinmemektedir; inaktivasyonu metisilin direncini azaltır.
lytH	Litik enzimlerin homoloğu; inaktivasyonu metisilin direncini arttırır.
PBP2	Penisilin binding protein 2; PBP2'nin fonksiyonel transglikozilaz bölgesi metisilin direnci için gereklidir.
sigB	Yardımcı transkripsiyon faktörü; inaktivasyonu metisilin direncini azaltır.
hmrA	Varsayılan aminohidrolaz; fazla ekspresyonu metisilin direncini arttırır.

1.12.2. Dış Faktörler

Tuz konsantrasyonu, pH, besiyeri kompozisyonu, osmolarite ve ısı belli baslılarıdır. Bu dış etkenlerden bazıları, heterojen metisilin direnci gösteren suşların tespitini kolaylaştırmak için laboratuvarlarda kullanılır. izolatlar yüksek NaCl konsantrasyonu (% 2) ve düşük ısılarda (30 35°C) üretilir. NaCl konsantrasyonu ve ısının bu etkiyi nasıl yaptığı bilinmemektedir. Metisilin direnç seviyelerinin multiple kromozomal faktörlere bağlı olduğu gösterilmiş olsa da, klinik izolatlarda yüksek seviyeli dirence yaptığı katkı ispatlanamamıştır. Transkriptom veya proteom analizi gibi yeni geliştirilen teknikler, bu sorunun çözülmesine yardımcı olacaktır (Stapleton ve ark 2002).

1.13. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Bir infeksiyonun sağaltımı ile ilgili uygun antimikrobiyal ajan seçiminde; olası infeksiyon etkeni, infeksiyon etkeninin antibiyotik duyarlılığı, ilacın *in vivo* aktivitesini etkileyebilecek konak faktörleri, infeksiyonun yeri, ilacın farmakodinamik ve farmakokinetik özellikleri gibi bir dizi faktörün değerlendirilmesi gereklidir (Arman 1998, Craig 1998). Antimikrobiyal ajanın etken mikroorganizma üzerinde *invitro* aktivitesi tedavide göz önüne alınması gereken faktörlerden biridir. Bir antibiyotiğin antimikrobiyal aktivitesinin saptanması için uygulanan *in vitro* işlemlere genel olarak duyarlılık testleri adı verilmektedir (Jorgensen 1997, Gülay 1999). Duyarlılık testleri, klinik açıdan önemli, hızlı üreyen aerop ve fakültatif anaerop bakterilerin tedavide uygulanacak antibakteriyel ajana duyarlılığın öngörülemediği durumlarda yapılmaktadır.

Antimikrobiyal ilaçlara karşı duyarlılık birçok yöntem ile saptanabilmektedir. Rutin laboratuvarlarda uygulanan testlerle genellikle ilaçların inhibitör (bakteriyostatik) aktivitesi değerlendirilir. Bu amaçla uygulanan yöntemler:

1. Katı veya sıvı besiyerlerinde seyreltme (dilusyon) yöntemleri
2. Disk difüzyon yöntemi
3. Gradiyent difüzyon (Etest) yöntemi (Jorgensen 1997, Gülay 1999).

1.13.1. Agar Dilusyon Yöntemi

Seyreltme yöntemlerindestandart sayıda bakteri topluluğu (inokulum), iki katı dilüsyonlar şeklinde değişen yoğunluklarda antimikrobiyal ajan ile karşılaştırılır. İnkubasyon süresi sonunda gözle görünür üremeyi engelleyen en düşük antimikrobiyal ilaç yoğunluğu saptanır. Buna Minimum İnhibitörKonsantrasyon (MİK)denir ve mg/L şeklinde ifade edilir. MİK değerinin duyarlılığı mı yoksa direnci mi temsil ettiğinin belirlemek için, bulunan konsantrasyon duyarlılık sınırıadı verilen bir değer ile karşılaştırılır. MİK, bu sınırdan düşük ise mikroorganizma söz konusu ajana duyarlı olarak değerlendirilir. Bunun dışında orta ve dirençli kategorileri de saptanır. Duyarlılık sınırları, sağaltım sırasında ulaşılan serum ve doku düzeyleri ile, duyarlılık özelliği kesin olarak bilinen bakterilerin MİK değerleri göz önüne alınarak belirlenmektedir. Her antimikrobiyal ajan için bakteri türüne göre de değişen ayrı bir sınır değer söz konusudur. Genel olarak sağaltımın başarısı için MİK değerinin serum düzeyine (Cmax) kıyasla 4-16 kez düşük olması istenmektedir (Craig 1997). Seyreltme temeline dayanan testler kantitatif sonuç verdiği için yeğlenmektedir. Sıvı besiyerindeki seyreltme yöntemleri, tüpte uygulanılıyorsa makro (tüp) dilusyon, mikrodilüsyon plaklarında uygulanıyorsa mikrodilüsyon olarak adlandırılır (NCCLS 1997).

1.13.2. Disk Difüzyon Yöntemi

Disk difüzyon yöntemindebelirli bir miktar antibiyotik emdirilmiş kağıt diskler, test mikroorganizmasından hazırlanan standart süspansiyonun yayıldığı agar plakları yüzeyine yerleştirilir. Böylelikle, diskteki antibiyotik agar içerisine yayılır ve bakteriye etkili olduğu düzeylerde üremeyi engeller. Bunun sonucunda, disk çevresinde bakterilerin üremediği dairesel bir inhibisyon alanı oluşur. Bu alanın çapı ölçülerek duyarlılık kategorileri belirlenir. Bu kategoriler ile ilgili sınır değerleri, her antimikrobik ajan için MİK ile korele edilerek ve erişilebilir serum düzeyleri göz önüne alınarak saptanır (Jorgensen 1997, Huang ve ark 1993)

1.13.3. E-test

Difüzyon temeline dayanan ancak diskler yerine belirli ve sürekli bir konsantrasyon değişimi olacak şekilde antibiyotik içeren plastik striplerin kullanıldığı bir yöntemdir. İnkübasyon süresi sonunda, elips şeklindeki inhibisyon alanının stripi kestiği konsantrasyon MİK olarak belirlenir. Bu yöntem özellikle *Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae, Neisseria gonorrhoea* gibi güç üreyen bakteri türlerinin MİK değerlerinin saptanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Jorgensen 1997).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. İzolasyon Örnekleri

Yapılan bu tez çalışmasında 2012 yılı yaz aylarında Aydın ili ve çevresinde bulunan laktasyon döneminde olan ve CMT pozitif reaksiyon veren subklinik mastitisli 100 adet keçinin herbirinden olmak üzere toplamda 100 adet süt örneği toplanmıştır.

2.1.2. Besiyerleri, Ayıraçlar, Solusyonlar ve Antibiyotik Diskleri

2.1.2.1. 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 kanı ilave edilmiştir.

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

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

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

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

2.1.2.1.3. 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 121^{o}C'de 1 atm basınçta 15 dakika sterilize edildi. 45–50^{o}C'a soğutulup steril petri kutularına 12,5 ml dökülmüştür.

2.1.2.1.4. Katyonu Ayarlanmış Mueller-Hinton Broth (CAMHB) (Oxoid CM 0405)

Mueller-Hinton Broth…….	21 g
Distile su……	1000 ml
pH: 7,3±0,2	

Besiyeri 21 g olacak şekilde distile su içinde kaynatılarak eritilip 121^{o}C'de 1 atm basınçta 15 dakika sterilize edildi. 45–50 ^{o}C'a soğutulup kullanılana kadar +4 ^{o}C'de saklandı.

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

BHIB ……..……..	8 g
Gliserin ……..	20 ml
Distile su……	80 ml

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

2.1.2.1.6. Tryptic Soy Broth (CASO) (Merck 1.05459)

Peptone from casein……	17 g
Peptone from soymeal……..	3 g
D (+) Glucose……	2,5 g
NaCL ……..……..	5 g
K_2HPO_4 ……	2,5 g
Distile su……	1000 ml

Karışımın 25°C'deki pH'sı 7,3–7,5 olacak şekilde ayarlandı. 5 ml miktarda tüplere dağıtıldı. 121°C'de onbeş dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

2.1.2.1.7. DNAse Test Agar (Merck 1.10449)

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

Karışımın pH'sı 7,2–7,4'e ayarlandı. 121°C'de onbeş dakika otoklavda sterilize edildi. 12,5'er ml miktarda steril petrilere dökülmüştür.

2.1.2.1.8. Urea Broth (Merck 1.08483)

Yeast extract ……	0,1 g
KH_2PO_4……..	9,1 g
Na_2HPO_4……	9,5 g
Phenol red ……	0,01 g
Urea ……..	20 g
Distile su……	1000 ml

Karışımın pH'sı 6,8-7,00'a ayarlandı. Broth tamamen eritildikten sonra membran filtre yöntemi ile 3 ml olarak tüplere dağıltılmıştır.

2.1.2.1.9. Antibiyotik Sulandırmaları

$$\text{Ağırlık (mg)} = \frac{\text{Hacim (ml) x Konsantrasyon (µg/ml)}}{\text{Deney Potensi (µg/mg)}}$$

NCCLSI M31-A2 standartında belirtildiği üzere antibiyotik tozlar hesaplanmış ve uygun solvent ve diluentte sulandırılmıştır.

