



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**MASTİTİSLİ SIĞIR SÜTLERİNDEN İZOLE
EDİLEN STAFİLOKOK TÜRLERİNDE
METİSİLİN VE VANKOMİSİN
DİRENÇLİLİĞİNİN FENOTİPİK VE GENOTİPİK
ANALİZİ**

Faruk PEHLİVANOĞLU

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Hakan YARDIMCI**

2011-ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MASTITİSLİ SIĞIR SÜTLERİNDEN İZOLE
EDİLEN STAFİLOKOK TÜRLERİNDE
METİSİLİN VE VANKOMİSİN
DİRENÇLİLİĞİNİN FENOTİPİK VE GENOTİPİK
ANALİZİ**

Faruk PEHLİVANOĞLU

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Hakan YARDIMCI**

2011-ANKARA

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	ix
Çizelgeler	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Tarihçe	2
1.1.1. <i>Staphylococcus</i> spp.	2
1.1.2. Metisilin	3
1.1.3. Vankomisin	3
1.2. Etiyoloji	5
1.2.1. Sınıflandırma	5
1.2.2. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri	5
1.2.3. Üreme Gereksinimleri ve Koloni Morfolojisi	5
1.2.4. Biyokimyasal Özellikleri	6
1.3. Virülens Faktörleri	7
1.3.1. Kapsül	7
1.3.2. Hücre duvarı	7
1.3.2.1. Peptidoglikan	7
1.3.2.2. Teikoik Asit	8
1.3.2.3. Yüzey Proteinleri	8
1.3.3. Enzimler	9
1.3.3.1. Katalaz	9
1.3.3.2. Koagülaz	9
1.3.3.3. Fibrinolizin	10
1.3.3.4. Hyaluronidaz	10
1.3.3.5. Lipaz	10
1.3.3.6. Deoksiribonükleaz	10
1.3.3.7. Beta-laktamaz (Penisilinaz)	10
1.3.4. Slaym Faktörü (Slime Factor)	11
1.3.5. Toksinler	11
1.3.5.1. Sitolitik toksinler	11
1.3.5.1.1. Hemolizinler	11
1.3.5.1.2. Lökotoksinler	12
1.3.5.2. Enterotoksinler	13
1.3.5.3. Eksfoliyatif toksin (Eksfoliyatin)	14
1.3.5.4. TSST (Toksik Şok Sendrom Toksin)	14
1.4. Beta-laktam Antibiyotikler	14
1.5. Metisilin Etki Mekanizması	16
1.6. Metisiline Direnç Mekanizmaları	16
1.7. Vankomisin Etki Mekanizması	21

1.8. Vankomisine Dirençlilik Mekanizması	21
1.9. Metisilin ve Vankomisin Duyarlılığının Belirlenmesi	24
1.9.1. Metisilin Duyarlılık Testleri	24
1.9.1.1. Agar Tarama Tekniği	24
1.9.1.2. Agar-Disk Difüzyon Tekniği	25
1.9.1.3. Sefoksitin Disk Difüzyon Tekniği	25
1.9.1.4. Agar Dilüsyon Tekniği	26
1.9.1.5. Broth Makrodilüsyon / Mikrodilüsyon Tekniği	27
1.9.1.6. Epsilometer Test (E-test)	27
1.9.1.7. Otomize Sistemler	28
1.9.1.8. Latex Aglutinasyon Testi	28
1.9.1.9. Kromojenik Teknikler	28
1.9.1.10. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	29
1.9.2. Vankomisin Duyarlılık Testleri	29
1.9.2.1. Fenotipik Testler	29
1.9.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	31
1.10. Stafilokokal Mastitis	31
1.10.1. Epidemiyoloji	31
1.10.2. Tedavi Güçlüğü	32
1.10.3. Metisilin Dirençliliği	33
1.10.4. Vankomisin Dirençliliği	35
 2. GEREÇ VE YÖNTEM	 36
2.1. Gereç	36
2.1.1. Örnekler	36
2.1.2. Referans Suşlar	36
2.1.3. Solüsyonlar	36
2.1.4. Besiyerleri	37
2.1.5. Antibiyotik Diskleri	37
2.1.6. Antibiyotikler	38
2.1.7. DNA Ekstraksiyonu, PCR ve Elektroforez İşlemlerinde Kullanılan Kit, Buffer ve Solüsyonlar	38
2.1.8. DNA Ekstraksiyonu, PCR, Elektroforez ve Görüntülemeye Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar	39
2.2. Yöntem	39
2.2.1. İzolasyon ve İdentifikasyon	39
2.2.2. Metisilin ve Vankomisin için Fenotipik Dirençliliğinin Tespiti	43
2.2.2.1. Agar-Disk Difüzyon Tekniği	43
2.2.2.2. Agar Dilüsyon Tekniği	44
2.2.3. Metisilin ve Vankomisin için Genotipik Dirençliliğinin Tespiti	46
2.2.3.1. DNA Ekstraksiyonu	46
2.2.3.2. PCR	46
2.2.3.3. Elektroforez ve Görüntüleme	47
 3. BULGULAR	 49
3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları	49
3.2. Metisilin için Fenotipik Dirençliliğinin Belirlenmesi Amacıyla Yapılan Testlerin Bulguları	50

3.2.1. Agar-Disk Difüzyon Tekniği	50
3.2.2. Agar Dilüsyon Tekniği	50
3.3. Vankomisin için Fenotipik Dirençliliğin Belirlenmesi Amacıyla Yapılan Testlerin Bulguları	53
3.3.1. Agar-Disk Difüzyon Tekniği	54
3.3.2. Agar Dilüsyon Tekniği	54
3.4. PCR Bulguları	56
4. TARTIŞMA	59
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	67
ÖZET	68
SUMMARY	70
KAYNAKLAR	71
ÖZGEÇMİŞ	84

ÖNSÖZ

Stafilokok nedenli mastitis hem klinik hem subklinik seyredilmekte ve ayrıca stafilokok türlerinin sahip olduğu bir takım virülens faktörleri ve çeşitli antibiyotiklere direnç geliştirebilmelerinden dolayı tedavisi güç mastitis vakaları şekillenmektedir. Bu durum, mevcut antibiyotik preparatları ile mastitisi tedavi etme olasılığını düşürmektedir. Ancak, stafilokok mastitislerinin sağaltımından erken sonuç alınması; meme dokusunda oluşabilecek kalıcı hasarın önlenmesi ve normal süt verimine kısa süre içinde dönülmesi açısından önemlidir.

İnsanlardan izole edilen stafilokoklarda metisilin dirençliliği üzerine yapılan çok sayıda çalışma mevcut iken evcil hayvanlardan izole edilen suşlarda metisilin dirençliliğinin araştırılması son yıllarda önem kazanmıştır. Sığırların mastitis vakalarından elde edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında metisilin dirençliliğinin agar-disk difüzyon tekniği dışında diğer fenotipik testlerle testpiti ve yine PCR ile metisilin dirençliliğinden sorumlu genin araştırılması Türkiye’de birkaç çalışmada yapılmış durumdadır. Bu tez çalışmasında, bölgesel olarak toplanan suşların metisilin dirençliliği fenotipik olarak iki test ile belirlendi ve *mecA* geni PCR ile araştırıldı. Böylece, bölgedeki sığırların mastitis vakalarından izole edilen suşlardaki söz konusu antibiyotiğe dirençlilik durumları belirlenmeye çalışıldı.

Beşeri hekimlikte metisilin dirençli stafilokok suşlarından kaynaklanan enfeksiyonların tedavisinde son seçenek olarak vankomisin etkinliğini sürdürmektedir. Bu çalışmada, insanlara geçip enfeksiyon oluşturma riski olan mastitis kökenli bu suşların, vankomisine fenotipik olarak dirençliliğinin araştırılmasının yanı sıra genotipik olarak da araştırılmış olması, doktora tez çalışması olarak Türkiye’de ilk olması açısından önemlidir.

Doktora tez çalışmam boyunca değerli desteklerini gördüğüm, danışman hocam Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Hakan YARDIMCI başta olmak üzere, tez izleme komitesinde bulunan hocalarım Prof. Dr. Serdar DİKER ve Prof. Dr. Tarık Haluk ÇELİK’e, moleküler çalışmamı gerçekleştirmemdeki değerli yardımlarından dolayı Doç. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU’na, doktora programı boyunca desteklerinden dolayı Prof. Dr. Müjgan İZGÜR, Prof. Dr. Nejat AYDIN, Prof. Dr. Ömer ESENDAL, Prof. Dr. Mehmet AKAN ve Prof. Dr. Hülya TÜRÜTOĞLU’na, referans suşları sağlamamda yardımcı olan Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Alper ÇİFTÇİ’ye, çalışmalarım boyunca yardımlarını gördüğüm Araştırma görevlileri Bülent BAŞ ve Orkun BABACAN’a, ve Agar Dilüsyon Teknik’inde kullanmak üzere vankomisin sağlamamda yardımcı olan Sandoz (Türkiye) firmasına teşekkürlerimi bir borç bilirim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADDT	Agar-Disk Difüzyon Tekniği
<i>aux</i>	Auxiliary
BHIA	Brain Heart Infusion Agar (Beyin Kalp İnfüzyon Agar)
BHIB	Brain Heart Infusion Broth (Beyin Kalp İnfüzyon Broth)
<i>blaZ</i>	Beta-laktamaz proteinini kodlayan gen
BORSA	Borderline oxacillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
bp	Base pair (Baz çifti)
CA-MRSA	Community-acquired methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (Toplumsal kaynaklı MRSA)
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CFU	Colony Forming Unit
CLSI	Clinical Laboratory and Standards Institute
cm	Santimetre
CMT	California Mastitis Test (Kalifornia Mastitis Testi)
dk	Dakika
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
E-test	Epsilometer Test
<i>fem</i>	Factor Essential for Methicillin Resistance
g	Gram
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HA-MRSA	Hospital-acquired methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (Hastane Kaynaklı MRSA)
hVISA	Heteroresistant vancomycin-intermediate <i>Staphylococcus aureus</i>
I	Indermediate Resistant (Orta Derecede Dirençli)
Kb	Kilobase (Kilobaz)
kDa	Kilodalton
KNS	Koagülaz Negatif Stafilokok
KOH	Potasyum Hidroksit
KPS	Koagülaz Pozitif Stafilokok
<i>mecA</i>	PBP2a proteinini kodlayan gen
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
MHA	Mueller Hinton II Agar
MHB	Mueller Hinton Broth
MİK	Minimal İnhibitör Konsatrasyonu
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimol
MRSA	Methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MR-VP Medium	Methyl-Red / Voges-Proskauer Medium
MSA	Mannitol Salt Agar
MSSA	Methicillin sensitive <i>Staphylococcus aureus</i>

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
NaCl	Sodyum Klorür
NAM/NAG	N-asetilmuramikasit / N-asetilglukozamin
NB	Nutrient Broth
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
O/F Medium	Oxidation / Fermentation Medium
ONPG	O-nitrophenyl-β-D-galactopyranosidase (Beta-Galaktosidase Test)
PAP	Population Analysis Profile (Popülasyon Analiz Profili)
PAP-AUC	Population Analysis Profile-Area Under the Curve (Eğri altındaki alan)
PBP	Penicilin Binding Protein (Penisilin Bağlayıcı Protein)
PCR	Polimerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PVL	Panton-Valentine Leukocidin
R	Resistant (Dirençli)
rpm	Revolutions per minute
S	Sensitive (Duyarlı)
SCC	Staphyococcal Cassette Chromosome
sn	Saniye
TBE buffer	Tris-borate-EDTA buffer
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
TSST	Toxic Shock Syndrome Toxin (Toksik Şok Sendrom Toksini)
vanA	Vankomisin dirençliliğinden sorumlu gen
VISA	Vancomycin intermediate <i>Staphylococcus aureus</i>
VP	Voges-Proskauer (Asetoin Testi)
VRE	Vancomycin resistant <i>Enterococci</i>
VRSA	Vancomycin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>

ŞEKİLLER

Şekil 3.1. Bazı suşların oksasilin (1 µg) ile yapılan agar-disk difüzyon testi sonuçları	50
Şekil 3.2. Bazı suşların oksasilin için yapılan agar dilüsyon testi sonuçları	52
Şekil 3.3. Bazı suşların vankomisin (30 µg) ile yapılan agar-disk difüzyon testi sonuçları	53
Şekil 3.4. Bazı suşların vankomisin ile yapılan agar dilüsyon testi sonuçları	55
Şekil.3.5. Bazı suşların <i>mecA</i> için yapılan PCR sonuçları	57
Şekil. 3.6.Çalışmadaki vankomisine orta derecede dirençli 10 suşun <i>vanA</i> için yapılan PCR sonuçları	57
Şekil 3.7. Bazı fenotipik olarak oksasiline dirençli <i>mecA</i> geni taşımayan suşların amoksisilin klavulanik asit (20/10 µg) ile yapılan agar-disk difüzyon testi sonuçları	58

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Oksasilin için agar-disk difüzyon tekniği kritik inhibisyon zon çapları	25
Çizelge 1.2. Sefoksitin ile agar-disk difüzyon tekniği kritik inhibisyon zon çapları	26
Çizelge 1.3. Oksasilin için kritik MİK değerleri	27
Çizelge 1.4. Vankomisin için kritik MİK değerleri	30
Çizelge 2.1. Değişik oksasilin ve vankomisin konsantrasyonları içeren besiyerleri elde etmek için antibiyotik stok solüsyonundan besiyerine katılan miktarlar	45
Çizelge 3.1. Toplanan süt örnekleri ve izole edilen Stafilocokların dağılımı	49
Çizelge 3.2. Stafilocok suşlarının oksasilin için ADDT ve agar dilüsyon tekniği sonuçları	51
Çizelge 3.3. KPS suşlarının oksasilin için ADDT ve agar dilüsyon tekniği sonuçları	51
Çizelge 3.4. Stafilocok suşlarının oksasilin için MİK değerlerinin dağılımı	53
Çizelge 3.5. Stafilocok suşlarının vankomisin için ADDT ve agar dilüsyon tekniği sonuçları	54
Çizelge 3.6. KPS suşlarının vankomisin için ADDT ve agar dilüsyon tekniği sonuçları	54
Çizelge 3.7. Stafilocok suşlarının vankomisin için MİK değerlerinin dağılımı	56
Çizelge 3.8. Vankomisine orta derecede dirençli suşların metisiline karşı direnç durumları	56
Çizelge 3.9. Oksasilin için agar-disk difüzyon tekniği & PCR sonuçlarının karşılaştırılması	58
Çizelge 3.10. Oksasilin için agar dilüsyon tekniği & PCR sonuçlarının karşılaştırılması	58

1. GİRİŞ

Meme dokusunun yangısı olarak tanımlanan mastitis, süt salgısında fiziksel ve kimyasal değişikliklerin ve meme dokusunda patolojik değişikliklerin şekillenmesiyle karakterizedir (Bradley, 2002; Pyörala, 2003). Sığırlarda mastitis kompleks bir hastalık olup, primer ve sekonder determinantlar göz önüne alındığında oluşumunda çok çeşitli nedenlerin rol oynadığı görülmektedir (Baştan, 2002). Mikroorganizmaların meme dokusunu enfekte etmesi sonu şekillenen enfeksiyöz mastitisin, konakçı cevabına ve mikroorganizmaya göre şekillenen değişik formları (klinik, subklinik, gangrenli, vb.) bulunmaktadır (Pyörala, 2003). Sığırların mastitis vakalarından çok çeşitli mikroorganizmalar izole edilmektedir, ancak Stafilokoklar, Streptokoklar ve Koliformlar ile birlikte en sık izole edilen bakteriyel etkenlerdir (Arda ve İstanbulluoğlu, 1979; Mc Donalds, 1979; Olde Riekerink ve ark., 2008; Fox, 2009).

Stafilokoklar, geleneksel olarak, tavşan ve insan plazmasını koagüle etme yeteneklerine göre koagülaz pozitif (KPS) ve koagülaz negatif stafilokoklar (KNS) olarak 2 grupta incelenmektedirler (Brown, 1999; Winn ve ark., 2006). KPS grubunda mastitis etkeni olarak *S. aureus*, *S. intermedius*, ve *S. hyicus* bulunurken (Roberson ve ark., 1996), 50'den fazla tür ve alt türü içeren KNS grubunda ise 10'dan fazla türün mastitis vakalarından izole edildiği bildirilmiştir (Hogan ve ark., 1987; Kırcan ve ark., 2005; Winn ve ark., 2006; Gillespie ve ark., 2009; Pyörala ve Taponen, 2009).

Sığır yetiştiriciliğinde, gerek stafilokok türleri ve diğer Gram pozitif bakterilerden kaynaklanan mastitis vakalarının ve gerekse diğer enfeksiyonların sağaltımında beta-laktam grubu antibiyotikler yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda bu antibiyotiklere dirençli hayvan kökenli stafilokok türlerinin prevalansında artışlar rapor edilmektedir (Myllys ve ark., 1998; Haveri, 2008). Stafilokoklarda beta-laktamaz enzimine dayanıklı penisilinlere karşı şekillenen direnç genel olarak metisilin direnci olarak adlandırılmakta ve bu bakterilerin hem tüm beta-laktam antibiyotiklere dirençli oldukları ve hem de diğer sınıf antibiyotiklere de yüksek oranda dirençli oldukları belirtilmektedir (Ünal, 1996; Vanderhaeghen ve ark., 2010). Beşeri hekimlikte, metisilin dirençli stafilokoklardan kaynaklanan enfeksiyonların

tedavisinde vankomisin gibi glikopeptidler tek alternatif olarak değerini korumaktadır, ancak değişik ülkelerde vankomisine duyarlılığı azalmış ve dirençli stafilocok suşları rapor edilmektedir. Sığır mastitis vakalarından ise fenotipik ve genotipik olarak metisiline dirençli stafilocok suşları izole edilmekte olup (Devriese ve ark., 1972; Kaszanyitzky ve ark., 2004; Sareyyüpoğlu ve ark., 2006; Turutoglu ve ark., 2006; Moon ve ark., 2007; Kumar ve ark., 2010) vankomisin için ise fenotipik olarak duyarlılığı azalmış suşlar belirlendiğine ilişkin çalışmalar mevcuttur (Shi ve ark., 2010; Turkyilmaz ve ark., 2010). Ancak, vankomisine dirençli olan ve vankomisin dirençliliğini belirleyen genetik yapıya sahip olan stafilocok suşunun, henüz sığır mastitis vakalarından izole edildiğine dair bildiri mevcut değildir.

1.1.Tarihçe

1.1.1.Staphylococcus spp.

Stafilokokların ilk kez ışık mikroskobunda gözlemlenmesi ve tanımlanması Robert Koch tarafından 1878’de, sıvı besiyerinde üretilmesi ise 1880’de Pasteur tarafından gerçekleştirilmiştir. Stafilocok ismi İskoçya’lı cerrah Alexander Ogston tarafından, üremeleri sırasında birbirinden ayrılmayıp üzüm salkımını andıran yığınlar oluşturmamasından dolayı 1881’de verilmiştir. Rosenbach, 1884’te beyaz renkli kolonileri *Staphylococcus albus*, sarı-portakal renkli kolonileri ise *S. aureus* olarak isimlendirmiştir. Yirminci yüzyılın başlarına dek yapılan çalışmalarla stafilocokların doğada yaygın olduğu ve özellikle insan ve hayvanların derisi üzerinde hastalık oluşturmaksızın bulunabildiği anlaşılmıştır. Daha sonra *S. albus*’un ismi *S. epidermidis* olarak değiştirilmiş ve bu aşamadan sonraki çalışmalar *S. aureus*’un diğer patojen olmayan stafilocoklardan ayrımı üzerine olmuştur. Koagülaz reaksiyonunun *S. aureus*’un ayrımında kullanılışının kabul edilmesi 1930’lu yılları bulmuştur. Mikrokoklardan ayrımı için stafilocokların glukozu anaerobik olarak kullanabilmesi ve asit üretebilmesi karakterinin kullanımı 1965’de kabul edilmiştir. Diğer türlerin belirlenmesi üzerine çalışmalar 1960’lı yılların ortalarında Baird-Parker ile başlamıştır. KNS türleri 1970’li yılların ortalarına kadar patojen olarak kabul edilmez ve göz ardı edilirken, vakalardan sıklıkla bu türlerin izole edilmeleri bu yöndeki araştırmalara yön vermiştir. Stafilocok cinsi içinde 1994 yılı itibariyle 31

tür belirlenmiş iken bugün 50'nin üzerinde tür ve alt tür tanımlanmış durumdadır (Kloos ve Bannerman, 1994; Brown, 1999; Winn ve ark., 2006).

1.1.2. Metisilin

Fransız tıp öğrencisi Ernest Duchesne 1896'da *S. aureus* kolonilerinin *Penicillium notatum* tarafından yıkımlandığını göstermiş olsa da, Alexander Fleming 1928'de bunu tekrar gözlemlemiştir (Waness, 2010). Daha sonra Oxford Üniversitesi'nde *P. notatum*'dan penisilin ekstrakte edilmiş ve 1941'de insanlarda stafilocok enfeksiyonlarının tedavisinde kullanıma girmiştir. Ancak 1947'de belirgin şekilde penisilin dirençli *S. aureus* suşları izole edilmeye başlamıştır. Ardından 1959'da, *S. aureus*'un ürettiği beta-laktamaz enzimine dirençli semisentetik penisilin türevi olan metisilin üretilmiş ve yeniden insanoğlu stafilocok etkenleri ile mücadelede bir kez daha öne geçse de sadece 2 yıl sonra, 1961'de, İngiltere'de bir hastanede ilk metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) izolasyonu rapor edilmiştir (Jevons, 1961; Waness, 2010). İlk MRSA suşları hastane kaynaklı (Hospital Acquired MRSA) (HA-MRSA) idi ve klonal bir yayılma şekillenip tüm dünya çapında yayılma göstermiştir. Toplumsal kaynaklı suşların (Community Acquired MRSA) (CA-MRSA) ise 1990'dan itibaren önce halk arasında, daha sonra ise sağlık birimlerinde yayılma gösterdiği belirlenmiştir (Waness, 2010).

1.1.3. Vankomisin

McCormick ve ark. (1956) tarafından ilk kez 1956'da *Streptomyces orientalis*, şimdiki ismiyle *Amycolatopsis orientalis*, Hindistan ve Endonezya'dan toplanan toprak örneklerinden izole edilmiş ve bu mikroorganizmanın, Gram pozitif bakterilere karşı yüksek aktivite gösteren 05856 olarak adlandırılan bir maddeyi ürettiği belirlenmiştir (McCormick ve ark., 1956; Calderon ve Sabundayo, 2007). Bu madde daha sonra vankomisin olarak isimlendirilmiştir. Bu maddenin penisilin dirençli stafilocokların oluşturdukları enfeksiyonların tedavisinde oldukça başarılı olduğu görülmüş ve kullanıma girmiştir. Ancak 1960'lı yıllarda ağır yan etkilerinden dolayı ve beta-laktamaz dirençli yarı sentetik penisilinlerin üretilip kullanılmasıyla vankomisinin kullanımında kısıtlamalara gidilmiş olsada, 1970'li yıllarda yarı sentetik penisilinlere dirençli *S. aureus* suşlarının yol açtığı enfeksiyonların

prevalansında artışlardan dolayı tekrar vankomisin kullanımı yaygınlaşmış olup, ayrıca önceki formulasyonlarından daha saf olan ve yan etkileri azalmış formulasyonları kullanıma alınmıştır (Levine, 2006; Calderon ve Sabundayo, 2007).

Vankomisine dirençli bulunan ilk Stafilokok türü *S. haemolyticus* olarak literatürlere 1987’de girmiştir (Schwalbe ve ark., 1987) ve ilk vankomisine duyarlılığı azalmış *S. aureus* suşu (VISA) Japonya’da MRSA enfeksiyonununundan dolayı uzun zamandır vankomisin tedavisi alan bir hastadan izole edilmiştir. Bu suş MU-3 olarak adlandırılmıştır (Hiramatsu ve ark., 1997a). Ardından 1998’de Fransa ve İngiltere’de (Howe ve ark., 1998; Ploy ve ark., 1998), 1999’da Hong Kong ve İspanya’da (Ariza ve ark., 1999; Wong ve ark., 1999), 2001’de Brezilya, ve Avustralya’da (Oliveira ve ark., 2001; Ward ve ark., 2001) vankomisine duyarlılığı azalmış insan kökenli *S. aureus* suşları bildirilmiştir. Japonya’da 1980-1997 arasında klinik vakalardan toplanmış KNS suşları arasında 1990’dan sonra izole edilmiş suşlarda vankomisine karşı azalmış duyarlılık tespit edilmiştir (Kato ve ark., 1998). Yine 1998’de New York’ta vankomisine duyarlılığı azalmış metisiline dirençli KNS suşları rapor edilmiştir (Sieradzki ve ark., 1998). Ancak bu suşların tümünün genetik materyalinde vankomisin dirençliliğinden sorumlu herhangi bir yapı tespit edilememiş ve vankomisine azalan duyarlılığın bakteri hücre duvarı kalınlaşması sonucu şekillendiği belirlenmiştir.

İlk *vanA* genini taşıyan vankomisin resistant *S. aureus* (VRSA) 2002’de Amerika Birleşik Devletleri’nin Michigan Eyaletinde bir hastanede diyaliz hastasından, bu hastada kullanılan katater ucundan izole edilmiştir (Chang ve ark., 2003). Bundan 2 ay sonra, diğer bir *vanA* geni taşıyan VRSA suşu, Pennsylvania eyaletinde 70 yaşındaki irinli akıntısı olan kronik topuk ülserli hastadan alınan sıvay örneklerinin bakteriyolojik kültüründen izole edilmiştir (Tenover ve ark., 2004). Bu iki suş daha sonra biri New York eyaletinde (CDC, 2004) ve diğer 4’ü Güneybatı Michigan’da (Sievert ve ark., 2008) olmak üzere 5 vaka izlemiştir. Tüm bu 7 VRSA suşunun *vanA* genini taşıdığı ve suşların vankomisin için Minimal İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) orta değerinin 512 µg/ml (mikrogram/mililitre) olduğu bulunmuştur (Sievert ve ark., 2008). Tüm hastaların geçmişinde MRSA ve enterokok kolonizasyonu tespit edilmiş ve hepsinde kronik deri ülserleri

görülmüştür. Hastaların çoğu da VRSA enfeksiyonunun gelişiminden önce vankomisin tedavisi almışlardır (Sievert ve ark., 2008).

Hayvan vakalarından izole edilen stafilocok türlerinde ise vankomisine dirençli suş henüz bildirilmemiş ancak vankomisine duyarlılığı azalmış suşlara rastlanmıştır (Shi ve ark., 2010; Turkyilmaz ve ark., 2010).

1.2.Etiyoloji

1.2.1.Sınıflandırma

Staphylococcus cinsi, yayınlanan son Bergey's Manual'e göre *Bacilli* sınıfında *Bacillales* takımının altında *Staphylococcaceae* familyasında yer almaktadır (Winn ve ark., 2006). Gram pozitif ve katalaz pozitif olmaları ile daha önceki sınıflandırmada birlikte aynı familya (*Micrococcaceae*) altında yer aldıkları *Micrococcus* cinsindeki bakterilere benzerlerse de, mikrokoklar oksidaz pozitifdir. Ayrıca stafilocokların aksine lizostafin (200 µg/ml) ve furazolidon (100 µg/ml)'a dirençli iken basitrasine (0,04 Unit) duyarlıdır. Mikrokokların genomundaki G+C oranında (% 63-73) stafilocokların G+C oranına (% 30-40) göre daha yüksektir. Mikrokoklar daha büyük hücre yapısına sahip olup mikroskop altında çoğunlukla çift ve dördü olarak ve düzensiz yığınlar halinde görünürler (Winn ve ark., 2006). Stafilocok cinsi içerisinde tanımlanmış 35 tür ve 16 alt tür bulunmaktadır (Winn ve ark., 2006).