2.1.2.2. Solusyonlar

2.1.2.2.1. TAE Elektroforez Buffer

50x konsantrasyonda stok solusyon aşağıdaki gibi hazırlanmıştır:

Tris Base…….	40 mM
Asetik Asit …….	20 mM
EDTA …… ……	1 mM

Buffer solusyonu olarak stoktan 20 ml alınıp distile su ile hacim 1000 ml'ye tamamlanarak oda sıcaklığında saklanmıştır.

2.1.2.2.2. Gel Loading Buffer (6 X)

Bromofenol mavisi…….....	25 mg
Sukroz …….....	4 g
H_2O.....…….....	10 ml'ye tamamlanmıştır.

2.1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

2.1.3.1. Kullanılan Cihazlar

PCR 25 örnek kapasiteli Eppendorf MasterCycler kademeli termal döngüleme cihazında gerçekleştirilmiştir.

2.1.3.2. $MgCl_2$, Taq DNA Polymerase, 10X Taq Buffer, dNTP Set

2,5 mM $MgCl_2$, Taq DNA polimeraz (1U), 10X Taq Buffer (100 mM (Tris-HCl, pH 8,3,500 mM KCl) 0,2 mM deoksinükleotid trifosfat (dNTP) set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Fermentas®) kullanıldı.

2.1.3.3. Primerler

mecA geninin tespiti için araştırmamızda kullanılan primerler Çizelge 2.1.'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan primerler

Primer	Oligonükleotiddizisi (5'-3')	Referans
mecA1	5'-CTCAGGTACTGCTATCCACC-3'	Virdis ve ark 2010
mecA2	5'-CACTTGGTATATCTTCACC-3'	Virdis ve ark 2010

2.1.4. Elektroforez Cihazı

Elektroforez işlemi Biorad® marka, elektroforez tankında, görüntüleme işlemi Vilber Lourmat marka görüntüleme cihazında gerçekleştirilmiştir.

2.1.4.1. Agarose Jel Hazırlanışı

Agarose (Prona) …….. 2 g

TAE (0,5x) …….. 100 ml

Buffer, şişe içerisindeki agarozun üzerine ilave edilip, karıştırıldı ve mikrodalga fırında yaklaşık 3–5 dk. kaynatılan karışım, 50°C'ye kadar soğutuldu. Etidyum brömür ilave edildikten sonra, halen sıvı halde olan karışım, jel kalıbının içerisine yavaşça, kabarcık bırakmayacak şekilde döküldü ve içerisine yükleme kuyucuklarını oluşturacak olan taraklar yerleştirilerek, 15–20 dakika oda ısısında soğumaya bırakıldı. Soğutulan jel, kalıptan çıkarılarak, elektroforez tankına dikkatlice yerleştirildi.

2.1.4.2. Marker

Marker olarak 100 bp lik DNA ladder (Fermentas®) kullanıldı.

2.1.4.3. Etidyum Bromür

Elektroforez işleminden önce görüntüleme için jelin boyanmasında Biochemica® marka % 1'lik Ethidium Bromür 50°C'ye kadar soğutulan agaroz jel içerisine 5 µl miktarında eklenerek kullanıldı.

2.1.4.4. Standart Suşlar

Tüm testlerde kalite kontrol suşları olan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 kontrol olarak kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Örneklerin alınması

Her süt örneği alınırken, meme başları su ve sünger yardımı ile temizlenip kurulanmış ve % 70'lik alkol ile silinmiştir. Meme başındaki saprofit bakterileri uzaklaştırmak için ilk birkaç ml süt atıldı. Steril enjektörler içine 5 ml miktarda alınmıştır.

Alınan tüm örnekler soğuk zincir altında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına aynı gün getirilip laboratuvar çalışmalarına başlanılmıştır. İncelemesi yapılan tüm keçi materyalleri hayvan sahipleri bilgilendirilip, izin alınarak temin edilmiştir.

2.2.2. *Staphylococcus sp.* izolasyonu

Laboratuvara getirilen süt örnekleri doğrudan MSA'ya ekilmiştir. 37 °C'de 24 saat inkubasyondan sonra üreyen koloniler % 7 Koyun kanı içeren Kanlı agara ekilmiş ve 24 saat inkubasyondan sonra gram boyama yapılarak gram pozitif kok olarak değerlendirilen suşların biyokimyasal özellikleri standart laboratuvar işlemleri uygulanarak değerlendirilmiştir (Murray ve Patrick 2003).

2.2.2.1. Gram Pozitif Kokların İdentifikasyon

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

2.2.2.1.1. Katalaz Testi*:* Bu test için besiyerinde üreyen kolonilerden steril öze ile alınıp temiz bir lam üzerine aktarıldıktan sonra üzerine 1–2 damla % 3'lük hidrojen peroksit damlatılmıştır. Katalaz enzimi oluşturan bakteriler hidrojen peroksiti su ve oksijene ayrıştırdığı için ortamdaki oksijen çıkışı kabarcık oluşumu ile belirlenmiştir. Bu nedenle test sonucu kabarcıklar meydana geldiğinde katalaz pozitif, kabarcıklar oluşmadığında ise katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir. *Streptococcus* spp. katalaz negatif, *Micrococcaceae* familyasındaki *Micrococcus* spp. ve *Staphylococcus* spp. ise pozitifdir (Murray ve Patrick 2003).

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

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

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

2.2.2.1.6. DNAse Testi: DNA'lı besiyerine *Koagulaz Negatif Stafilokok* kültüründen çizgi ekimi yapılıp 35°C'de 24 saat bekletilmiş, daha sonra agar yüzeyine 1 N HCl damlatılmıştır. Ekim çizgisinin çevresinde saydam bir zon oluşması ile test değerlendirilmiştir.

2.2.2.2. Antibiyogram

2.2.2.2.1. Bakteri İnokulumun Hazırlanması

Kanlı Agarda üremiş kolonilerden aynı morfolojideki 5 koloni Triptic Soy Broth'a ekilmiştir. 0.5 MacFarland bulanıklığına ulaşana dek 37°C'de 2-8 saat inkube edilmiştir (1x 10^8CFU/ml). Bakteri suspansiyonları 1:10 oranında sulandırılmıştır. Böylece bakteri inokulumu 1x10^7CFU/ml konsantrasyonuna ayarlanmıştır.

2.2.2.2.2. Broth Mikrodilusyon

Mikropleytteki tüm kuyucuklara 100µl Katyonu Ayarlanmış Mueller Hinton Broth konulmuş daha sonra ilk kuyucuklara 256 µg/ml antibiyotik solusyonundan 100µl eklenmiştir ve ilk kuyucuktaki antibiyotik konsantrasyonu 128 µg/ml olarak ayarlanmıştır. Bu konsantrasyondan 100µl alıp 128 µg/ml konsantrasyonuna aktarılarak dilusyon yapılmıştır. Bu işlem 0,0625 µg/ml konsantrasyondaki kuyucuğa kadar tekrarlanmış ve en son 100 µl atılmıştır. Mikropleytlerdeki antibiyotik ajanların final konsantrasyonları 0,0625-128µg/ml arasında olmuştur. Tüm kuyucuklara 1x10^7CFU/ml konsantrasyonundaki bakteri inokulumundan 5 µl eklenmiştir. Böylece bakteri inokulumu final konsantrasyonu 5x10^5CFU/ml'ye ayarlanmıştır.

Pleytler 35 °C'de 18-24 saat inkube edilmiştir. Üremenin gözlenmediği en düşük antibiyotik konsantrayonu MİK değeri olarak kaydedilmiştir (NCCLS 2005).

2.2.3. *mecA* Geninin Belirlenmesi

Tüm izolatların mecA geni varlığı spesifik primerler kullanılarak PCR ile incelenmesi sonucunda belirlenmiştir. PCR için öncelikle izolatlardan kromozomal DNA ekstraksiyonu yapıldı.

DNA Ekstraksiyonu

Suşlardan total DNA ekstraksiyonu ticari bir genomik DNA ekstraksiyon kiti (Fermentas®) kullanılarak üretici firmanın önerdiği şekilde aşağıdaki gibi gerçekleştirildi:

*Bir öze dolusu stafilokok kültürü 400 µl lizis solusyonu ile süspanse edildi. 65°C'de 5 dk inkübe edildi.

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

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

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

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

2.2.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Genotipik olarak tüm *Koagulaz Negatif Stafilokok* suşlarında *mecA* geninin varlığı incelendi. Tüm PCR reaksiyonlarında bir örnek için PCR amplifikasyonu 50 µl toplam hacimde, son konsantrasyon 10X Taq enzimi tampon çözeltisi 1X, magnesium klorür ($MgCl_2$) 4 mM, dNTP 0,2 mM, primer (her biri için) 0,4 pmol, Taq DNA polymerase 1,5 U, Template DNA (her bir örnek için) 300 nM olacak şekilde gerçekleştirildi. Kullanılan malzemeler ve volümleri Çizelge 2. 2.'de belirtilmiştir.