1.2.2.Morfoloji ve Boyanma Özellikleri

Stafilocoklar 0,5-1,5 µm (mikrometre) çapında, Gram pozitif, yuvarlak, genellikle kapsülsüz, ve sporsuz bakterilerdir. *S. saccharolyticus* ve *S. aureus* subsp. *anaerobius* hariç fakültatif anaerobiktirler. Yeni kültürlerde Gram pozitif boyansalar da, eski kültürlerden yapılan boyamalarda Gram negatif görünüme dönebilirler. Mikroskop altında tek tek, çiftler veya çoğunlukla üzüm salkımı görünümünü andıran kümeler tarzında görünürler. Sıvı besiyeri, irin ve vücut sıvılarından yapılan preparatlarda 3-4'lü kısa zincirler halinde görülebilirler (Winn ve ark., 2006).

1.2.3.Üreme Gereksinimleri ve Koloni Morfolojisi

Koyun kanlı agar ve genel besiyerlerinde üreyebilmekte ve 30-37 °C’de 18-24 saat inkübasyon sonucunda 1-3 mm (milimetre) çapında koloniler oluşturmaktadırlar. Stafilocok kolonileri genellikle S tipi, yuvarlak, kenarları düzgün ve hafif kabarık profile sahiptir. *S. aureus* suşlarının bazıları sarı ve sarı-portakal renginde pigment oluşturabilir bazıları ise beyaz- gri renkte koloni oluşturur. *S. simulans*, *S. intermedius*, *S. epidermidis*, *S. hyicus*, *S. capitis*, *S. saccharolyticus* ve *S. cohnii* pigment oluşturmayan türlerdir. *S. aureus* ve KNS’lar pigment üretimi oda sıcaklığında 2-3 gün süre ile inkübasyon sonucunda daha iyi gözlemlenir. *S. aureus*’un çok küçük koloni büyüklüğüne sahip, pigment üretmeyen ve karbondioksit varlığında daha iyi üreyen küçük koloni varyantı denilen suşları bulunmaktadır. Stafilocok suşlarının bazıları aynı kültür pleytinde farklı büyüklükte koloniler oluşturabilir ve bu karışık kültür görünümü verebilir. *S. aureus* suşlarının çoğu ve bazı KNS suşları koyun kanlı agarda hemoliz oluşturabilmektedir (Cengiz, 1999; Winn ve ark., 2006).

1.2.4.Biyokimyasal Özellikleri

Stafilocoklar glukozu fermentatif olarak parçalayıp son ürün olarak gaz oluşturmaksızın laktik asit açığa çıkartırlar. Stafilocokların üremesi için optimal sıcaklık 30-37 °C ve optimal pH 7-7,5’dir. İçerisinde % 7,5-10 Sodyum Klorür (NaCl) içeren ortamlarda üreyebilirler. Stafilocoklar lizostafin ve furazolidon’a duyarlı basitrasin’e ise dirençlidirler. *S. sciuri*, *S. lentus*, *S. vitulinus* ve *S. fleurettii* hariç diğer tüm stafilocok türleri oksidaz enzimine sahip değildir. Önemli bir virülens faktörü olan koagülaz enzimini *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. delphini*, *S. lutrae*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* ve *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* üretmektedir. Genellikle nitratları nitritlere indirgemektedirler (*S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. kloosii*, *S. arlettae*, *S. succinus* hariç). *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. xylosus*, *S. hominis*, *S. sciuri*, *S. gallinarum*, *S. lentus*, *S. equorum*, *S. vitulinus*, *S. kloosii*, *S. arlettae*, *S. fleurettii* novobiosin’e dirençli olup diğer türler duyarlıdır. Stafilocoklar ısı ve çevre koşullarına dayanıklı bakterilerdir. Kuruluğa dirençlidirler. Genellikle 60 °C’de 1 saat tutulduklarında aktivitelerini kaybederler (Cengiz, 1999; Winn ve ark., 2006).

Stafilokok cinsinde bulunan türlerin identifikasyonunda, şeker testleri (maltoz, sükroz, laktoz, mannitol, mannoz, arabinoz, trehaloz, ksiloz, raffinoz, sellobioz, ve N-asetil glukozamin), katalaz testi, oksidaz testi, kümeleştirme faktörü (clumping factor), tüp koagülaz testi, Voges-Proskauer Testi (Asetoin Testi, VP), üreaz testi, nitrat indirgenmesi testi, DNase testi, mannitol fermentasyonu, beta-glukuronidaz, beta-galaktosidaz (O-nitrophenyl- β -D-galactopyranosidase, ONPG) ve beta-glukosidaz testleri, alkalın fosfataz testi, ornithin dekarboksilaz testi, arjinin dihidrolaz testi, pyrrolidonyl arylamidase aktivitesi testi, novobiosin ve polimiksin'e duyarlılık testleri ve hemoliz ve pigment oluşturmaları gibi özellikleri kullanılmaktadır (Winn ve ark., 2006).

1.3. Virülens Özellikleri

1.3.1.Kapsül

Stafilokokların özellikle mukoid türlerinde polisakkarid karakterde kapsül oluşumu görülmektedir. Stafilokoklarda toplam 11 kapsüler polisakkarit serotipi belirlenmiş olup insanlardaki vakalardan izole edilen *S. aureus* suşlarında % 70-80 oranında tip 5 ve tip 8 serotipine rastlanmaktadır. Sığır mastitis vakalarından izole edilen stafilokok suşlarında ise 5 ve 8 serotiplerinin oranları, suşların izole edildiği coğrafik bölgeye göre büyük varyasyonlar göstermektedir (Tollersrud ve ark., 2000). Kapsül teşekkülü, meme içinde bakterinin konakçı savunma sisteminin fagositoz hücreleri tarafından fagozite edilmesine karşı koruyucu etki yapmaktadır (Sutra ve ark., 1990).

1.3.2.Hücre duvarı

Stafilokokların hücre duvarının yapısı Gram pozitif bakterilerin hücre duvarı yapısının özelliklerini taşımakta olup, elektron mikroskop ile 20-40 nm kalınlığında ve homojen yapıda görülür (Giesbrecht ve ark., 1998).

1.3.2.1.Peptidoglikan

Peptidoglikan bir heterodimer olup β -1-4-N-asetilglukozamin (NAG) ve N-asetilmuramikasit (NAM) tarafından oluşturulan bir disakkarit iskelet yapısına

sahiptir. NAM moleküllerine L-alanin, D-glutamin, L-lizin, ve D-alanin'den oluşan ve kök peptid (tetrapeptid) denilen zincirler tutunmuş durumdadır. Bu kök peptidlerin yaklaşık % 90'ı pentaglisin köprüsü vasıtasıyla diğer bir NAM molekülünün kök peptidlerine çapraz bağlanma yapar ve böylece disakkarit zincirlerinden oluşan bir polimer yapı şekillenir. Pentaglisin köprüleri stafilokokkal peptidoglikanın karakteristik özelliğidir ve peptidoglikana dayanıklılık veren bu yapısal özelliğidir. Bu köprüler bir kök peptidin L-lizin'i ile diğer bir kök peptidin D-alanin'i arasında oluşur. (Black, 1996; Giesbrecht ve ark., 1998; Winn ve ark., 2006).

1.3.2.2. Teikoik Asit

Teikoik asitler birbirine fosfodiester bağları ile bağlanmış ribitol veya gliserol fosfat polimerleridir. Ribitol teikoik asit ve gliserol teikoik asit olmak üzere 2 tipi vardır. Ribitol teikoik asitler, peptidoglikan tabakasına NAM'ın C6 hidroksil grubu vasıtasıyla kovalent bağ kurarak bağlanmıştır. Gliserol teikoik asitler ise sitoplasmik membranın glikolipidleri ile bağlantı kurmuş durumdadır. Teikoik asit, *S. aureus*'ta ribitol fosfat polimeri yapısında iken *S. epidermidis*'te ise gliserol fosfat polimerleri halindedir. Teikoik asit, bakteri hücre duvarı bütünlüğü ve hücre fonksiyonları için gerekli olan küçük iyonların tutulmasını sağlar. Ayrıca, bakterinin konakçı vücudunda mukozal ve diğer yüzeylere adezyonunda görev alır ve peptidoglikan sentezinde de rol alabilir (Cengiz, 1999; Winn ve ark., 2006).

1.3.2.3. Yüzey Proteinleri

Protein A, *S. aureus* suşlarının çoğunda bulunan bir yüzey proteini olup hücre yüzeyine bağlı bulunan ve ortama salınan olmak üzere 2 formda bulunur. Hücre yüzeyine bağlı olan, bakteri hücre duvarındaki peptidoglikan tabakaya kovalent olarak bağlanmıştır. Ortama salınan protein A, bakteri üretildiğinde besiyerine salınmaktadır. Protein A'nın IgG₃ hariç tüm IgG alt sınıflarının, IgA₂ ile bazı IgM'nin Fc bölgelerine bağlanma yeteneği vardır. Protein A'nın komplemanı aktive etme, antifagositik, kemotaktik ve mitojenik etkileri vardır ve önemli bir virülens faktörüdür. Ayrıca, protein A güçlü immunojenik karakterde olup *S. aureus* enfeksiyonlarının teşhisinde kullanılan önemli bir yapıdır. Sığır mastitis vakalarından

izole edilen *S. aureus* suşlarının % 50-60'ında protein A varlığı belirlenmiştir. (Sutra ve Poutrel, 1994; Cengiz, 1999; Winn ve ark., 2006).

Kümeleştirme Faktörü (Clumping factor), bakteri hücre yüzeyinde olan bu yapının fibrinojene bağlanma yeteneği vardır. Fibrinojenin fibrine dönüşümü ile bakteri yüzeyinde fibrin presipitasyonu oluşur ve stafilokoklarda kümeleşme ve aglütinasyon şekillenir. Böylece bakterinin çevresinde fibrinden ibaret bir tabaka oluşur ve bakterinin konakçı immun sisteminden korumasını sağlar (Cengiz, 1999; Winn ve ark., 2006).

Elastin Bağlayıcı Protein, Kollajen Bağlayıcı Protein ve Fibronektin Bağlayıcı Protein, konakçı ekstrasellüler matriksine adhezyondan sorumludurlar. Kollajen ve fibronektine bağlanma mekanizmaları birbirinden farklıdır. Sığırlarda mastitis şekillenmesinde bu yüzey proteinlerin meme dokusuna adezyonda rol aldıkları gösterilmiştir (Sutra ve Poutrel, 1994).

1.3.3.Enzimler

Stafilokok cinsinde bulunan türler virülens faktörü olarak rol oynayan çeşitli enzimler üretmektedirler.

1.3.3.1.Katalaz

Konakçı fagosit hücreleri tarafından stafilokoklar fagosit edildikten sonra, fagositik hücrelerin içerisinde myeloperoksidaz sistemi tarafından oluşturulan toksik hidrojen ve serbest radikallerin inaktivasyonunda görev alan bir stafilokokkal enzimdir. Stafilokoklar fagositlerin içerisinde bu enzim sayesinde yaşamlarını sürdürebilmektedirler (Winn ve ark., 2006).

1.3.3.2.Koagülaz

Plazmanın pıhtılaşmasına neden olan bir enzimdir. İmmunolojik olarak birbirinden ayrıldığı gibi plazmayı pıhtılaştırma mekanizmaları açısından da birbirinden farklı olan iki tip koagülaz enzimi vardır. Bağlı koagülaz (Kümeleştirme Faktörü) stafilokokların hücre yüzeyinde meydana gelir ve ortama bırakılmaz. Serbest koagülaz ise protein tabiatında olup stafilokoklar tarafından üretildikten sonra

hücre dışına salınmaktadır. Serbest koagülaz protrombine bağlanır ve enzimatik olarak aktif hale geçer. Bu yolla fibrinojenin fibrine dönüşümünü katalize eder. Stafilocokların koagülaz aktivitesi genellikle tavşan ve insan plazması kullanılarak lam ve tüp yöntemi ile ortaya çıkarılabilmektedir (Cengiz, 1999; Winn ve ark., 2006).

1.3.3.3.Fibrinolizin

Stafilokokların ürettiği fibrinolizin enzimleri, fibrin pıhtılarını yıkımlamakta ve bu sayede bakteri yeni dokulara yayılabilmektedir (Winn ve ark., 2006). Karadzhov ve ark. (1981), subklinik sığır mastitislerinden izole ettikleri KNS suşların % 27,8'inde fibrinolizin aktivitesi tespit ederken normal ineklerin sütlerinden izole edilen KNS suşlarında ise daha düşük oranda fibrinilizin aktivitesi belirlemişlerdir.

1.3.3.4.Hyaluronidaz

Bu enzim ile stafilocoklar, konakçı dokusu matriksinde bulunan hyaluronik asidi hidrolize edip dokularda yayılmalarını kolaylaştırırlar (Winn ve ark., 2006).

1.3.3.5.Lipaz

Stafilokokların ürettiği bu enzim yağları hidrolize edebilmektedir ve böylece konakçı vücudunda bakterinin deri ve derialtı gibi dokularda yayılmasını kolaylaştırmaktadır. Younis ve ark. (2000), 319 sığır mastitis kökenli *S. aureus* suşunun % 75,2'sinde lipaz aktivitesi belirlemiştir.