Çizelge 2.2. Mastermiksin hazırlanma oranları

Malzeme (Ticari)	İstenen Son Konsantrasyon	1 örnek (µl)
Tag Buffer (10X)	**1 X**	**5**
$MgCl_2$ (25mM)	**2.5 mM**	**5**
dNTP (10mM)	**0,2 mM**	**1**
Primer - 1 (100 pmol)	**10 pmol**	**2**
Primer - 2 (100 pmol)	**10 pmol**	**2**
Taq Polimeraz (5U)	**1.5 U**	**0.5**
ddH_2O	**Son Volüme Tamamlanır**	**29.5**
Template DNA	**300 nM**	**5**
TOPLAM		**50**

Mastermiks hazırlandıktan sonra 0,2 mL'lik tüpler, örnek adedi kadar numaralandırılıp, içlerine 45'er µl hazırlanılan mastermiksden ilave edildi. Daha sonra, ekstraksiyonu yapılan DNA'dan 5'şer µl alınıp, ilgili tüplerin içlerine eklenerek ve ağızları sıkıca kapatıldı. Hazırlanan tüpler daha sonra termal döngüleme cihazlarına yüklenip, programlandı. *mecA* gen analizlerinde kullanılan PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı sırası ile Çizelge 2. 3'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Başlangıç Denatürasyon	**1**	**94°C**	**5 dk**
Denatürasyon	**30**	**94°C**	**60 sn**
Bağlanma		**52°C**	**30 sn**
Uzama		**72°C**	**30 sn**
Son Uzama	**1**	**72°C**	**5 dk**
Bekletme	**1**	**4°C**	**∞ dk**

2.2.3.2. Amplikonların Elektroforez Tankına Yüklenmesi

6x loading dye boyasından pipetin ucuna 3 µl kadar alınıp, daha sonra elde edilen 10 µl PCR ürünleriyle karıştırıldı. Oluşturulan karışımdan 10 µl alınarak, jeldeki uygun pozisyondaki kuyucuğa yüklendi.

2.2.3.3. Amplikonların Elektroforez Tankında Yürütülmesi

Hazırlanmış olan jele, istenilen örnekler ve markerların yüklemesi yapıldıktan sonra, elektroforez tankının kapağı kapatılıp, elektrotlar uygun pozisyonlara bağlanarak, 100 voltluk akımda 40 dk yürütüldü.

2.2.3.4. Görüntüleme ve Değerlendirme

Elektroforez işleminin ardından elde edilen jel, dikkatli bir şekilde elektroforez tankından çıkarıldı. Süre sonunda yürütülen jel, bilgisayara bağlı durumdaki transilluminatör cihazındaki odacığa yerleştirildi. UV ışığı altında fotoğraflandıktan sonra, bant uzunlukları her PCR için ayrı değerlendirildi.

Değerlendirme aşamasında PCR analizinde; *mecA1* ve *mecA2* primerleri için 479 bp aralığında bant oluşumları arandı (Virdis ve ark 2010).

3. BULGULAR

Bu çalışmada 2012 yılı yaz aylarında Aydın ili ve çevresinde bulunan laktasyon döneminde olan 100 adet subklinik mastitisli keçinin her birinden süt örneği alınmıştır. Toplam 100 adet örnekleme yapılarak Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda *Koagulaz Negatif Staphylococcus* yönünden incelenmiştir. İzole edilen etkenlerin fenotipik olarak tür düzeyinde identifikasyonları, broth mikrodilusyon yöntemi ile antibiyotik dirençlilikleri ve PCR ile *mecA* geni tespiti yapılmıştır.

3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

İncelenen toplam 100 adet süt örneğinin 67'sinde (% 67) *Koagulaz Negatif Stafilokok*izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen 67 suştan 19 (% 28) adedi *S. lentus*, 17 (% 26) adedi *S. warneri*, 12 (% 18) adedi *S. haemolyticus*, 8 (% 12) adedi *S. xylosus*, 4 (% 6) adedi *S. schliferi*, 3 (% 4) adedi *S. cohnii*, 2 (% 3) adedi *S. caprae* ve 2 (% 3) adedi *S. hyicus*, olarak belirlenmiştir.İzole edilen *Koagulaz Negatif Stafilokok* türleri ve oranları Çizelge 3.1.'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1. İzole edilen *Koagulaz Negatif Stafilokok* türleri ve oranları

İzole edilen *Koagulaz Negatif Stafilokok* Türleri	İzolasyon Sayısı	Yüzde Oranı (%)
S. lentus	19	28
S. warneri	17	26
S. haemolyticus	12	18
S. xylosus	8	12
S. schliferi	4	6
S. cohnii	3	4
S. caprae	2	3
S. hyicus	2	3
TOPLAM	67	100

3.2. Antibiyogram Sonuçları

İzole edilen 67 adet *Koagulaz Negatif Stafilokok* suşuna ampisilin, oksitetrasiklin, sefaperazon, kloksasilin, danofloksasin ve enrofloksasin antibiyotiklerinden broth mikrodilusyon yöntemi ile antibiyogram testi yapılmıştır.

67 suştan 52 (% 78) adedi ampisiline, 17 (% 25) adedi oksitetrasikline, 7 (% 10) adedi sefaperazona, 55 (% 82) adedi kloksasiline, 10 (% 15) adedi danofloksasine ve 10 (% 15) adedi de enrofloksasine dirençli olarak tespit edilmiştir. Ayrıca 1 (% 1.5) adet suş oksitetrasikline, 11 (% 16) adet suş enrofloksasine ve 8 (% 12) adet suş da danofloksasine orta derecede duyarlı olarak bulunmuştur. Antibiyogram sonuçlarının *Koagulaz Negatif Stafilokok* suşlarına göre dağılımı Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Antibiyogram sonuçlarının *Koagulaz Negatif Stafilokok* suşlarına göre dağılımı

Koagulaz Negatif Stafilokok suşları	**n**	**OB**	**AMP**	**DNF**		**ENR**		**OT**		**CFP**
		R	**R**	**R**	**I**	**R**	**I**	**R**	**I**	**R**
S. warneri	17	13	14	4	2	2	1	8	-	3
S. haemolyticus	12	11	9	-	1	1	3	-	1	-
S. xylosus	8	5	5	-	1	1	2	1	-	-
S. hyicus	2	1	2	-	-	-	1	1	-	-
S. lentus	19	17	17	4	3	5		6	-	4
S. cohnii	3	3	2	2	1	1	2	1	-	-
S. schliferi	4	4	2	-		-	1	-	-	-
S. caprae	2	1	1	-		-	1	-	-	-

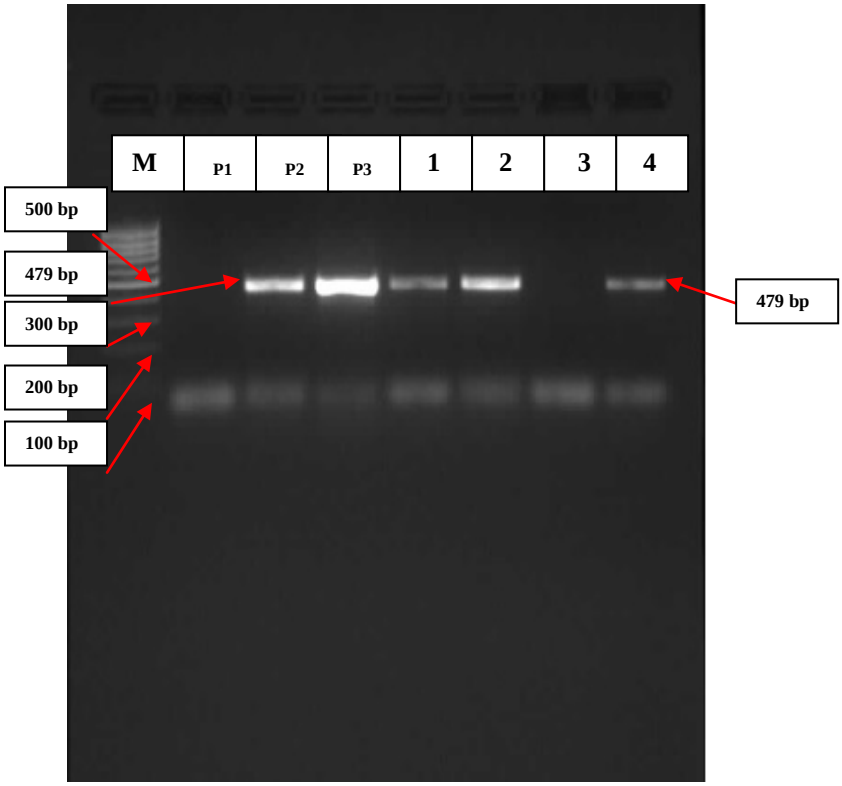
n: suş sayısı; OB: kloksasilin; AMP: ampisilin; DNF: danofloksasin; ENR: enrofloksasin; OT: oksitetrasiklin, CFP: sefaperazon; R: dirençli suş; I: orta derecede duyarlı suş

3.3. PCR Bulguları

Bu tez çalışması ile sütçü keçilerde mastitis infeksiyonlarına sebep olan *Koagulaz Negatif Stafilokoklar*ın tanısı *mecA1* ve *mecA2* primerleri kullanılarak yapılmıştır. Araştırmamızda izole edilen 67 *Koagulaz Negatif Stafilokoklar* ile yapılan PCR çalışması sonucunda *mecA* pozitif olarak identifiye edilen örnek sayısı toplamda 3 (% 4.5) adettir. 2 (% 3) adet *S. warneri* ve 1 (% 1.5) adet *S. xylosus* suşunda *mecA* geni identifikasyonu yapılmıştır (Çizelge 3.3.).

Çizelge 3.3. PCR pozitif örnek sayıları ve yüzdeleri

***Koagulaz Negatif Stafilokok* Suşu**	**PCR Pozitif Sayısı (adet)**	**PCR Pozitif Yüzdesi (%)**
S. lentus	0	0
S. warneri	2	3
S. haemolyticus	0	0
S. xylosus	1	1.5
S. schliferi	0	0
S. cohnii	0	0
S. caprae	0	0
S. hyicus	0	0
Toplam	3	4.5



Şekil 3.1. Keçi kökenli *Koagulaz Negatif Stafilokok* izolatlarında *mecA* direnç geni varlığı - M: 100 bp işaretleyici; P1: *S. aureus* ATCC 25923 pozitif kontrol; P2: *S. aureus* ATCC 43300 pozitif kontrol; P3: *S. aureus* ATCC 33591 pozitif kontrol; 1: Pozitif örnek (*S. warneri*); 2: Pozitif örnek(*S. warneri*); 3: Negatif örnek; 4: Pozitif örnek (*S. xylosus*)

4. TARTIŞMA

Koagulaz Negatif Stafilokoklar'ın eskiden derinin normal florasında bulunan zararsız etkenler olduğu düşünülmekteydi ancak özellikle subklinik mastitislere yol açması ile günümüzde mastitis olgularında önemli fırsatçı patojenler olarak değerlendirilmektedir.

Subklinik mastitisli sütlerde *Koagulaz Negatif Stafilokoklar*süt örneklerinden izole edilen patojenlerin % 44,7-% 95,9'unu oluşturmaktadır (Virdis ve ark 2010). Bu çalışmada da *Koagulaz Negatif Stafilokoklar*, % 67 gibi yüksek bir oranda izole edilmiştir.

Çiftliklerde meme içi antibiyotik uygulamaları subklinik mastitis tedavisinde etkili olduğunu kanıtlamak için artmıştır (Poutrel ve ark 1997). Ancak süt çiftliklerinde geniş antibiyotik kullanımı antibiyotik dirençli bakterilerin meydana gelmesine ve seleksiyonuna yol açabilmektedir (Walther ve ark 2006).

Çiğ sütlerden izole edilen mastitis patojenlerinin antibiyotik dirençlerini konu alan birçok çalışma vardır. Özellikle Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* ve *Koagulaz Negatif Stafilokoklar* olmak üzere çiğ sütlerde multiple dirençliliğin belirlenmesi süt ürünleri zinciri boyunca potasiyel yayılımları nedeniyle büyük problem olarak kabul edilmektedir. Küçük ruminantlarda MRSA suşlarının yayılımı tartışmalıdır. MRSA suşları tüm β-lactam antibiyotik sınıflarına dirence yol açan düşük affiniteli penisilin bağlayan protein 2a'yı (PBP2a) kodlayan mecA geninin varlığı ile belirlenmektedir. Birkaç çalışma subklinik mastitisli keçi sütlerinden izole edilen *S. aureus* suşlarının *mecA* geni taşımadığını rapor etmiştir (De Santis ve ark 2005) veya büyük ihtimalle insan orjinli çok az suşun methicilline dirençliliği belirlenmiştir (Vautor ve ark 2007).

Antibiyotik duyarlılık çalışmaları ağırlıklı olarak Bauer ve arkadaşlarının (1966) disk difuzyon metodu ile yapılmıştır. Broth mikrodilusyon ve agar dilusyon metodları minimum inhibitor konsantrasyonunu belirlemek için tercih edilmektedir.

Bu çalışmada *Koagulaz Negatif Stafilokoklar*da broh mikrodilusyon yöntemiyle methicillin (cloxacillin) dirençliliği belirlenmiş ve *mecA* geni varlığıyla uyumu araştırılmıştır.

Araştırmamızda*KoagulazNegatif Stafilokoklar* yüksek oranda (% 67) izole edilmiştir. Bu da diğer çalışmalarda olduğu ve kabul edildiği üzere subklinik mastitis olgularında *KoagulazNegatif Stafilokokları*n önemini doğrulamaktadır (Sancak ve ark 2003, Virdis ve ark 2010). Ayrıca Cervincova ve arkadaşlarının (2013) 669 subklinik mastitisli sütlerden 358'ini *KoagulazNegatif Stafilokok* olarak teşhis etmesi her geçen sene KONS olgularının yükseldiğini göstermektedir.

Awale ve arkadaşları (2012) KONS'ları subklinik mastitis olgularında en yaygın etken olarak belirtmiştir. Taponen ve Pyorala (2009) yaptığı çalışmada yine subklinik mastitise neden olan ajanlardan KONS'ların önemine dikkat çekmiştir.

Metisiline duyarlılık testleri birçok çalışmada farklı yöntemlerle çalışılmış ve mecA genini saptama ile karşılaştırılmıştır. Ancak fenotipik olarak dirençli bulunan suşlarda *mecA* geni tespit edilmediğinde yapılan testin sensivite ve spesifitesini değerlendirmenin dışında borderline dirençliliğin de değerlendirilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada metisilin dirençliliği çok yüksek oranda (% 82) çıkmıştır. Bu sonuç yapılan birçok çalışmada bulunan sonuçlarla uyuşmamaktadır (Virdis ve ark 2010, Oliveira ve ark 2012). Ancak Saini ve arkadaşlarının (2011) yaptığı çalışmada Stafilokoklarda % 40 oranında diğer çalışmalara göre daha yüksek direnç saptamıştır.

Febler ve arkadaşları (2010) 121 koagulaz negatif stafilokok suşundan 25'ini oxacillin broth mikrodilusyon yönteminde dirençli olarak bulmuştur. Ancak disk difuzyon yönteminde 16'sı dirençli bulunmuştur. 16 dirençli suştan 15'inde *mecA* geni saptanırken dilusyon yönteminde dirençli bulunan diğer 9 suşta *mecA* geni bulunmamıştır. Bu da mecA kaynaklı dirençliliğin tespiti disk difuzyon yönteminde broth mikrodilusyon yöntemine

göre daha duyarlı olduğunu göstermektedir. Ancak borderline dirençlilik değerlendirilmemiştir.

Metisilin dirençli Stafilokokların saptanmasına dayanan çalışmalarda genel olarak düşük düzeyde dirençlilik saptanırken bu çalışma dahil çok azında oranlar yüksek çıkmıştır (Jaglic ve ark 2009, Saini ve ark 2012, Wang ve ark 2013). *mecA* geni ile uyumluluk oranları ise duyarlılık testinin yöntemine göre değiştiği söylenebilir. Araştırmamızda 55 metisilin dirençli stafilokok suşundan sadece 2'sinde mecA tespit edilmiştir. Duyarlı olarak saptanan suşların 1'inde ise mecA tespit edilmiştir. Bu ya aşırı β-laktamaz üretiminden ya da PBP2a ile ilgisi olmayan başkalaşmış penisilin bağlayan proteinin varlığından doğan dirençlilik tipi olabilir. Kalan *mecA* negatif ancak dirençli olarak saptanan 53 izolat ise borderline dirençlilik açısından değerlendirilmelidir.

B-laktam grubu antibiyotik olan Ampicilin'e direnç bu çalışmada yaklaşık olarak % 77,6 bulunmuştur. Benzer olarak Wang ve arkadaşları (2013) Ampicillin'e yüksek direnç belirlemişlerdir.

Lüthje ve Schwars (2006) Ampicillin'e direnci % 18,1 bularak diğer antibiyotikler arasında en çok dirençli olarak tespit etmiş, Oxacillin'e direnci ise sadece 2 suşta (% 0,7) tespit etmiştir.

Cervincova ve arkadaşları (2013) Ampicillin'e % 27,7 direnç saptarken Cloxacillin'e karşı hiç direnç tespit etmemiştir.

Oliveira ve arkadaşları (2012) Tetracyclin'e % 19.2 olarak saptanan dirençlilik, bu çalışmadaki oxytetcyclin'e karşı belirlenen % 25.3 direnç oranla korelasyon göstermektedir. Ancak Oliveira ve arkadaşlarının oxacillin'e direnç hiç belirlememesi, enrofloxacin'e %5.1 ve Ampicillin'e ise % 10.3 olarak belirlediği direnç bizim sonuçlarımızla uyuşmamaktadır.

Bizim sonuçlarımızın aksine Virdis ve arkadaşları (2010) KONS'larda Ampicillin'e % 36, Cloxacillin'e % 2.7 ve Oxytetracyclin'e % 5.3 direnç belirlemiş, Cefoperazon'a direnç hiçbir suşta tespit edilmemiştir.