1.3.3.6.Deoksiribonükleaz

Hem ekzonükleaz hem de endonükleaz aktivite gösteren enzimdir. Isıya dirençlidir (Winn ve ark., 2006). Younis ve ark. (2000), 319 sığır mastitis kökenli *S. aureus* suşunun % 83,3'ünde DNase aktivitesi belirlemiştir.

1.3.3.7.Beta-laktamaz (Penisilinaz)

Penisilin grubu antibiyotiklerdeki β -laktam halkasının hidroksil grubunu parçalayarak etkisiz hale getiren beta-laktamaz enzimleri, indüklenebilir karakterde

üretilebildiği gibi bazı suşlar devamlı biçimde üretebilmektedir ve stafilocokların bu grup antibiyotiklere dirençli hale gelmelerini sağlamaktadır. Ayrıca, aşırı miktarda beta-laktamaz üretimi borderline metisilin dirençliliğine neden olabilmektedir (Chambers, 1997). *S. aureus* tarafından 3 tip beta-laktamaz enzimi üretilmektedir. Beta-laktamaz enzimlerinin genleri genellikle plazmid üzerinde lokalize olmuştur. Bu dirençlilik genleri diğer bakterilere transformasyon ve transdüksiyon ile transfer edilebilmektedir (Eyckmans ve Tompsett, 1965; Winn ve ark., 2006).

1.3.4.Slaym Faktörü (Slime Factor)

Slaym maddesi, amorf kapsül yapısında glikokaliks materyalidir ve % 40'ı karbonhidrat % 27'si ise proteinden oluşmaktadır. Slaym karakterinden dolayı stafilocoklar tıbbi aletlere tutunup kolonize olabilmektedir. Çok güçlü antijenik yapıda olup yüksek titrede antikor oluşumuna yol açar. Slaym pozitif stafilocok suşları daha virülettir, fagositoya daha dirençlidirler ve antibiyotiklerin bakteri içine difüzyonunu inhibe ettiklerinden daha fazla oranda antibakteriyellere direnç göstermektedirler (Cengiz, 1999). Slaym tabaka stafilocokların meme bezi epitelyum hücrelerine adezyonuna ve kolonize olmalarına yardımcı olmaktadır (Baselga ve ark., 1993).

1.3.5. Toksinler

1.3.5.1. Sitolitik toksinler

1.3.5.1.1.Hemolizinler

Alfa Hemolizin (Alfa Toksin), eritrosit, lökosit ve diğer doku hücrelerinin hücre membranlarını parçalayabilen toksindir. Özellikle tavşan eritrositlerine karşı güçlü litik etkiye sahiptir. Tavşanlara deri altı enjekte edildiğinde nekroz oluşturur. Düz kas spazmı yapar. Antijeniktir ve formol ile toksoid haline getirilebilir. Antitoksini ile nötralize olur. Sığırlarda gangrenli mastitisten sorumlu toksindir ve mastitisin gelişiminde en önemli virülens faktörlerinden biridir (Cengiz, 1999; Leloğlu, 1999; Akineden ve ark., 2001; Winn ve ark., 2006).

Beta Hemolizin (Beta Toksin), eritrosit, lökosit ve fibroblast hücrelerine etki yapan bir toksindir. En güçlü şekilde koyun ve sığır eritrositlerine karşı litik etki

gösterir. Bir sfingomyelinaz olup çok çeşitli hücrenin membranında bulunan sfingomyeline etki eder. Hemolitik aktivitesi eritrositlerin soğuk muamelesi ile artar. Antijeniktir, antitoksini ile nötralize olur ve formol ile toksoid haline getirilebilir. Grup B streptokokların identifikasyonunda kullanılan CAMP testinde beta hemolizin üreten *S. aureus* suşları kullanılmaktadır. Sığırların mastitis vakalarında rol oynayan önemli bir virülens faktörü olup alfa toksin ile birlikte doku yıkımı ve abse oluşumundan sorumludur (Cengiz, 1999; Leloğlu, 1999; Winn ve ark., 2006). Beta toksin, sığırların meme bezlerindeki sekresyon yapan epitel hücrelerini yıkımlar, alfa toksinin yıkımlayıcı etkisini artırır, bakterinin meme epitel hücrelerine adezyonunu kolaylaştırır ve stafilokokların bölgede proliferasyonunu artırır (Cifrian ve ark., 1996).

Gama Hemolizin (Gama Toksin), çok çeşitli hücreler üzerinde toksik etkiye sahip olup protein yapısındadır. Özellikle tavşan, koyun ve insan eritrositleri üzerine litik etki yapmaktadır. Gama hemolizinin ayrıca lökositleri lize edebilme yeteneğinde vardır. Gama hemolizinin aktivitesi 3 proteinden ileri gelmektedir. HlgA ve HlgC (sınıf S) ve HlgB (sınıf F) iki çift oluşturur ve HlgA + HlgB ve HlgC + HlgB olarak adlandırılır (Lina ve ark., 1999; Cengiz, 1999; Leloğlu, 1999). Bu toksin enfeksiyonun erken safhalarında rol oynayabilmektedir (Fitzgerald ve ark., 2000).

Delta Hemolizin (Delta Toksin), eritrosit, lökosit, makrofaj, lenfosit ve trombositler üzerinde hasara yol açan toksindir. Özellikle insan, tavşan, koyun ve maymun eritrositleri üzerine litik etkiye sahiptir (Cengiz, 1999; Leloğlu, 1999). Delta hemolizin, beta hemolizinin hemolitik etkisini artırır (Dinges ve ark., 2000).

1.3.5.1.2. Lökotoksinler

Ruminantların mastitis vakalarından izole edilen stafilokokların bir kısmının lökositik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Rainard ve ark., 2003). Moleküler ağırlıkları sırasıyla 32 ve 35 Kilodalton (kDa) olan F (fast) ve S (slow) adı verilen 2 protein komponentinden meydana gelmektedirler. Özellikle insan ve tavşan lökositleri ve makrofajları üzerine etkilidirler. Her iki protein komponenti de antijeniktir ve formol ile toksoid haline dönüştürülebilmektedir. Tek başına litik etki göstermeyen bu komponentler birlikte sinerjik etki ile lökositlerin membranında potasyum ve diğer iyonlar için geçirgenliği artıran gözeneklerin açılmasına neden

olurlar. Ayrıca fagositoza karşı stafilokokları korurlar. Stafilokokların lökotoxin familyası, Panton-Valentine l kosidin (PVL) (LukS-PV + LukF-PV), gama hemolizin (HlgA + HlgB ve HlgC+ HlgB) ve son olarak keşfedilen LukM (LukM +LukF-PV) and Luke/D (LukE + LukD)’den ibarettir (Cengiz, 1999; Leloglu, 1999; Winn ve ark., 2006). Haveri (2008), farklı klinik görünümdeki sığır mastitislerden izole edilmiş *S. aureus* su larında LukM ve Luke/D toksinlerini kodlayan genlerin varlığını Polimerase Chain Reaction (PCR) ile göstermiştir. Turkyilmaz ve ark. (2010) mastitisli sütlerden izole edilen MRSA su larında PVL genine rastlamamı tır.

1.3.5.2. Enterotoksinler

Stafilokokların ürettiği polipeptid yapıdaki enterotoksinler ısıya dayanıklıdır ve 100 C’de 30 dakika (dk) dayanabilirler. Bakteri tarafından enterotoksinler salgılandıktan sonra, konakçı immun sisteminin antijen sunan hücreleri ve T lenfositler ile kar ıla ması sonucu, T lenfosit proliferasyonu ve yüksek oranda sitokin ekspresyonu gerçekleşir (Balaban ve Rasooly, 2000). Önceleri SEA, SEB, SEC, SED, SEE olarak kodlanan 5 immunolojik tipi belirlenmişse de, daha sonra SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEQ, SER ve SET olarak kodlanan tipleri de tanımlanmıştır (Cengiz, 1999; Zsch cka ve ark., 2005; Winn ve ark., 2006). İnsanlardaki besin zehirlenmelerinde A ve D tipi enterotoksinlere rastlanılmaktadır. Türkiye’de yapılan sığır mastitis vakalarından izole edilen Stafilokok su larında, bu enterotoksinlerin değişik oranlardaki varlığı gösterilmiştir (Boynukara ve ark., 2008; Karahan ve ark., 2009). Karahan ve ark. (2009)  alı malarında, sığır mastitis vakalarından izole edilen *S. aureus* su larının % 29,3’ ünün bir veya daha fazla enterotoksin geni taşıdığını ve SEI’nin en yaygın bulunan gen olduğunu bildirmişler ve SEA, SEE ve SEH genlerine ise, hiçbir izolatta rastlamamı lardır. Boynukara ve ark. (2008) ise, Van bölgesinde sığırların mastitis vakalarından izole ettikleri *S. aureus* su larının % 25,5’ini enterotoksijenik bulmuşlar ve en yaygın tipin SEA olduğunu ve SEC ve SED tipi su un olmadığını bildirmişlerdir.

1.3.5.3.Eksfoliyatif Toksin (Eksfoliyatin)

Ekzotoksin niteliğinde olan bir protein olup epidermolitik bir toksindir. A ve B olarak adlandırılan iki tipi bulunmaktadır ve her birinin moleküler ağırlığı 24 kDa'dır. Eksfoliyatif toksin A ısıya duyarlıdır ve geni (*eta*) plazmidte bulunmaktadır. Eksfoliyatif toksin B ise ısıya dirençlidir ve geni (*etb*) kromozomaldır. Bu iki toksin biyokimyasal ve immunolojik olarak birbirinden farklı olsa da benzer biyolojik aktiviteye sahiptirler. Proteolitik özellikte olup epiderminin mukopolisakkarit matriksini eritirler. Bu toksinler, insanlarda stafilokokkal haşlanmış deri sendromundan sorumludurlar (Cengiz, 1999; Winn ve ark., 2006). Türkiye'de Karahan ve ark. (2009)'nın sığır mastitisleriyle yaptıkları çalışmada, 92 *S. aureus* suşunda *eta* ve *etb* genlerine rastlanmamıştır. Andresen (2005), Japonya'da mastitisli inek sütünden izole edilen *S. hyicus* suşunda *eta* geninin varlığını tespit etmiştir.

1.3.5.4.TSST (Toxic Shock Syndrome Toxin)

Protein tabiatında olup 22 kDa moleküler ağırlığına sahiptir. Proteolitik enzimler ve ısı ile inaktivasyona dirençlidir. Konakçı vücudunda T lenfosit proliferasyonunu ve monositlerden interleukin-1 salınımını uyarır (Winn ve ark., 2006). Karahan ve ark. (2009), Türkiye'de yaptıkları çalışmada 92 *S. aureus* suşundan sadece 3 adedinde (% 3,3) TSST genine rastlamıştır.

1.4. Beta-laktam Antibiyotikler

Penisilinler, Sefalosporinler, Karbapenemler ve Monabaktamlar olarak 4 gruba ayrılan beta-laktam antibiyotikler bir azot ve 3 karbon içeren bir beta-laktam halkası içermektedir. Bakteri hücre duvarı sentezini baskılayarak bakteriosidal etki gösterirler (Calderon ve Sabundayo, 2007). Beta-laktam antibiyotikler, bakterinin sitoplazmik membranında bulunan penisilin bağlayıcı proteinlerine (PBP) bağlanırlar ve temel olarak peptid zincirlerinin bağlanmalarını inhibe ederek normal yapıda peptidoglikan oluşumunu engellerler. Böylece duvar bütünlüğünün bozulmasına ve bakterinin dış ortama karşı direncinin kaybına yol açarlar. Bu durum, bakterinin sitoplazmik zarının parçalanması ve bakterinin ölmesiyle sonuçlanır.

Toplam 56 adet beta-laktam antibiyotik bulunmaktadır (Calderon ve Sabundayo, 2007).

Bakteriler, beta-laktam antibiyotiklerin sidal etkilerine karşı temel olarak 3 mekanizma geliştirmiş durumdadırlar. Bunlar, ürettikleri beta-laktamaz enzimleri ile antibiyotiğin yıkımlanması, antibiyotiğin bakteri içerisine penetrasyonunun azaltılması ile PBP'lere ulaşmalarının önlenmesi ve antibiyotiklere düşük affiniteye sahip PBP'lerin üretilmesi şeklinde tanımlanmaktadır (Calderon ve Sabundayo, 2007; Ünal, 2009).

Penisilinler aktivitelerine göre 4 gruba ayrılmaktadır (Calderon ve Sabundayo, 2007). **Doğal Penisilinler (Penisilin G ve Penisilin V)** Stafilokoklarının ürettikleri penisilinaz enzimi nedeniyle stafilokok infeksiyonlarında yetersiz kalmaktadırlar. **Penisilinaz - dirençli Penisilinler (Dikloksasilin, Kloksasilin, Metisilin, Nafsilin, Oksasilin)** doğal penisilinlerin yapısına bir yan zincirin eklenmesiyle üretilmiş olup stafilokokların ürettikleri penisilinaz enzimine karşı dirençli olan yarı sentetik penisilinlerdir. Gram negatif bakteriler üzerine etkileri yoktur. **Aminopenisilinler (Amoksisilin, Ampisilin, Amoksisilin + Klavulanik Asit, Ampisilin + Sulbaktam, Bakampisilin)** ise yan zincirde değişiklik yapılması ile elde edilirler ve hem Gram pozitif ve hem de Gram negatif bakterilere etkilidirler. **Karboksipenisilin**'lerin (**Karbenisilin, Tikarsilin, ve Tikarsilin + klavulanik asit**) etki spektrumları ampisilin ile aynı olmakla birlikte Gram negatif bakterilere daha güçlü etki göstermeleriyle karakterizedirler. Yan zincirde değişiklik yapılarak elde edilirler. Son grup olan **Ureidopenisilinler ve Piperazine (Mezlosilin, Piperasilin)** penisilinin yapısına sadece ureido grubun ve ureido grup ile bir piperazin yan zincirinin ilavesiyle, sırasıyla mezlosilin ve piperasilin elde edilmiştir. Spektrumu en geniş olan penisilinlerdir.