Lee'nin (2003) yaptığı çalışmada keçi sütlerinde 265 *S. aureus* suşundan 17'sinde oxacillin dirençlilik tespit etmiş ve bunlardan 5 tanesi *mecA* negatif olarak saptanmıştır.

Moon ve arkadaşları (2007) KONS'larda oxacillin direncini % 2,4 (19 suş) bulmuş ve bunlardan 12 suşta macA geni tespit etmiştir. Ayrıca Meticillin dirençli suşların duyarlı suşlardan daha çok diğer antibiyotiklere direnç gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Ebrehami ve arkadaşları (2007) mastitisli sütlerde % 66 oranında KONS identifiye etmiş ve bu suşlarda Tetracyclin'e % 50, Ampicillin'e % 42.8 oranlarında direnç tespit etmiştir. KONS tespiti bizim sonuçlarımızla uyumlu olsada Oxytetracyclin dirençliliği bizim çalışmamızdakinden fazla bulunmuş ve ampicillin dirençliliği ise bizim sonucumuza göre az tespit edilerek ters bir korelasyon oluşturmuştur.

Türütoğlu ve arkadaşlarının (2006) Burdur yöresinde yaptığı çalışmada Cloxacillin'e % 22.1, Methicillin'e % 22.8, Ampcillin'e % 55.9, Oxytetracyclin'e ise % 31.6 direnç belirlenmiştir.

Güler ve arkadaşları (2005) Konya yöresinde yaptığı çalışmada oksitetrasikline % 27.9, ampisiline % 63.8 oranında dirençlilik tespit etmişlerdir.

Mastitisli inek ve koyun sütünden izole edilen KONS'ların methicillin, Ampicillin, Tetracyclin antibiyotiklerine direnç sırasıyla % 22.8, % 11.2-76, % 8.7-20 oranları arasında sonuçlar göstermektedir.

Kırkan ve arkadaşları (2005) Aydın yöresinde yaptıkları çalışmada Stafilokoklarda oxacillin dirençliliğini % 60 olarak belirlemişlerdir. Bu çalışmaya dayanarak methicillin dirençliliğinin bizim sonuçlarımızla uyması ile Aydın yöresinde dirençli suşların belirdiği sonucu çıkarilabilir. Ancak Kaynarca ve Türkyılmaz (2010) yaptığı çalışmada aynı yöredeki mastitis olgularında identifiye edilen KONS'larda methicillin'e dirençliliği % 10.4 olarak saptamıştır. Methicillin dirençli suşlarda çoklu antibiyotik direncinin daha fazla olduğunu belirlemişlerdir. Yine aynı yörede çalışmış olan Türkyılmaz ve arkadaşları *S. aureus* suşlarında sefoxitin direncini % 17.2 olduğunu bildirmişlerdir.

Pehlivanoğlu ve Yardımcı'nın (2012) Burdur yöresinde yaptığı çalışmanın sonuçları, bizim çalışmamızdaki sonuçlar ile korelasyon göstermektedir. Pehlivanoğlu ve Yardımcı, *Koagulaz Negatif Stafilokoklar'*ı disk difüzyon yöntemi ile % 88.9, agar dilusyon yöntemi ile % 100 oranında dirençli bulmuşlardır. Agar dilusyon yöntemi ile dirençli olan suşların 8'inde *mecA* geni tespit edilmişken, duyarlı olan 10 suşta *mecA* geni tespit edilememiştir.

Metisilin dirençli Stafilokoklar hayvanlarda bulunabilmekte ve insanlara transfer olabilmektedir. MRS taşıyan insanların % 8'inin evlerinde MRS taşıyan pet hayvan besledikleri tespit edilmiştir. Bu insanların etkeni tekrar alıp yeniden hasta olma riski taşıdığı bildirilmiştir (Ferreira ve ark 2011). Aynı zamanda insanlarda hastane enfeksiyonlarına neden olabilen sığır mastitis kökenli MRS izolatları üzerine çalışmalar mevcuttur (Febler ve ark 2010).

Genel olarak değerlendirildiğinde Türkiye'de Stafilokok suşlarında antibiyotiklere direnç diğer Avrupa ülkelerine göre daha fazla belirlenmiştir. Antibiyotik dirençliliği bölgeler arasında bile farklılıklar göstermektedir. Süt çiftliklerinin yoğunluğu ile direnç paralel olarak artabilir. Ayrıca antibiyotik kullanımındaki artışın dirençli suşların ortaya çıkmasına neden olduğu bilinen bir gerçektir.

Stafilokoklarda fenotipik olarak metisilin direncini belirleyen birçok yöntem vardır. Ancak genotipik olarak uyumun olmaması, heteroresistant suşların ve *mecA* taşıyan ve

taşımayan borderline direncin varlığı dirençliliğin kesin olarak belirlenmesini güçleştirmektedir.

Yapılan çalışmalarda mecA negatif suşların farklı yöntemlerle (30˚C ve 35˚C'de % 0, % 0.5 veya % 2 NaCl içeren ortamlarda oksasilin disk difuzyon yöntemi gibi) testi sonucunda bazılarının metisilin dirençlilikleri belirlenmiş ve borderline dirençli veya duyarlı olarak saptanmıştır (Petersson ve ark 1999).

Bu çalışmada 67 *Koagulaz Negatif Stafilokok* suşunun 55'i metisiline (kloksasilin) dirençli bulunmuş, bunlardan 2 tanesinde mecA geni tespit edilmiştir. Kalan 53 suşun mecA içermeyen borderline dirençli suşlar kategorisinde değerlendirilebilir. Duyarlı olarak bulunan 12 suştan 1 tanesinde *mecA* geni saptanmıştır. Bu da ya aşırı β-laktamaz üretiminden ya da PBP2a ile ilgisi olmayan başkalaşmış penisilin bağlayan proteinin varlığından doğan dirençlilik tipi olarak değerlendirilebilir.

5. SONUÇ

Aydın ili ve yöresinde bulunan subklinik mastitisli keçilerden alınan süt materyallerde *Koagulaz Negatif Stafilokok*izolasyonu, identifikasyonu, antibiyogramı ve direnç geni olan *mecA*'nın moleküler tiplendirmesi amacıyla yapılan bu tez çalışmasında aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır.

Bu çalışmada konvensiyonel metodlarla incelenen 100 adet süt örneğinden 67 adet (% 67) *Koagulaz Negatif Stafilokok* izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen 67 suştan 19 (% 28) adedi *S. lentus*, 17 (% 26) adedi *S. warneri*, 12 (% 18) adedi *S. haemolyticus*, 8 (% 12) adedi *S. xylosus*, 4 (% 6) adedi *S. schliferi*, 3 (% 4) adedi *S. cohnii*, 2 (% 3) adedi *S. caprae* ve 2 (% 3) adedi *S. hyicus*, olarak belirlenmiştir.

İzole edilen 67 adet *Koagulaz Negatif Stafilokok* suşuna ampisilin, oksitetrasiklin, sefaperazon, kloksasilin, danofloksasilin ve enrofloksasilin antibiyotiklerinden broth mikrodilusyon yöntemi ile antibiyogram testi yapılmıştır. 67 suştan 52 (% 78) adedi ampisiline, 17 (% 25) adedi oksitetrasikline, 7 (% 10) adedi sefaperazona, 55 (% 82) adedi kloksasiline, 10 (% 15) adedi danofloksasine ve 10 (% 15) adedi de enrofloksasine dirençli olarak tespit edilmiştir. Ayrıca 1 (% 1.5) adet suş oksitetrasikline, 11 (% 16) adet suş enrofloksasine ve 8 (% 12) adet suş da danofloksasine orta derecede duyarlı olarak bulunmuştur.

Araştırmamızda izole edilen 67 *Koagulaz Negatif Stafilokoklar* ile yapılan PCR çalışması sonucunda *mecA* pozitif olarak identifiye edilen örnek sayısı toplamda 3 (% 4.5) adettir. 2 (% 3) adet *S. warneri* ve 1 (% 1.5) adet *S. xylosus* suşunda *mecA* geni identifikasyonu yapılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre, subklinik mastitisli keçilerden *Koagulaz Negatif Stafilokokları*n sıklıkla izole edilebildiği ve antibiyotiklere karşı oldukça dirençli olduğu

belirtilmiştir. Ayrıca antibiyotik dirençliliğinin sadece moleküler olarak değil, kazanılmış dirençlilik sonucu meydana gelebileceği de ortaya konmuştur.

Araştırmamızın devamı olarak özellikle metisiline dirençli olarak bulunan Stafilokok suşlarının insan veya hayvan kaynaklı olup olmadığının belirlenmesi, çoklu antibiyotik direnci tespit edilen suşların ise veteriner sahada mastitislerde kullanılan diğer antibiyotiklere direncinin araştırılması ve tedavi için kullanılabilecek en uygun antibiyotik ajanların belirlenmesi tavsiye edilmektedir.