Sefalosporinler, diğer beta-laktam antibiyotikler gibi peptidoglikan yapısındaki çapraz bağlanmaları inhibe ederek ve bakteriyel hücre duvarı sentezini inhibe ederek sidal etki oluştururlar. Bakterilerde sefalosporinlere karşı direnç, PBP'lerde şekillenen değişiklikler, beta laktamaz üretimi veya antibiyotiğin hücre duvarına penetre olmasını azaltarak PBP'lere ulaşmasının engellenmesiyle olur (Calderon ve Sabundayo, 2007).

Karpanenemler en geniş etki spektrumuna sahip olan beta-laktam antibiyotikler olup anaerob ve aerob Gram negatif ve Gram Pozitif bakterilere etki ederler. Bakteri hücre duvarı sentezini inhibe ederek bakteriosidal etkilerini oluştururlar (Calderon ve Sabundayo, 2007).

Monobaktamlarda, diğer beta-laktam antibiyotikler gibi aynı mekanizmalarla etkilerini oluştururlar (Calderon ve Sabundayo, 2007).

1.5. Metisilin Etki Mekanizması

Stafilokoklarda 4 adet PBP bulunmakta ve bunlar PBP1, PBP2, PBP3 ve PBP4 olarak adlandırılmıştır (Chambers, 1997; Stapleton ve Taylor, 2002). Moleküler ağırlıkları sırasıyla 85, 81, 75 ve 45 kDa olan proteinlerin biri transpeptidasyonda (çapraz bağlanma), diğeri transglikosilasyonda (glikan zincirinin uzaması) görevli iki domain'i vardır (Chambers, 1997; Stapleton ve Taylor, 2002). Metisilin dahil beta-laktam antibiyotikler, PBP'lerin transpeptidasyon domainini inhibe ederek peptidoglikanda çapraz bağlanma reaksiyonunu durdurur. Böylece yeni stafilokok hücrelerinde zayıf hücre duvarı oluşumuna neden olur ve bakteri bütünlüğünü koruyamaz (Stapleton ve Taylor, 2002). PBP1, PBP2 ve PBP3 beta-laktam antibiyotiklere karşı yüksek affiniteye sahiptir ve beta-laktam antibiyotiğin bu proteinlere bağlanması bakteri için letal etki oluşturmaktadır (Chambers, 1997).

1.6. Metisiline Direnç Mekanizmaları

Stafilokokların ürettikleri ve doğal penisilinleri parçalayan beta-laktamaz enzimiyle hidrolize olmayan beta-laktam antibiyotiklere (dikloksasilin, kloksasilin, metisilin, nafsilin, oksasilin) karşı oluşan direnç metisilin direnci olarak tanımlanmaktadır (Ünal, 2009).

Metisilin dirençli stafilokokların kromozomunda, 40-60 Kilobaz (Kb) büyüklüğünde ve Staphyococcal Cassette Chromosome Mec (SCCmec kaseti) olarak adlandırılmış DNA parçası bulunmaktadır (Stapleton ve Taylor, 2002). SCCmec kaseti, PBP2a olarak adlandırılan PBP2'nin değişikliğe uğramış formunu kodlayan *mecA* geni (2,1 kb), *mecA* transkripsiyonunu regüle eden *mecI* ve *mecRI* genleri ve 20-45 kb büyüklüğünde *mec* ile ilgili DNA parçasından oluşmaktadır (Chambers, 1997; Stapleton ve Taylor 2002). PBP2a'nın beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı

affinitesi PBP1, PBP2, PBP3 ve PBP4'e göre oldukça düşüktür (Stapleton ve Taylor, 2002). Bu nedenle PBP1-4'ün transpeptidasyon fonksiyonlarını inhibe eden metisilin konsantrasyonlarında PBP2a aktif kalabilmekte ve peptidoglikan tabakasından glikan zincirlerinin çapraz bağlanmasını sağlayabilmekte ve böylece metisiline dirençliliği oluşturabilmektedir (Stapleton ve Taylor, 2002). PBP2a, 76 kDa molekül ağırlığındadır ve indüklenebilir karakterde olup metisilin dirençliliğini belirlemektedir (Chambers, 1997; Stapleton ve Taylor, 2002).

SSCMec kasetinin 5 adet tipi belirlenmiş olup Tip I-V olarak adlandırılmışlardır (Appelbaum, 2007). HA-MRSA suşları SCCmec alt tip I-III içerir, CA-MRSA ise SCCmec alt tip IV ve V'i içermektedir (Appelbaum, 2007). HA-MRSA suşları PVL geni taşımasına rağmen CA-MRSA suşları ise taşımamaktadır. PVL geni HA-MRSA suşlarının yol açtığı enfeksiyonlarda rol oynayan önemli bir virülens faktörüdür (Appelbaum, 2007).

Metisiline duyarlılığın azalması, PBP2a'nın üretilmesiyle şekillendiği gibi PBP'lerde oluşan nokta mutasyonlar sonucu ve PBP'lerin aşırı miktarda üretilmesi sonucunda oluşabilmektedir (Chambers, 1997; Gülay, 2002). Ayrıca, beta-laktamaz enziminin aşırı miktarda üretilmesi duyarlılığı sınırda olan suşların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu suşlar borderline metisilin duyarlı veya borderline oksasilin dirençli olarak tanımlanmaktadır (Chambers, 1997; Gülay, 2002; Sancak, 2007).

Borderline metisilin dirençli suşlar 2 grupta incelenmektedir. *MecA* geni taşıyan suşlar heterojen dirençliliğe sahiptirler ve PBP2a üretmektedirler (Chambers, 1997). Bu suşlar yüksek oksasilin yoğunluklarında üreyebilen çok küçük alt popülasyonlara sahiptirler (Chambers, 1997; Sancak, 2007). *MecA* geni taşımayan borderline metisilin dirençli suşlar ise böyle alt popülasyonlara sahip değildirler ve bu durum PBP'lerin modifikasyonu veya bakterinin aşırı miktarda beta-laktamaz enzimi üretmesiyle şekillenmektedir (Chambers, 1997). Değişikliğe uğramış PBP'lere penisilinlerin bağlanması normalden daha yavaş olmakta ve bağlanmış olan penisilinlerin serbest kalması ise daha hızlı olmaktadır (Chambers, 1997). Bu değişikliklerde PBP'lerde nokta mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (Chambers, 1997). Beta-laktamaz enziminin bu enzime dayanıklı beta-laktam antibiyotikleri bile yavaşça hidrolize ettiğinin gösterilmesi aşırı beta-laktamaz üretebilen suşların borderline dirençli olmalarını açıkladığı belirtilmektedir (Chambers, 1997).

Metisilin dirençliliğinin fenotipik olarak ortaya çıkışı, homojen ve heterojen olmak üzere 2 şekilde olmaktadır (Chabbert ve Baudens, 1962; Hartman ve Tomazs, 1986; Chambers, 1997; Stapleton ve Taylor, 2002). Heterojen metisilin dirençli stafilokok suşları, metisiline değişik derecelerde dirençli olan alt popülasyonları içermektedir (Mathews ve Stewart, 1984; Hartman ve Tomazs, 1986; Chambers, 1997). Popülasyonun küçük bir kısmı (10^{-8} - 10^{-4}) çok yüksek antibiyotik konsantrasyonuna dirençlilik gösterirken büyük bir çoğunluğu duyarlılık sınırına yakın antibiyotik konsantrasyonlarına dirençlidir veya duyarlıdır (Chambers, 1997; Berger-Bachi, 1999). Tüm hücreler *mecA* geni taşısa da tüm hücrelerde dirençlilik ortaya çıkmaz. Homojen dirençli suşlarda ise hücrelerin tümü yüksek düzeyde antibiyotik yoğunluklarında üreyebilirler (Ünal, 2009). Bu durum daha bir takım genetik faktörlerin ve dış faktörlerin dirençliliğin ekspresyonunda rolü olduğunu göstermektedir (Chambers, 1997; Mathews ve Stewart, 1984).

MecA geninin transkripsiyonunun regülasyonu birbirinden bağımsız 2 adet regülatör gen grubu tarafından kontrol edilmektedir (Chambers, 1997; Stapleton ve Taylor, 2002; Ünal, 2009). *MecI-MecR1* genleri beta-laktam antibiyotiklere *mecA* geniyle verilen cevabı regüle etmektedir. *MecI*, *mecA*'yı baskılayan bir proteini, *mecR1*'de *mecA*'nın transkripsiyonunu sağlayan sinyal uyarıcı bir proteini kodlamaktadır. Diğer regülatör gen grubu ise *blaI-blaR1* genleridir. *BlaR1*, beta-laktam antibiyotik varlığında beta-laktamaz gen transkripsiyonuna yol açar. *BlaI* ise beta-laktamaz geninin transkripsiyonunu inhibe eder. Bir başka ifade ile *blaR1-blaI*, plazmid tarafından yönetilen stafilokokkal beta-laktamaz geninin (*blaZ*) indüklenebilir ekspresyonunu içerir. *MecRI-mecI*, *blaR1-blaI* ile çok yüksek derecede protein dizi homolojisi göstermektedir. Bu benzerlikten dolayı, *blaR1-blaI*'da *mecA*'yı regüle edebilmektedir ancak *blaI* tarafından baskılama *mecI*'ye göre daha zayıftır (Ryffel ve ark., 1992; Chambers, 1997; Stapleton ve Taylor, 2002; Ünal, 2009).

Araştırmalarda bir çok klinik MRSA izolatının *mecI* geninde veya *mecA* promotor bölgesinde mutasyonların olduğu ve bu yüzden PBP2a üretiminin *mecA* ve beta-laktamaz regülatör genleri tarafında kontrol edildiği gösterilmiştir (Hackbarth ve Chambers, 1993; Chambers, 1997; Stapleton ve Taylor, 2002).

MecA ve regülatör genlerinden ayrı olarak stafilokokların kromozomlarında bulunan *fem* (factor essential for methicillin resistance) veya *aux* (auxiliary) olarak adlandırılan genler, metisiline dirençliliğinin ekspresyonuna, dolaylı ve doğrudan bakteri hücre duvarı biyosentezinde rol oynayarak etki etmektedirler. Ancak *fem* genlerinin doğrudan PBP2a üretimi üzerine etkileri yoktur ve hem metisiline duyarlı hemde dirençli suşlarda bulunurlar (Berger-Bachi, 1995; Chambers, 1997). Berger-Bachi ve Rohrer (2002) derleme makalelerinde, *fem* genleri ve diğer faktörleri aşağıda belirtildiği şekilde açıklamışlardır:

FemA*, *FemB* ve *FemX (fmh B), bakteri hücre duvarında glikan zincirlerini birbirine bağlayan pentaglisin çapraz köprülerinin yapımından sorumlu genlerdir. *FemX* birinci glisin'i, *femA* 2. ve 3. glisin'leri ve *femB*'de 4. ve 5. glisin'leri peptide sokmaktadır. *FemA*'nın inaktivasyonu metisiline olan direnci ortadan kaldırırken *femB*'nin inaktivasyonu dirençliliğin seviyesini düşürmektedir. *FemX*'de oluşturulan inaktivasyon ise bakteri için ölümcül etki oluşturmaktadır. ***FemC (glnR)***, bir glutamin sentetaz baskılayıcısıdır. İnaktivasyonu kök peptidin iD-glutamat amidasyonunu azaltır ve metisilin direncinde düşüşle sonuçlanır. ***FemD (femR315)***, bir fosfoglukozamin mutaz'dır. Glukozamin-6-fosfatın glukozamin-1-fosfata dönüşümünü kolaylaştırır. Bu genin inaktivasyonu metisilin direncini düşürür. ***FemE***'nin işlevi tam olarak bilinmemektedir. İnaktivasyonu metisilin direncinde hafif bir düşüşe neden olmaktadır. ***FemF (mure)***, peptidoglikan kök peptide lizinin bağlanmasını katalize eder ve inaktivasyonu ise metisilin direncini düşürmektedir. ***FmtA***, bir membran proteindir. İnaktivasyonu peptidoglikanda çapraz bağlanmanın oluşumunu ve amidasyonunu azaltır ve metisilin direnci düşer. ***FmtB (mrp)***, bir hücre yüzeyi proteindir. Fonksiyonu tam olarak açığa çıkartılmamıştır ancak inaktivasyonunda metisilin direnci düşmektedir. ***FmtC (mprF)***, membrana bağlı bir proteindir. İnaktive edilmesi L-lizin ile fosfatidil-gliserol modifikasyonunu azaltır ve böylece direncin azalmasına neden olur. ***Ilm*** geninin fonksiyonu bilinmemektedir ve inaktivasyonu Triton-X-100 ile indüklenen otolize yol açar ve dirençlilikte düşüş olur. ***SigB*** ise alternatif transkripsiyon faktörüdür ve inaktivasyonu dirençte düşüşle sonuçlanmaktadır. ***Dlt operon***, D- alaninin teikoik asidin içine transferini sağlar. İnaktivasyonu ise metisilin direncini artırmaktadır. ***HmrA***, aminohidrolaz olarak kabul edilmektedir. Aşırı miktarda ekspresyonu metisilin dirençliliğinde artışa neden

olur. **HmrB** ise acyl taşıyıcı protein homologudur. Aşırı miktarda ekspresyonu ise dirençte yükselişe yol açmaktadır. **LytH**, litik enzimlere homoloji gösterir. İnaktivasyonu metisilin direncinin seviyesinde artışla sonuçlanır.