ÖZET

Subklinik Mastitisli Keçilerdeki *Koagulaz Negatif Stafilokokların* Saptanması ve Antibiyotik Dirençliliklerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada 2012 yılı yaz aylarında Aydın ili ve çevresinde bulunan laktasyon döneminde olan subklinik mastitisli 100 adet keçinin her birinden örneği alınarak Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda *Koagulaz Negatif Stafilokok* yönünden incelenmiştir. Çalışmamızda incelenen 100 örneğin toplam 67'sinde (% 67) *Koagulaz Negatif Stafilokok* izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda izole edilen 67 suştan 19 (% 28) adedi *S. lentus*, 17 (% 26) adedi *S. warneri*, 12 (% 18) adedi *S. haemolyticus*, 8 (% 12) adedi *S. xylosus*, 4 (% 6) adedi *S. schliferi*, 3 (% 4) adedi *S. cohnii*, 2 (% 3) adedi *S. caprae* ve 2 (% 3) adedi *S. hyicus*, olarak belirlenmiştir.

İzole edilen 67 suştan 52 (% 78) adedi ampisiline, 17 (% 25) adedi oksitetrasikline, 7 (% 10) adedi sefaperazona, 55 (% 82) adedi kloksasiline, 10 (% 15) adedi danofloksasine ve 10 (% 15) adedi de enrofloksasine dirençli olarak tespit edilmiştir. Ayrıca 1 (% 1.5) adet suş oksitetrasikline, 11 (% 16) adet suş enrofloksasine ve 8 (% 12) adet suş da danofloksasine orta derecede duyarlı olarak bulunmuştur.

Araştırmamızda izole edilen 67 *Koagulaz Negatif Stafilokoklar* ile yapılan PCR çalışması sonucunda *mecA* pozitif olarak identifiye edilen örnek sayısı toplamda 3 (% 4.5) adettir. 2 (% 3) adet *S. warneri* ve 1 (% 1.5) adet *S. xylosus* suşunda *mecA* geni identifikasyonu yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler:*Koagulaz negatif Stafilokok*, keçi, süt, PCR, mecA geni

SUMMARY

Detection of Coagulase Negative Staphylococii From Goats with Subclinical Mastitis and Determination of Their Antibiotic Resistancy

In this study, a total of 100 sampling was made from 100 goat with subclinical mastitis in lactation period from Aydin Province region in summer time of year 2012, then samples were brought to Adnan Menderes University Faculty of Veterinary Medicine Department of Microbiology. A total of 67 (67 %) *Coagulase Negative Staphylococci* isolates were obtained out of 100 samples.

In our study, 19 (28 %) of isolates were found as *S. lentus*, 17 (26 %) of isolates were found as *S. warneri*, 12 (18 %) of isolates were found as *S. haemolyticus*, 8 (12 %) of isolates were found as *S. xylosus*, 4 (6 %) of isolates were found as *S. schliferi*, 3 (4 %) of isolates were found as *S. cohnii*, 2 (3 %) of isolates were found as *S. caprae* and2 (3 %) of isolates were found as *S. hyicus* out of 67 isolates which were detected conventionally.

In our study, 52 (78 %) of isolates were found resistant to Ampicillin, 17 (25 %) of isolates were found resistant to Cefaperazone, 55 (82 %) of isolates were found resistant to cloxacillin, 10 (15 %) of isolates were found resistant to danofloxacillin, 10 (15 %) of isolates were found resistant to enrofloxacillin out of 37 isolates. In addition, 1 (1.5 %) of the isolates were found intermediate susceptible to oxytetracyclin, 11 (16 %) of the isolates were found intermediate susceptible to enrofloxacillin and 8 (12 %) of the isolates were found intermediate susceptible to danofloxacillin.

As the same samples were detected by polymerase chain reaction, out of 67 *Coagulase Negative Staphylococci* isolates, *mecA* gene was detected from 3 (4.5 %) of the isolates. *mecA* gene was detected from 2 (3 %) *S. warneri* isolates and from 1 (1.5 %) *S. xylosus* isolate.

Keywords: *Coagulase Negative Staphylococci*, goat, milk, PCR, mecA gene

KAYNAKLAR

Anonim 1 *Staphylococcus*. http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/944101100.pdf. Erişim Tarihi: 15. 06. 2009.

Akcam FS, Tinaz BG, Kaya O, Tigli A, Türe E, Hoşoğlu S. Evaluation of methicillin resistance by cefoxitin disk diffusion and PBP2a latex agglutination test in mecA-positive *Staphylococcus aureus*and comparison of mecA with femA, femB,femX positivities. Microbiol Res.In Press 2007.

Alen S, Koneman E, Janda W, Schreckenberger P, Winn W, Woods G, Procop G. The gram-positive cocci: Part I: Staphylococci and related organisms. In Color Atlasand Textbook of Diagnostic Microbiology, eds. 5th ed. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 539-576.

Archer GL.*Staphylococcus epidermidis* and other *coagulase negative staphylococci*. In : Mandel GL, Dougles RG, Benett JE (eds.). Principles and Practice of Infectious Diseases. 3rd ed., Melbourne, Churchill Livingstone, 1990; 1511-1517.

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

Arman D. Etkene göre antibiyotik seçimi. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu (ADTS) . Çalışma Grubu, Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu Toplantısı kitabında, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No. 33, İstanbul; 1998. s: 9.

Arya SC, Kapoor S, Agarwal N. Commentson use of a disk diffusion method with cefoxitin (30 microg) to detect methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.Eur JClin. Microbiol Infect Dis; 2004. 23(11): p. 867-8.

Auwera PV, Godard C, Denis C.In vitro activities of new antimicrobial againts multiresistant *Staphylococcus aureus* isolated from septisemic patietns during a Belgian national survey from 1983 to 1985. Antimicrob. Agents Chemother; 1990. 34: 226.

Awale MM, Dudhatra GB, Avinash K, Chauhan BN, Kamani DR, Modi CM, Patel HB, O'Kennedy R. Bovine mastitis: a threat to economy. Open Access Scientific Reports, 2012. 1, 295. doi:10.4172/scientificreports.295.

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

Aydın N, İzgür M, Diker KS, Yardımcı H, Esendal Ö, Paracıkoğlu J, Akan M.Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). ANKARA: İlke-Emek Yayınları; 2006. P. 5-13.

Aydınlı A, Durmaz G, Akgün Y. *Koagülaz Negatif Stafilokoklar*daSlaymFaktör Yapımının Kongo Kırmızılı Agar Yöntemi İle Araştırılması; 1997. Flora, 1: 41–4.

Baddour MM, Kheir MM, Fatani AJ. Comparison of mecA polymerase chain reaction with phenotypic methods fort the detection of methicillin resistant*Staphylococcus aureus.* Curr Microbiol; 2007. 55: 473-479.

Bannerman TL. Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase positive cocci that grow aerobically. In Manual of Clinical Microbiology, Murray PR, Baron EJ,orgensen JH, Pfaller MA, Yorken RH, eds. 8th ed. 2003. Washington, DC: ASMPress. p. 384-404.

Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol; 1966. 45: 493-496.

Berger-Bachi B, Rohrer S. Factor influencing methicillin resistance in staphylococci. Arch Microbiol;2002.178: 165-171.

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

Boussard P, Pıthsy A. Relation between slime produntion, antibiotic sensitivity and the phaetype of *coagulase negative staphylococci*. Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics; 1993. 18: 271-274.

Brakstad OG, Maeland JA, Chesneau O. Comparison of tests designed to identify *Staphylococcus aureus*thermostable nuclease. APMIS; 1995. 103(3):219-24.

Brook GF, Butel JS, Ornston LN, Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA.Medical Microbiology. Appleton&Lange Norwalk, Connecticut; 1991. p. 186-192.

Brown Derek F.J. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother; 2005. 56: 1000-1018.

Cauwelier B, Gordts B, Descheemaecker P, Van Landuyt H. Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin (30 microg) for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis; 2004. 23(5): p. 389-92.

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

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

Cervinkova D, Vlkova H, Borodacova I, Makovcova J, Babak V, Lorencova A, Vrtkova I, Marosevi D, Jaglic Z.Prevalence of mastitis pathogens in milk from clinically healthy cows. Veterinarni Medicina, 2013. 58:567-575.

Chambers HF.Methicillin resistance in staphylococci: Molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev; 1997. 10(4):781-91.

Christensen GD, Baldassari L, Simpson WA. 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; 1994. p: 45–78.

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

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

Couto L, Sanches IS, Saleao R, Lencastre H. Molecular Characterization of *Staphylococcus sciuri*Strains Isolated from Humans. JCM.l; 2000. 136-1143.

Craig WA. Pharmocokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. Clin Infect Dis; 1998. 26: p. 1.

Degener JE, Heck MEOC, Leeuwen WJ, Heemsherk C, Crelaard A, Joosten P, Caesar P.Nosocomial infection by *Staphylococcus haemolyticus* and typing methods for epidemiological study. Journal of Clinical Microbiology; 1994. 32: p. 2260-2265

Delialioğlu N, Gedikoğlu S. *Koagülaz Negatif Stafilokokla*rda Slaym Yapımı ve Klinik Uyum Arasındaki İlişki.Türk Mikrobiyol Cem Derg; 2001. 31: p. 136–42.

Derbentli Ş. Stafilokoklarda antibiyotik direnci: 2003-2004 Türkiye haritası. ANKEM Derg; 2005. 19 (EK 2): 54-60.

De Santis EPL, Mureddu A, Mazzette R, Scarano C, and Bes M, “Detection of enterotoxins and TSST-1 genes in *S.aureus* isolates from sheep subclinical mastitis,” in Proceedingsof the 4th IDF International Mastitis Conference, 2005. pp. 410–504, Maastricht, The Netherlands.

Dündar V. Metisiline dirençli stafilokok infeksiyonları. Klimik Dergisi; 2000. s. 13: 26-27.

Dündar V, Dündar DE. Stafilokoklar. İnfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi. Cilt 2. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Nobel Tıp Kitapevleri. İstanbul; 2002. s. 1507-1516.

Feßler AT, Billerbeck C, Kadlec K ve Schwarz S. Identification and characterization of methicillin resistent *Coagulase Negative Staphylococci* from bovine mastitis. J Antimicrob Chemother, 2010. 65: 1576-1582.

Franciolli M, Bille J, Glauser MP. Betalactam resistance mechanisms of methicilin resistance *Staphylococcus aureus*. J. Infect. Dis; 1991. 163: p. 514-523.

Frey Y, Rodriguez JP, Thomann A, Schwendener S, ve Perreten V, Genetic characterization of antimicrobial resistance *Coagulase Negative Staphylococci* from bovine mastitis. Journal of Dairy Science, 2013. Vol 96, p. 2247-2257.

Frigatto EA, Machado AM, Pignatari AC, Gales AC. Is the cefoxitin disk test reliable enough to detect oxacillin resistance in *coagulase-negative staphylococci.* J Clin Microbiol; 2005. 43(4): p. 2028-9.

Gray ED, Peers G, Verstegen M, Regelmann WE. Effect of extracellular slime substance from *Staphylococcusepidermidis* on the human cellular immune response. The Lancet; 1984. 18: p. 365-367.

Grisold AJ, Leitner E, Mühlbauer G, Marth , Kessler HH. Detection of methicillin-resistant*Staphylococcus aureus* and simultaneous confirmation by automated nucleic acid extraction and real-time PCR. J Clin Microbiol; 2002. 40(7): p. 2392-7.

Gülay Z. Antimikrobiyal ilaçlara direnç. In: Mutlu G, Ümir T, Cengiz T, Tümbay E, (editörler). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara. Güneş Kitabevi; 1999. p. 91-108.

Güler L, Ok Ü, Gündüz K, Gülcü Y, Hadimli HH. Antimicrobial susceptibility and coagulase gene typing of *Staphylococcusaureus* isolated from bovine clinical mastitis cases in Turkey. J Dairy Sci 2005; 83: 3149-54.

Hackbarth CJ, Chamber HF. Methicillin resistant staphylococci: Detections methods and treatment of infections, Antimicrob Agents Chemother; 1989. p. 33: 995.

Hanssen AM, Ericson Sollid JU. *SCCmec in staphylococci: genes on the move.* FEMS Immunol Med Microbiol; 2006. 46(1): p. 8-20.

Hakenbeck R, Coyette J. *Resistant Penicilin-binding proteins.* CMLS*;* 1998. p.54, 332-340.

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

Huber H, Ziegler D, Pflüger V, Vogel G, Zweifel C, Stephan R. Prevalence and characteristics of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from livestock, chiken carcasses, bulk tank milk, minced meat and contact persons. *BMC Veterinary Research*; 2011; 7:6.

Japoni A, Alborzi A, Orafa F, Rasouli M, Farshad S. Distribution Paterns of Methicillin Resistance Genes mecA in *Staphylococcus aureus*Isolated From Clinical Specimens; 2004. p. 173-178.

Johnson GM, Lee PA, Regelmann WE, Gray ED, Peters G, Quie PG. Interference with granulocyte function by *Staphylococcus epidermidis* slime. Infection and Immunity; 1986. p. 54: 13-20.

Jorgensen JH. Laboratory issues in the detection and reporting of antibacterial resistance. Infect Dis Clin North Am; 1997. 11: p. 785-802.

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

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

Keskin O, Altay G, Akan M. Farklı Hayvansal Kaynaklardan İzole Edilen *Koagulaz Negatif Stafilokoklar*da Slime Üretimi ve Adherans. Turk J Vet Anim Sci; 2003. 27: p. 253–7.

Kırkan Ş, Göksoy EÖ, Kaya O: Identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *coagulase negative staphylococci* from bovine mastitis in the Ayddn region of Turkey. Turk J Vet Anim Sci, 2005. 29, 791-796.

Kloos WE, Smith PB. Staphylococci. In: Lenette, E.H, Balows, A., Hausler, W.J., Shadomy, H.J. (eds): Manuel of Clinical Microbiology. 4th ed., Washington D.C., ASM Press; 1994. p. 143-153.

Knapp CC, Washington JA. Evaluation of trehalose-mannitol broth for differentiation of *Staphylococcus epidermidis* from other coagulase-negative staphylococcal species. J Clin Microbiol; 1989; 27: 2624-2625.

Kobayashi N, Alam MM, Urasawa S. Genomic Rearrangement of the mec Regulator Region Mediated by Insertion of IS431 in Methicillin-Resistant Staphylococci. American Society for Microbiology; 2001. p. 45-335-338.

Kolar M, Bardon V, Hnulik V, Sauer P, Babák V, Schlegelová J. Resistance to methicillin in *coagulase-negative Staphylococci* and its detection. Acta Vet. BRNO; 2010; 79: 261-267.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. *Color Atlas and Tesxtbook of Diagnostic Microbiology.* Lippincott. Phidelphia-New York; 1997. p. 555-564.

Kotilainen P, Maki J, Oksman P, Viljanen MK, Nikoskelaainen J, Huovinen P. Immunochemical analysis ofthe extracellular slime substance of *Staphylococcus epidermidis*. EuropianJournal of Clinical Microbiology, Infectious Diseases; 1990. 9: p. 262-270.

Kuwahara-Arai K, Kondo N, Hori S, Tateda-Suzuki E, Hiramatsu K. Suppression of Methicillin Resistance in a mecA -Containing Pre-Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*Strain is Caused by the mecl -Mediated Repression of PBP 2' Production. Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 1996. p. 2680-2685.

Kuyucu N. Antibiyotik dirençi. Enf Derg;1(Özel sayı 1):33-8 2007.

Levi K, Bailey C, Bennett A, Marsh P, Cardy DL, Towner KJ. Evaluation of an isothermal signal amplification method for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*from patient-screening swabs. J Clin Microbiol; 2003. 41(7): p. 3187-91.

Langlois BE, Harmon RJ, Akers K. Identification of *Staphylococcus* species of bovine origin with the DMS Staph-TRAC system. J. Clin Microbiol; 1984; 20: 277-230.

Lindsay JA, Aravena-Roman MA, Riley TV. Identification of *Staphylococcus epidermidis* ve *Staphylococcus hominis* from blood cultures by testing susceptibility to desferrioxamine. Eur J Clin Microbiol Infect Dis; 1993; 12:127-131.

Livermore DM. Antibiotic resistance in staphylococci. Int J Antimicrob Agents.;16 Suppl 1:S3-10. 2000

Lowy R, Franklin D. Antimicrobial Resistance:The Example of *Staphylococcus aureus* Jou. Microbiol*;* 2003. p. 111, 1265-1273.

Ludlam HA, Noble WC, Marples RR, Phillips I. The evaluation of atyping scheme for *coagulase negative staphylococci* suitable for epidemiological studies. Journal of Clinical Microbiology; 1989. 30: p. 161-165.

Lüthje P ve Schwarz S. Antimicrobial resistance of *Coagulase Negative Staphylococci* from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide-lincosamide resistance phenotypes and genotypes. J Antimicrob Chemotherapy, 2006. 57: 966-969.

Lyon BR, Skurray R. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and methods laboratory detection, Infect Control HOSP Epidemiol*;* 1987. 12: p. 14.

Macun HC, Pir Yağcı İ, Ünal N, Kalender H, Sakarya F, Yıldırım M. Kırıkkale'de belirlenen subklinik mastitisli ineklerde etken izolasyonu ve antibiyotik direnç durumu. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2011; 8: 83-9.

Mallorqu Fernandez G, Marrero A, Gomis RC. Staphylococcal Methicillin Resistance: fine focus on folds and functions. Institut de Biologia Molecular de Barcelona; 2004. p. 18-26.

Maple PA, Hamilton-Miller JM, Brumfitt W. World wide antibiotic resistance in methicilin resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet; 1989. 1: 537-540.

Marshall SA, Wilke WW, Pfaller MA, Jones RN. *Staphylococcus aureus* and *coagulase-negative staphylococci* from blood stream infections: frequency of occurrence, antimicrobial susceptibility, and molecular (mecA) characterization of oxacillin resistance in the SCOPE program.Diagn Microbiol Infect Dis; 1998. 30(3): p. 205-14.