Metisilin dirençliliğine en büyük etkiyi *femA*, *femB* ve *fmbB*'de oluşan mutasyonlar oluşturmaktadır. Bu genler *S. aureus* ve diğer Gram pozitif bakterilerin peptidoglikan tabakasındaki dallı peptid yapısının sentezinde görevlidir. *FemX* (*FmbB*), *femA* ve *femB*, glisin 1, 2-3, ve 4-5'in pentaglisin köprüsüne eklenmesinde sıra ile fonksiyon görürler. PBP2a'da dirençliliği oluşturabilmek için bu pentaglisin yan zincirine gereksinim duyar ve bu yan zincirin kısalması hem beta-laktam grubu antibiyotiklere ve hem de diğer grup antibiyotiklere duyarlılığa yol açar. Bu 3 faktörün işlevlerine alternatif olacak diğer bir mekanizma da bakteride mevcut değildir (Berger-Bachi ve Rohrer, 2002).

Heterojen dirençliliğin derecesinin, sıcaklık, ozmolarite, inkübasyon süresi, pH, ışık, iyon tutucu maddeler, metal iyonları ve beta-laktam antibiyotiklere önceden maruz kalma durumu gibi çevresel faktörlerce etkilendiği bilinmektedir (Sabath ve ark., 1972; Sabath, 1977; Matthews ve Stewart, 1984; Berger-Bachi, 1995; Stapleton ve Taylor, 2002). İnkübasyon sıcaklığının 30-35 °C'ye düşürülmesi ve NaCl konsantrasyonunun artırılması (% 2) metisilin dirençliliğinin ekspresyonunu artırır (Matthews ve Stewart, 1984; Welch ve Southern, 1984; Chambers ve Hackbarth, 1987; Berger-Bachi, 1995) ve heterojen dirençli suşlar homojen dirençli hale geçebilirler (Hartman ve Tomasz, 1986; Hackbarth ve Chambers, 1989; Chambers, 1997). Beta-laktam antibiyotiği içeren ortamlarda dirençliliğin ekspresyonu artar çünkü antibiyotiğe duyarlı alt populasyonlar elimine edilmiş olur ve yüksek dirençli alt populasyonlar seçilmiş olur. Ancak bu durum geçicidir ve suşlar beta-laktam antibiyotik içermeyen ortamlarda üremeye bırakıldığında suşlar tekrar heterojen resistant görünüme dönüşüm yapar (Hartman ve Tomasz, 1984; Hackbarth ve Chambers, 1989). İnkübasyon sıcaklığının 43°C ve pH'nın 5,2 olduğu durum dirençliliği baskılamaktadır (Hartman ve Tomasz, 1984; Hackbarth ve Chambers, 1989). Düşük pH ortamında fenotipik dirençliliğin kayboluşu, PBP2a'nın düşük pH'da stabil kalmaması veya sentezinin gerçekleşmemesine bağlanmaktadır (Hartman ve Tomasz, 1984). İnkübasyon süresinin 18 saatten 24 saate uzatılması dirençli suşların tespitini artırmaktadır (Berger ve Rohrer, 2002).

1.7.Vankomisin Etki Mekanizması

Vankomisin glikopeptid yapısında bir antibiyotik olup, Gram pozitif bakterilerde, hücre duvarı yapısını oluşturan NAM/NAG peptidlerin bakteri membranının dış yüzünde bulunan D-alanin-D-alanin terminal dizilerine bağlanır. Böylece transglükolizasyon ile sonraki prekürsörlerin olgunlaşmamış peptidoglikan zincirine eklenmesini ve transpeptidasyon ile çapraz bağların oluşumu engellenir ve peptidoglikan oluşumu inhibe edilmiş olur (Reynolds, 1989). Vankomisin bakteri sitoplazmasına penetre olamaz. Bu nedenle, ancak bakterinin hücre membranının dış yüzüne prekürsörlerin translokasyonu gerçekleştikten sonra vankomisin hedefi ile ilişkiye girebilmektedir (Courvalin, 2006).

1.8.Vankomisine Dirençlilik Mekanizması

Stafilokok suşlarında vankomisine homojen ve heterojen olmak üzere iki tip direnç söz konusudur. Ayrıca Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) tarafından önerilen Agar-Disk Difüzyon Tekniği (ADDT) inhibisyon zon çapları ve MİK değerlerine göre stafilokoklar, vankomisine tam dirençli ve ara dirençli (duyarlılığı azalmış) suşlar olarak tanımlanmaktadır (CLSI, 2006c).

Hetero-VISA (hVISA) suşları vankomisine genel anlamda duyarlı olup (MİK ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$), MİK değeri 8-16 $\mu\text{g/ml}$ arasında değişen $1/10^6$ CFU oranında ara dirençlilik gösteren bakterilerden oluşan alt popülasyonları içermektedir (Hiramatsu ve ark., 1997b). Ancak 2006'da, CLSI tarafından *S. aureus* için vankomisin MİK değerlerinin bir dilüsyon düşürülmesinden sonra, MİK değeri 4-8 $\mu\text{g/ml}$ olan alt popülasyonları içeren *S. aureus* suşları h-VISA olarak kabul edilmiştir (CLSI, 2006c). İlk tanımlanan VISA suşu olan Mu-3 vankomisin tedavisine yanıt vermeyen Japonya'da pnömonili bir hastanın balgam örneğinden 1997'de izole edilmiş olup h-VISA için prototip olarak kabul edilmektedir (Hiramatsu ve ark., 1997b). ADDT ile yapılan antibiyogramda belirlenemeyen bu suşlardaki azalmış duyarlılığın belirlenmesi Popülasyon Analiz Profili (PAP) olarak bilinen teknik ile yapılmaktadır (Hiramatsu ve ark., 1997b). Hetero-VISA suşlar, **homojen VISA** suşlarının gelişimi için prekürsör olarak kabul edilmektedir (Hiramatsu ve ark., 1997b). Homojen VISA suşları için prototip olarak ise, Japonya'da uzun süre vankomisin tedavisi alan bir

çocuğun sternal apse içeriğinden izole edilen *S. aureus* Mu50 suşu (MİK: 8 µg/ml) kabul edilmektedir (Hiramatsu ve ark., 1997a).

Vankomisine dirençlilik mekanizması hVISA suşlarında, VRSA suşlarından farklılık göstermektedir. Vankomisine duyarlılığın azalması, bakteri hücre duvarı peptidoglikan biyosentezinde oluşan değişikliklerle açıklanmaktadır. VISA suşlarında vankomisine duyarlı suşlara göre daha fazla miktarda peptidoglikan sentezlendiği ve bu yüzden düzensiz şekilli kalınlaşmış hücre duvarına sahip oldukları gösterilmiştir. Ayrıca peptidoglikan zincirlerindeki çapraz bağlanmalarda azalma şekillenmiştir ve D-alanin-D-alanin rezidülerinin sayısında artış olmuştur (Hiramatsu ve ark., 1997a; Hanaki ve ark., 1998; Geisela ve ark., 1999). Bu değişiklikler ‘kapan etkisi’ yapmakta ve vankomisin, fazlaca bulunan bu D-alanin-D-alanin rezidüleri tarafından tutulmasıyla bakteri yüzeyinde birikerek diğer vankomisin moleküllerinin bakteri hücre duvarı sentezinin gerçekleştiği plazmik membrana yakın yerdeki hedef bölgelere ulaşması engellenmiş olmaktadır (Hiramatsu, 2001).

Bu güne kadar tespit edilen VISA suşlarında vankomisine duyarlılığın azalması yukarıda bahsedilen ve transfer edilemeyen dirençlilik mekanizması ile açıklanmıştır. Bu durum genellikle vankomisin ile muamele sonu gelişmektedir ve azalmış duyarlılık fenotipinin vankomisin yokluğunda devamlılığı oldukça zayıftır (Hageman ve ark., 2006).

İlk VRSA suşu 2002’de Michigan’da izole edilmiş olup MİK değeri >32 µg/ml olarak belirlenmiştir (CDC, 2002). VRSA suşlarındaki dirençlilik mekanizması *vanA* geninin varlığı ile açıklanmaktadır ve bu genin *E. faecalis*’ten konjugasyon ile *S. aureus*’a geçtiği belirtilmiştir. Bu *vanA* genini taşıyan VRSA suşlarında, hücre duvarındaki NAM/NAG peptidlerin D-alanin-D-alanin terminal dizilerinin yerini D-alanin-D-laktat dizisi almıştır. Bu değişiklik, düşük dozda vankomisin ile karşılaşıldığında oluşmaktadır. Bu yeni dizinin vankomisine afinitesi, D-alanin-D-alanin’e göre 1000 kat daha düşüktür. Bu nedenle vankomisin bakteri yüzeyinde etkileşime gireceği prekürsörü olmayacağından hücre duvarı sentezine mani olamamakta ve bakteri vankomisine dirençli hal almaktadır (Tenover, 2006).

VRSA suşlarında, *vanA* dirençlilik geninin bulunduğu Tn1546 transpozonunu taşıyan konjugativ karakterde bir plazmid bulunmaktadır (Weigel ve ark., 2003; Tenover ve ark., 2004). VRE (Vancomycin Resistant *Enterococci*)’den *S. aureus*’a

vanA geninin transferi, bu plazmid veya transpozonun konjugasyonu ile gerçekleşmektedir (Weigel ve ark., 2003; Tenover ve ark., 2004; Hageman ve ark., 2006). Vankomisin dirençliliğinden sorumlu genlerin *E. faecalis*'ten *S. aureus*'a transferi ayrıca deneysel olarak *in-vitro* şartlarda gerçekleştirilmiştir (Noble ve ark., 1992). Tn3 transpozon familyasına ait olan Tn1546, 11 kb büyüklüğünde olup 9 adet polipeptidi kodlamaktadır. Bunlar *ORF1*, *ORF2*, *VanR*, *VanS*, *VanH*, *VanA*, *VanX*, *VanY* ve *VanZ* olarak tanımlanmaktadır (Perichon ve Courvalin, 2009; Courvalin, 2006). Perichon ve Courvalin (2009) derleme makalelerinde bu proteinleri aşağıdaki gibi açıklamaktadırlar:

ORF1 bir transpozastır ve söz konusu transpozonun hareketinden sorumludur. ***ORF2*** ise bir resolvazdır ve transpozonun yer değiştirmesini sağlar. ***VanH*** bir dehidrogenazdır ve piruvatı D-laktat'a indirgemektedir. ***VanA*** bir ligaz olup D-alanin-D-alanin dipeptidin yerini alan D-alanin-DiLaktat depsipeptidin oluşumunu sağlar. ***VanX*** bakteri kromozomundaki D-alanin-D-alanin ligaz tarafından oluşturulan D-alanin-D-alanin dipeptidi hidrolize eder. ***VanY* (D,D-carboxypeptidaz)** ise eğer D-alanin-D-alanin'in eliminasyonu *VanX* tarafından tamamlanamaz ise pentapeptid prekürsörlerin terminal D-alanin rezidülerini hidrolize eder. ***VanR/VanS*** indüklenebilir *vanA* tip dirençliliğin regülasyonundan sorumludur. Glikopeptid varlığında dirençlilik genlerinin ekspresyonunu kontrol eden 2 proteindir (Perichon ve Courvalin, 2009).

Bu güne kadar toplam 11 *vanA* tip MRSA suşu izole edilmiş olup 7 adet Michigan, 1 adet Pennsylvania ve 1 adet New York eyaletinden olmak üzere 9'u Amerika Birleşik Devletleri'nde, diğer ikisi de Hindistan ve İran'da izole edilmiştir. (Perichon ve Courvalin, 2009). Bu suşların İran suşu hariç 10'unda *vanA* geninin taşındığı plasmidin varlığı ortaya konmuştur. Bu 10 suşun izole edildiği 10 vakanın 1'i hariç 9'unda aynı hastadan VRSA ile beraber VRE'de izole edilmiştir. (Perichon ve Courvalin, 2009).

KNS'ların glikopeptid antibiyotiklere karşı geliştirdikleri direnç mekanizması VISA ve hetero-VISA izolatları ile benzerlik göstermektedir (Biavasco ve ark., 1991; Biavasco ve ark., 2000). Nunes ve ark. (2006), insan klinik vakalarından izole ettikleri glikopeptidlere azalmış duyarlılığa sahip *S. haemolyticus*, *S. warneri* ve *S. epidermidis* suşlarını PAP metodu ile dirençlilik durumunu ve geçirirli elektron

mikroskop ile hücresel yapısını incelemiştir. Sonuçta, suşların yüksek vankomisin ve teikoplanin konsantrasyonlarında üreyebilen alt populasyonlarının olduğunu ve bu alt populasyondaki bakterilerin hücre duvarlarının parental bakteriye göre daha kalın olduğunu göstermiştir. Ayrıca çalışmalar, *S. haemolyticus* suşlarının diğer KNS türlerinin suşlarına göre daha yüksek MİK değerine ve daha yüksek oranda ara dirençliliğe sahip olduğunu göstermektedir (Fridkin, 2001; Nunes ve ark., 2006).

Van A tip dirençlilik glikopeptidlerce indüklenebilmektedir. Ortamda antibiyotik olmadığında dirençlilik mekanizması aktive edilmemekte, vankomisin varlığında ise dirençlilik mekanizması aktive olmaktadır. Dirençliliğin fenotipik olarak ortaya çıkışındaki geçikme, D-laktat ile biten peptidoglikan prekürsörlerinin sentezi ve *VanX* ve *VanY*'nin sıra ile aktivasyonu ile duyarlılık mekanizmasının eliminasyonu için gerekli zamana denk düşmektedir. (Perichon ve Courvalin, 2009).

VanA tip dirençlilik, enterokoklarda en sık rastlanılan glikopeptid dirençliliği olup bu güne kadar stafilokoklarda sadece *vanA* tip vankomisin dirençliliği tespit edilmiştir. *VanA* gen grubu temel olarak *E. faecium* ve *E. faecalis*'te bulunmakta olup ayrıca *E. avium*, *E. durans*, *E. raffinosus*'ta ve *E. gallinarum* ve *E. casseliflavus* türlerinin atipik izolatlarında da tespit edilmiştir. Tip A dirençte bakteri hem vankomisin (MİK: 64-100 µg/ml) ve hem de teikoplanine (MİK:16-512 µg/ml) oldukça yüksek seviyelerde dirençlilik göstermektedir (Courvalin, 2006).

Enterokok türlerinde **Van B, Van C, Van D, Van E, ve Van G tipi** vankomisin dirençliliği tanımlanmış ancak stafilokoklarda bildirilmemişlerdir.

1.9.Metisilin ve Vankomisin Duyarlılığının Belirlenmesi

1.9.1.Metisilin Duyarlılık Testleri

1.9.1.1.Agar Tarama Tekniği

Oksasilin agar tarama tekniği, *S. aureus* suşları için duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek olan bir testtir. Bu testte, içerisinde 6 µg/ml oksasilin ve % 4 NaCl içeren Mueller-Hinton Agar (MHA) besiyerinde, 35 °C'de 24 saatlik inkübasyon sonucu bir tek kolonilik üremenin dahi belirlenmesi, suşun metisiline dirençli olduğunu göstermektedir (CLSI, 2008). KNS suşları için inkübasyon süresinin 48 saate çıkarılması önerilmektedir (Chambers, 1997). Ancak CLSI, oksasilin agar tarama

teknikini KNS türlerinde metisilin dirençliliğinin tespiti için uygun görmemektedir (Tenover ve ark., 1999; NCCLS, 1999).

1.9.1.2. Agar-Disk Difüzyon Tekniği (ADDT)

Metisilin dirençliliğinin ADDT ile araştırılmasında 1 µg/ml oksasiline emdirilmiş ticari diskler kullanılmaktadır. İçerisinde % 2 NaCl ilave edilmiş MHA besiyerinde gerçekleştirilen bu test, inhibisyon zon çaplarının ölçülmesiyle değerlendirilen kalitatif sonuç veren bir testtir. Heterojen dirençlilik gösteren suşların kültürleri oksasiline duyarlı suşlara göre daha yavaş çoğaldıklarından, heterojen dirençli suşların dirençli alt populasyonlarının tespitini mümkün kılmak için, ADDT protokolünde inkübasyon sıcaklığının 35 °C'yi geçmemesi ve inkübasyon süresinin 24 saat olması gerektiği CLSI tarafından önerilmektedir (CLSI, 2007).

CLSI (2007) tarafından kabul edilen, *S. aureus* ve KNS suşları için kritik inhibisyon zon çapları birbirinden farklıdır (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Oksasiline için agar-disk difüzyon tekniği kritik inhibisyon zon çapları

<i>Staphylococcus</i> spp.	Oksasiline		
	S	I	R
<i>S. aureus</i>	≥ 13 mm	11-12 mm	≤ 10 mm
KNS	≥ 18 mm	n/a	≤ 17mm

R: Dirençli, S: Duyarlı, I: Orta derecede dirençli, n/a: uygulanabilir değil

1.9.1.3. Sefoksitin Disk Difüzyon Tekniği

CLSI tarafından MRSA testi için alternatif bir metot olarak kabul edilmiştir (NCCLS, 2004). Bu test ile sadece *mecA* geni tarafından şekillenen metisilin dirençliliği tespit edilmektedir (Swenson ve ark., 2005). Sefoksitin, *mecA* regülatör sistemini oksasiline göre daha iyi indüklediği ve bu nedenle, *mecA* geni tarafından oluşturulan dirençliliğinin belirlenmesinde diğer testlere göre daha yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu bildirilmektedir (Swenson ve ark., 2005; CLSI, 2007). Testin, özellikle KNS izolatlarında metisilin dirençliliğinin belirlenmesinde oksasiline agar-disk difüzyon tekniğine göre daha yüksek düzeyde doğru sonuç verdiği bildirilmektedir (Swenson ve ark., 2005). Sefoksitin disk difüzyon tekniğinde, CLSI

tarafından *S. aureus* ve KNS suşları için kabul edilmiş kritik inhibisyon zon çapları birbirinden farklıdır (CLSI, 2007). (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. Sefoksitin ile agar-disk difüzyon tekniği kritik inhibisyon zon çapları

<i>Staphylococcus</i> spp.	Oksasilin		
	S	I	R
<i>S. aureus</i>	≥ 22 mm	n/a	≤ 21 mm
KNS	≥ 25 mm	n/a	≤ 24 mm

R: Dirençli, S: Duyarlı, I: Orta derecede dirençli, n/a: Uygulanabilir değil

1.9.1.4. Agar Dilüsyon Tekniği

Kantitatif sonuç veren bir metot olup, antimikrobiale etkenin mikroorganizmanın üremesini inhibe etmesi için gerekli olan MİK değerinin belirlenmesini sağlar. Broth dilüsyon metoduna göre avantajları olan bir test olup, aynı anda daha çok suşu test etmeyi sağlar. Ayrıca miks kültür veya heterojen popülasyonların belirlenmesinde kolaylıklar sağlar. En iyi standardize edilmiş test olup, bir çok yeni antibakteriyel etkenin duyarlılık testlerinde referans metot olarak kabul edilmektedir (Hanlon ve ark., 2007).

İçerisindeki oksasilin miktarı 0,25 µg/ml-256 µg/ml arasında değişen ve % 2 oranında NaCl ilave edilmiş MHA besiyerleri hazırlandıktan sonra stafilokok suşunun her bir yoğunluktaki besiyerlerine ekimi yapılır. MİK değeri mikroorganizmanın üremesinin inhibe edildiği ilk petrideki antibiyotik konsantrasyonu olarak kaydedilir (CLSI, 2006b; Hanlon ve ark., 2007).

Ayrıca, 1999 yılına kadar KNS türlerinde oksasilin dirençliliği için kritik MİK değeri *S. aureus* ile aynı, 4 µg/ml ve üzeri, kabul edilirken, 1999'da NCCLS tarafından 0,5 ve üzeri MİK değerine sahip KNS suşları oksasilin dirençli, 0,25 ve daha düşük MİK değeri gösteren KNS suşları ise duyarlı olarak kabul edilmeye başlanmıştır (NCCLS, 2000). *S. aureus* için ise oksasilin dirençliliği için kabul edilen kritik MİK değerlerinde bir değişikliğe gidilmemiştir (Çizelge 1.3).

Çizelge 1.3. Oksasilin için kritik MİK değerleri

<i>Staphylococcus</i> spp.	Oksasilin		
	S	I	R
<i>S. aureus</i>	$\leq 2 \mu\text{g/ml}$	n/a	$\geq 4 \mu\text{g/ml}$
KNS	$\leq 0,25 \mu\text{g/ml}$	n/a	$\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$

R: Dirençli, S: Duyarlı, I: Orta derecede dirençli, n/a: uygulanabilir değil.

1.9.1.5. Broth Makrodilüsyon / Mikrodilüsyon Tekniği

MİK değerinin belirlenmesini sağlayan kantitatif bir test olup, deney tüplerinde gerçekleştirildiğinde makrodilüsyon, mikropleytlerde (96 çukurcuklu) yapıldığında ise mikrodilüsyon tekniği olarak adlandırılmaktadır (Qaiyumi, 2007).

Mikropleytlerde gerçekleştirilen mikrodilüsyon tekniğinin makrodilüsyon tekniğine kıyasla avantajı, çok daha az miktarlarda besiyeri ve oksasilin gerekmesi ve kısa sürede daha fazla suşun test edilmesine olanak sağlamasıdır (Qaiyumi, 2007).

1.9.1.6. Epsilometer Test (E-test)

E-test, MİK değerini belirlemek için yapılan diğer bir metot olup, boylu boyunca giderek artan miktarlarda antibiyotik emdirilmiş olan bir plastik şeritin, bakteri ile inoküle edilmiş agar yüzeyine yerleştirilmesi sonrasında antibiyotiğin agara transferi ile strip altında ve kenar kısımlarındaki agar bölgesinde artan derecelerde antibiyotik yoğunluğu olan bölgelerin oluşturulması temeline dayanmaktadır. Antibiyotiğin agar yüzeyinde oluşan bu değişik yoğunluk dereceleri sabittir ve bu durum 20 saat kadar devamlılığını sürdürür. Sabit antibiyotik yoğunlukları, düşük derece dirençliliği, heterodirençliliği ve dirençli alt populasyonları ortaya çıkarmak için yoğun bakteri süspansiyonlarının testte kullanılmasına olanak sağlar. Antibiyotik yoğunluklarının difüzyon ile değil önceden oluşturulmuş olması, antibiyotiğin moleküler yapısının testin performansına etkisini ortadan kaldırmaktadır. İnkübasyon süresi sonunda, elips şeklindeki inhibisyon alanının şeriti kestiği konsantrasyon MİK olarak kaydedilir (Wagner, 2007; CLSI, 2008).

1.9.1.7.Otomize Sistemler

Ticari firmalar tarafından geliştirilmiş olan bu otomize sistemlerin, antibiyotik duyarlılık testlerini kısa sürede daha güvenilir olarak gerçekleştirebilme avantajları vardır ve uygulayıcı hatalarını en aza indirmektedir (Stuckey, 2007; Howe, 2010) . Bu alanda üç adet sistem bulunmaktadır. Bunlar Dade Microscan, Biomerieux Vitek ve Becton Dickinson Phoenix sistemleridir (Stuckey, 2007; Howe, 2010). Otomize sistemlerin geleneksel MİK belirleme testlerinin sonuçları ile uyumluluğu % 95'in üzerindedir. Bu üç sistem genel olarak benzer performansa sahiptir ve hata payları % 5'in altındadır (Howe, 2010).

1.9.1.8.Lateks Aglutinasyon Testi

Uygulaması basit ve hızlı sonuç veren bir test olup klinik laboratuvarlarında kullanılabilecek bir testtir. Bu test, stafilokok suşlarının ürettiği PBP2a' yi belirlemek için geliştirilmiştir (Nakatomi ve Sugiyama, 1998). Test, dirençli stafilokok suşlarının hücre membranında bulunan PBP2a'nın alkali uygulaması ile ekstrakte edilmesini takiben PBP2a'ya karşı üretilmiş ve lateks partikülleri ile kaplanmış monoklonal antikorlar ile aglutine edilmesi prensibine dayanmaktadır (Nakatomi ve Sugiyama, 1998).

1.9.1.9.Kromojenik Teknikler

Bu tekniklerin prensibi, metisilin dirençli stafilokokların tespitinde kromojenik enzimatik substratı içeren kromojenik besiyerinin kullanımına dayanmaktadır (Sancak, 2007). Kromojenik besiyerlerinin temel mekanizması, besiyerine katılmış olan kromojenik substratın moleküler yapısının, hedeflenen bakteri tarafından sentezlenen bir enzimle kesilmesi suretiyle kromojenin insoluble hale gelmesi ve bakteri duvarının içinde kalarak koloninin özgün renk alması esasına dayanır (RSHM, 2010). Klinik materyallerden PCR ile direk tespitinin mümkün olmadığı klinik laboratuvarlarında, MRSA'nın belirlenmesinde yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip olan alternatif bir teknik olarak kullanılabilmektedir (Karthy ve ark., 2009).

1.9.1.10. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR, 1983’de Kary Mullis tarafından geliştirilmiş olup DNA replikasyon mekanizmasının kullanılarak belirli bir DNA bölgesinin *in-vitro* çoğaltılması prensibine dayanmaktadır (Mullis, 1990; Winn ve ark., 2006).

Standart PCR reaksiyonu, çoğaltılması istenen hedef DNA ile master miks karışımından oluşmaktadır. Master miks oligonükleotid DNA primerlerini, 4 adet nükleotid trifosfat’ı, sıcaklığa dayanıklı DNA polimerazı, magnezyum klorür ($MgCl_2$) ve su veya bufferi ihtiva etmektedir. PCR, sırasıyla DNA denatürasyonu (DNA’nın çift iplikçığının ısı ile birbirinden ayrılması), primer bağlanması (primerlerin çoğaltılacak bölgenin uçlarındaki kendilerine has bölgeleri tanıyıp hidrojen bağları kurarak bağlanması) ve primer uzaması (DNA polimeraz enzimi tarafından primerlerin 3’ ucuna, kalıp DNA’ya uygun nükleotidlerin eklenerek DNA sentezlenmesi) basamaklarının oluşturduğu bir döngünün defalarca tekrarlanmasından ibarettir (Winn ve ark., 2006). Böylece primerler arasında kalan hedef bölgenin çok sayıda kopyası sentezlenmiş olur. Çoğaltılan DNA parçalarında agaroz jel elektroforez gibi metotlarla görüntülenmektedir (Winn ve ark., 2006).

MecA geninin varlığı, stafilokok suşunu metisilin dirençli stafilokok olarak tanımlamamıza yeterli olmaktadır (Brown, 2001; Gradelski ve ark., 2001) ve PCR ile *mecA* geninin varlığının ortaya konması altın standart olarak kabul edilmektedir (Chambers, 1997; Swenson ve ark., 2001; Brown ve ark., 2005).

1.9.2.Vankomisin Duyarlılık Testleri

1.9.2.1.Fenotipik Testler

Antibiyotik dirençliliğinin belirlenmesinde standart olarak kullanılan testlerin tümü ile stafilokoklarda vankomisin dirençliliğini belirlemek mümkün olmamaktadır (CLSI, 2006c).