Mason WJ, Blevins JS, Beenken K, Wibowo N, Ojha N, Smeltzer MS. Multiplex PCR protocol for the diagnosis of staphylococcal infection. J Clin Microbiol; 2001. 39(9): p. 3332-8.

McDonald CL, Maher WE, Fass RJ. Revised interpretation of oxacillin MICs for *Staphylococcus epidermidis* based on mecA detection. Antimicrob Agents Chemother; 1995. 39(4): p. 982-4.

McDougal LK, Thornsberry C. The role of beta-lactamase in Staphylococci resistanse to penisillinase-resistant penicillins and cephalosporins, *J Clin Microbiol;* 1986. 23: 832.

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

Muray PR, Rosenthal KS, Pfaller PA. *Medical Microbiology; 4th ed*. Philadelphia: Elsevier; 2005. 203-12;221-36.

NCCLS National Committee for Clinical Laboratory Standarts. Methods for dilution antimicrobial susceptibility testing for bacteria that grow aerobically. Approved standart M7-A4, Wayne Pa, National Committee for Clinical Laboratory Standarts; 1997.

NCCLS/CLSI National Committee for Clinical Laboratory Standarts (M100- S15). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Vol. 15th Informational Supplement. 2005, Pennsylvania Wayne.

Oliveira L, Langoni H, Hulland C, Ruegg PL. Minimum inhibitory concentrations of *Staphylococcus aureus* recovered from clinical and subclinical cases of bovine mastitis. Journal of Dairy Science, 2012. 95, 1913–1920.

Pehlivanoğlu F, Yardımcı H. Detection of Methicillin and Vancomycin resistance in Staphylococcus strains isolated from bovine milk samples with mastitis. Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg; 2012. 18 (5): 849-855.

Petersson AC, Kamme C, Miörner K. Discriminates between Methicillin-Resistant an Borderline Methicillin Susceptible *Staphylococcus aureus* strains in Disk Diffusion Assays Using a Low Salt Consantration. J. Clin. Microbiol, 1999. Vol. 37, no. 6, 2047-2059.

Patrick CCP. Coagulase negative staphylococci: pathogens with increasing clinical significance. The Journal of Pediatrics; 1990. 116: 497-507.

Pereira SF, Henriques AO, Pinho MG, de Lencastre H, Tomasz. A Role of PBP1 in cell division of *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol; 2007. 189(9):3525-31.

Poutrel B, De Cr´emoux R, Ducelliez M, and Verneau D. “Control of intramammary infections in goats: impact on somatic cell counts,” Journal of Animal Science, 1997 vol. 75, no. 2, pp. 566–570.

Rasheed JK, Tenover FC. Detection and characterization of antimicrobial resistance genes in bacteria. In Manual of Clinical Microbiology, ed. B.E. Murray PR,Jorgensen JH, Pfaller MA, Yorken RH. 8th ed. Washington, DC: ASM Press; 2003. p. 1196-1212.

Rhabadan PM , Garcia de Viedma D, Diaz M. Heterogeneous antimicrobial resistance patterns in polyclonal populations of *coagulase-negative staphylococci* isolated from catheters. J Clin Microbiol; 2000. 38(4): p. 1359-63.

Rhoden DL, Hancock GA, Miller JM. Numerical approach to reference identification of *Staphylococcus, Stomatococcus* ve *Micrococcus.* J Clin Microbiol; 1993; 31:490-493.

Ryffel C, Strassle A, Kayser FH, Berger-Bachi B. Mechanisms of heteroresistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 1994.38(4): p. 724-8.

Saini V, McClure JT, Scholl DT, deVries TJ, Barkema HW. Herd-level association between antimicrobial use and antimicrobial resistance in bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates on Canadian dairy farms. Journal of Dairy Science, 2012. 95, 1921–1929.

Stapleton PD, Taylor PW. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus. Sci Prog*; 2002. 85: 57-72.

Skov R, Smyth R, Larsen AR. Evaluation of cefoxitin 5 and 10 μg discs for the detection of methicillin resistance instaphylococci. J Antimicrob Chemothe;, 2005.55(2): p. 157-61.

Skov R, Smyth R, Clausen M. Evaluation of a cefoxitin 30 μg disc on Iso-Sensitest agar for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus.* JAntimicrob Chemother; 2003. 52(2): p. 204-7.

Skov R, Smyth R, Larsen AR. Evaluation of cefoxitin 5 and 10 μg discs for the detection of methicillin resistance in staphylococci. J Antimicrob Chemother; 2005.55(2): p. 157-61.

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

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

Tel OY, Keskin O. Subklinik Mastitisli İneklerden izole edilen stafilokok suşlarının bazı virulens faktörleri ve antibiyotik direnci. YYU Vet Fak Derg 2011; 22: 17-21.

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

Tünger A, Çavuşoğlu C, Korkmaz M. Asya Mikrobiyoloji. Asya Tıp Kitapevi, İzmir, Türkiye; 2005. s. 6.

Türkyılmaz S, Tekbıyık S, Oryasin E, Bozdoğan B.Molecular epidemiology and antimicrobial resistance mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. Zoonoses Public Health, 2010. 57, 197-203.

Türütoğlu H, Erçelik S, Öztürk D. Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* and *coagulase-negative staphylococci* isolated from bovine mastitis. Bull Vet Inst Pulawy 2006; 50: 41-5.

Ulusoy S, Çetin B, Arda M. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* kökenlerinin antibiyotik direnci.İnfeksiyon Dergisi; 1995. 9: 7-10.

Ünal N, İstanbulluoğlu E. İnsan ve sığır kökenli *Staphylococcus aureus* izolatlarının fenotipik ve genotipik özelliklerinin araştırılması. Ankara Univ Vet Fak Derg 2009; 56: 119-26.

Vautor E, Carsenti-Dellamonica H, Sabah M, Mancini G, P´epin M, and Dellamonica P, "Characterization of *Staphylococcusaureus* isolates recovered from dairy sheep farms (*agr* group, adherence, slime, resistance to antibiotics)," SmallRuminant Research, 2007. vol. 72, no. 2-3, pp. 197–199.

Virdis S, Scarano C, Cossu F, Spanu V, Spanu C, Pietro Luigi de Santis E. Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus* and *Coagulase Negative Staphylococci* Isolated from Goats with Subclinical Mastitis. Dipartimento di Biologia Animale, Universita di Sassari, Vet Med Int. 2010. 517060.

Wang SC, Wu CM, Shen JZ, Wu YN, Wang Y. Hypermutable *Staphylococcus aureus* strains present at high frequency in subclinical bovine mastitis isolates are associated with the development of antibiotic resistance. Veterinary Microbiology, 2013. 165, 410–415.

Waldvogel FA. *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; 2000. p: 2069–92.

Walther B, Friedrich AW, Brunnberg L, Wieler LH, and L¨ubke-Becker A, "Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in veterinary medicine: a "new emerging pathogen?"Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift, 2006. vol. 119, no. 5-6, pp. 222–232.

Weller TMA. The Distribution of mecA, mecRI, and mecl and Sequence anaysis of mecl and the mec Promoter Region in Staphylococci Expressing Resistance to Methicillin. Journal of Antimicrobial Chemotherapy; 1999. p. 43,15-22.

Willke A. Stafilokoklarda Metisiline Direnç Mekanizmaları ve Belirlenmesi. ANKEM Derg 6; 1998. (No.2); s. 288-291.

Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL. Gram-Positive Cocci. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Darcy P. Lippincott Williams Wilkins. Baltimore; 2006. 623-671.

Younger JJ, Christensen GD, Bartley DL, Simmons JCH, Barrett FF. *Coagulase negative staphylococci*isolated from cerebrospinal shunts: importance of slime production, speciesidentification and shunt removal to clinical outcome. The Journal of Infectious Diseases; 1987. 156: 548-554.

Zhang Y, Wang X, Lejeune JT, Zervos M, Bhargava K. Comparison of phenotypic methods in predicting methicillin resistance in coagulase-negative *Staphylococcus* (CoNS) from animals. Ressearch in Veterinary Science 90; 2010; 23-25.

Zscheck KK, Murray BE. Genes involved in the regulation of beta-lactamase production in enterococci and staphylococci. Antimicrob Agents Chemother, 1993. 37(9):1966-70.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında İzmir'de doğdum. Mehmet Seyfi Eraltay Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi'nden 2004 yılında mezun oldum. Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ne 2005 yılında başladım ve 2010 yılında mezun oldum. Eylül 2010 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım. Şu anda bir Veteriner Teşhis Laboratuvarında laboratuvar sorumlusu olarak görev yapmaktayım.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübesi ile bana destek olan danışman hocam Anabilim Dalı Bölüm Başkanı Prof. Dr. Osman KAYA'ya, bilgi, görgü ve bilimsel desteklerini aldığım Prof. Dr. Şükrü KIRKAN'a, Doç. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ'a, Doç. Dr. Serap SAVAŞAN'a, Yrd. Doç. Dr. Göksel ERBAŞ'a, ve laboratuar çalışmaları ile tez yazım aşamasında hep yanımda olan Araştırma Görevlisi Dr. Uğur PARIN'a, bugünlere gelmemde bana hep destek olan ve emeğini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkür ederim.