VISA suşlarının belirlenmesinde ADDT yetersiz kalmaktadır (CLSI, 2006c). ADDT için CLSI sadece duyarlılık için inhibisyon zon çapını belirlemiş olup, 15 mm ve daha geniş inhibisyon zon çapı oluşturan suşlar duyarlı kabul edilmektedir (CLSI, 2006c). Standardizasyon oluşturacak sayıda VRSA ve VISA suşu henüz test edilmemiş olması, orta derecede duyarlılık ve tam dirençlilik için zon çapı sınırları

oluşturulamamasına neden olmuştur (CLSI, 2006c). VISA suşlarının belirlenmesinde broth mikrodilüsyon tekniği, agar dilüsyon tekniği, ve E-test (0,5 McFarland Standard inokulum kullanılarak) gibi otomize olmayan MİK metotları CLSI tarafından kabul edilmiş olan metodlardır. Otomize metotlar ve vankomisin agar tarama tekniği, MİK değeri 8 µg/ml olan VISA suşlarını genellikle belirleyebilse de 4 µg/ml MİK değerine sahip olan VISA suşlarının tespitinde yetersiz kalmaktadır. Bu suşların belirlenmesinde otomize olmayan bir MİK metodunun kullanılması gerekmektedir (CLSI, 2006c).

VRSA suşlarının belirlenmesinde ise broth mikrodilüsyon tekniği, agar dilüsyon tekniği, E-test, Microscan overnight ve Synergies plus, BD Phoenix System, TREK Sensititre MIC Plate, Vitek2 System, agar-disk difüzyon tekniği (30 µg/ml) ve 6 µg/ml vankomisin içeren Brain Heart Infusion Agar (Beyin Kalp İnfüzyon Agar, BHIA) ile yapılan vankomisin agar tarama tekniği, CLSI tarafından kabul edilmiş tekniklerdir (CLSI, 2006c). ADDT, sadece *vanA* tarafından oluşturulan tam dirençli suşları belirleyebilmekte ve bu suşların etrafında inhibisyon zonu oluşmamaktadır. Ancak, ADDT tam dirençli KNS suşlarında belirleyememektedir (CLSI, 2010).

Vankomisin dirençliliğinin belirlenmesinde, agar-disk difüzyon tekniğini kullanan laboratuvarların, bu teste ilaveten VISA suşlarının gözden kaçırılmaması için ikinci bir testi kullanmaları gerektiği CLSI tarafından önerilmektedir (CLSI, 2006c).

Çizelge 1.4. Vankomisin için kritik MİK değerleri

<i>Staphylococcus</i> spp.	Vankomisin		
	S	I	R
<i>S. aureus</i>	≤2µg/ml	4-8µg/ml	≥16µg/ml
KNS	≤4µg/ml	8-16µg/ml	≥32µg/ml

R: Dirençli, S: Duyarlı, I:Orta derecede dirençli

Popülasyon Analiz Profili (PAP) olarak adlandırılan teknik, VISA ve h-VISA suşlarının belirlenmesinde altın standart olarak kabul edilmektedir. Vankomisin tarama agarda üreyen stafilokok kolonileri, 24 saat 37 °C’de beyin-kalp infüzyon sıvı besiyerinde (BHIB) inkübe edilir. Ardından bulanıklığı 0,5 McFarland ayarlanarak kullanılacak bakteri süspansiyonu elde edilir. Bu süspansiyondan içerisindeki vankomisin yoğunluğu 1 µg/ml ile 16 µg/ml arasında değişen BHIA

ekim yapılır. Petrilerin 37 °C’de 48 saat inkübasyon sonrası oluşan koloniler sayılır ve bunlara karşılık gelen vankomisin konsantrasyonları grafik üzerinde çizilir. Vankomisin konsantrasyonlarına uygun koloni sayılarının logaritmik grafiği yapıp sözkonusu suş için eğri altında kalan alan (AUC) hesaplanır. Aynı anda kontrol suşlarında test edilir. Daha sonra her bir suşun PAP-AUC değeri, kontrol suşunun PAP-AUC değerine oranlanır. Bu işlem sonucunda $\leq 0,90$ bulunanlar vankomisin duyarlı, $0,90-1,3$ arasındakiler heterojen VISA ve $\geq 1,3$ olanlar da VISA olarak kabul edilir (Wootton ve ark., 2001). PAP, mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin uygulamadan çok hVISA prevalansını saptamak amacıyla epidemiyolojik araştırmalarda kullanılmaktadır (Sancak, 2007).

1.9.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Stafilokoklarda vankomisin dirençliliğinden sorumlu gen olan *vanA* geni, bu güne kadar izole edilen VRSA suşlarında PCR ile varlığı ortaya çıkartılmıştır (Perichon ve Courvalin, 2009). Stafilokoklardaki *vanA* geninin enterokok kökenli olmasından dolayı, VRE suşlarında tespit edilen *vanA* genine spesifik primerler üretilerek, VRSA suşlarının tespitinde kullanılmıştır (Hanaki ve ark., 1998; Weigel ve ark., 2007; Zhu ve ark., 2008). Bu güne kadar hayvanlardan *vanA* geni taşıyan bir VRSA suşuna rastlanmamıştır. Turkyılmaz ve ark. (2010), sığır mastitis vakalarından izole ettikleri vankomisine duyarlılığı azalmış 7 *mecA* pozitif MRSA suşuna *vanA* geni için PCR testi uygulamış ancak *vanA* genine bu suşlarda rastlanmamıştır.

1.10. Stafilokokkal Mastitis

1.10.1. Epidemiyoloji

Stafilokok türleri, Türkiye’de ve dünyanın değişik bölgelerinde sığırların mastitis vakalarından sorumlu olan en yaygın etiyolojik etkenlerden biridir (Arda ve İstanbulluoğlu, 1979; Mc Donalds, 1979; Tenhagen ve ark, 2006; Olde Riekerink ve ark., 2008; Pyörala ve Taponen, 2009). En patojen tür olarak bilinen *S. aureus*’un oluşturduğu mastitis, hem akut (gangrenli mastitis) hem de subklinik formda gelişebilmekte, çoğunlukla tedaviye düşük düzeyde cevap vermekte ve kronik forma dönüşmektedir (Fox ve Gay, 1993; Sol ve ark., 2000; Akan, 2006). *S. aureus* ile

birlikte koagülaz pozitif olan diğer iki tür olan *S. intermedius* ve *S. hyicus* ise daha düşük sıklıkta mastitise yol açmaktadırlar (Roberson ve ark., 1996; Capurro ve ark., 1999; Vural ve ark., 1999). Ancak rutin laboratuvarlarında, genellikle tüm KPS suşları *S. aureus* olarak rapor edilmektedir. KNS türleri ise çoğunlukla hafif seyirli ve subklinik mastitis oluşturduğu için mastitis etkeni olarak önemsiz kabul edilmekte iken, son yıllarda yapılan çalışmalarla KNS türlerinin prevalansında artışların olduğu görülmekte ve bu yüzden önemli mastitis patojeni olarak kabul edilmesi gerektiği vurgulanmaktadır (Benites ve ark., 2002; Pitkala ve ark., 2004; Sampimon ve ark. 2007; Taponen ve Pyörala, 2009; Nam ve ark., 2010). Şu ana kadar 10'dan fazla KNS türü mastitis vakalarından izole edilmiş olup, *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, ve *S. simulans* en yaygın olan türlerdir (Waage ve ark., 1999; Taponen ve ark., 2006; Gillespie ve ark., 2009; Pyöral ve Taponen, 2009). *S. hominis*, *S. xylosus*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. sciuri*, *S. auricularis*, *S. capitis*, *S. cohnii* subsp. *cohnii*, *S. saprophyticus* ve *S. lentus*'unda mastitisli sütlerden izole edildiği rapor edilmiştir (Hogan ve ark., 1987; Waage ve ark., 1999; Kırkan ve ark., 2005; Taponen ve ark., 2006; Gillespie ve ark., 2009). Ancak rutin tanı laboratuvarlarında KNS'ların tür ayırımına gidilmemektedir.

1.10.2.Tedavi Güçlüğü

S. aureus nedenli mastitislerin tedavi güçlüklerinin başında, etkenin içinde bulunduğu ve konakçı immun sisteminden korunduğu mikroapselerin şekillenmesidir. Yeterli konsantrasyonda antibiyotikler meme dokusuna ulaşsa dahi bu apse duvarını geçerek etkeni öldüremezler (Petersson-Wolfe ve ark., 2010). Bir diğer güçlük ise, konakçının nötrofilleri tarafından fagozite edilen *S. aureus*'un nötrofil içinde inaktif hale geçmesi sonu nötrofil tarafından öldürülememesidir. Ancak nötrofil yaşam süresini tamamladığında ise bakteri dışarı çıkmakta ve yeniden aktif hale gelip çoğalarak enfeksiyonun devam etmesine neden olmaktadır (Petersson-Wolfe ve ark., 2010).

Diğer bir neden de, stafilokoklarda değişik mekanizmalar ile antibiyotiklere dirençliliğin gelişmesi olup tüm beta-laktam antibiyotiklere dirençli oldukları kabul edilen metisilin dirençli stafilokoklardan kaynaklanan mastitisler tedavisi güç vakalar oluşturmaktadır (Lüthje ve Schwarz, 2006; Turkyilmaz ve ark., 2010). Ayrıca bazı

beta-laktam antibiyotiklerle yapılan tedavi sırasında *S. aureus*'un L-formlarının gelişebilmesi de tedavideki başarısızlıkların nedenlerinden olabilmektedir (Owens, 1987).

S. aureus kaynaklı mastitislerde hem parenteral hemde meme içi antibiyotik uygulamaları önerilmektedir (Pyörala, 2006). KNS'lerden kaynaklanan mastitislerde genellikle meme içi antibiyotik uygulamaları yeterli olabilmekte ve tedavi süresi daha kısa olmaktadır (Pyörala, 2006; Taponen ve Pyörala, 2009). Diğer taraftan, KNS suşlarının *S. aureus* suşlarına göre daha yüksek oranda dirençlilik geliştirme eğiliminde oldukları ve ayrıca çoklu antibiyotik dirençliliği KNS'larda daha kolay geliştiği bildirilmektedir (Schlegelová ve ark., 2002; Pitkala ve ark., 2004; Taponen ve Pyörala, 2009).

1.10.3. Metisilin Dirençliliği

Sığır mastitis vakalarından izole edilen ilk MRSA suşu 1972'de Devriese ve ark. (1972) tarafından Belçika'da bildirilmesinin ardından değişik ülkelerde yapılan çalışmalarla özellikle MRSA varlığı ortaya konmuştur. Moon ve ark. (2007), Kore'de sığır mastitis vakalarından izole ettikleri 835 *S. aureus* suşunun 21'inin metisiline dirençli olduğunu fenotipik metotlarla göstermiştir ve 13'ünde *mecA* geninin varlığını tespit etmiştir. Kaszanyitzky ve ark. (2004), Macaristan'da MRSA'nın varlığını, iki çiftlikten izole ettiği ve PCR ile *mecA* geninin varlığını gösterdiği 5 *S. aureus* suşu ile rapor etmiştir. Virgin ve ark. (2009), Amerika Birleşik Devletleri'nde ülke çapında süt toplama tanklarından yaptıkları örnekleme sonucu, MRSA'nın varlığını PCR ile doğrulayarak rapor etmişlerdir. Güneybatı Almanya'da, Spohr ve ark. (2010) tarafından mastitis problemlili 3 sürüde, fenotipik testler ve PCR ile doğrulama sonucunda, MRSA oranının % 5,1-16,7 arasında olduğu rapor edilmiştir. Stastkova ve ark. (2009), Çekoslovakya'da 2 çiftlikte PCR ile 18 MRSA suşunu tanımlamıştır. Vanderhaeghen ve ark. (2010), Belçika'da mastitis problemlili 118 çiftlikte, sürü bazında MRSA prevalansını PCR ile % 10 olarak, sürü içi prevalansı da % 0-7,4 arasında belirlemişlerdir. Hindistan'da yapılan bir çalışmada, metisilin dirençliliği fenotipik olarak % 10,2 oranında bulunurken, PCR ile fenotipik dirençli suşların % 77'sinin *mecA* geni taşıdığı gözlemlenmiştir (Kumar ve ark., 2010). Türkiye'de mastitisli inek sütlerinden izole edilen *S. aureus*

suşlarında metisilin dirençliliğinin fenotipik metotlarla belirlendiği çalışmalarda, Erzurum bölgesinde % 8,7 (Kireççi ve Çolak, 2002), Aydın bölgesinde % 60 (Kırkan ve ark., 2005), Burdur bölgesinde % 17,5 (Türütoglu ve ark., 2006), KNS suşlarına ilişkin ise Erzurum bölgesinde % 1,6 (Kireççi ve Çolak, 2002); Aydın bölgesinde % 73 (Kırkan ve ark., 2005), Burdur bölgesinde % 22,8 (Türütoglu ve ark., 2006) ve Afyonkarahisar bölgesinde % 58,9 (Şeker ve Özenç, 2010) olarak belirlenmiştir. Sareyyüpoğlu ve ark. (2006), Ankara'nın Polatlı, Çubuk ve Haymana ilçelerindeki mastitisli sığırlardan izole ettiği *S. aureus* suşlarında ADDT ile fenotipik metisilin dirençliliğini sırasıyla % 31,8; % 58,6 ve % 0 olarak belirlerken, suşlardaki *mecA* geni varlığını ise sırasıyla % 31,8; % 31 ve % 3,1 olarak rapor etmiştir.

Gerek insanlardan izole edilen gerekse hayvanlardan izole edilen MRSA suşlarının, tüm beta-laktam grubu antibiyotiklere dirençli oldukları gibi diğer grup antibiyotiklere de (makrolidler, aminoglikozidler, tetrasiklinler ve fluorokinolonlar gibi) daha yüksek oranda dirençli oldukları bildirilmektedir. (Ünal, 1996; Vanderhaeghen ve ark., 2010). Türkiye'de Turkyilmaz ve ark. (2010), test ettikleri mastitisli ineklerden elde edilmiş 16 MRSA'nın eritromisin, klindamisin, kloramfenikol, gentamisin, tetrasiklin, siprofloksasin ve vankomisin için dirençliliklerinin fenotipik olarak % 100; % 100; % 100; % 100; % 93,75; % 83,75 ve % 43,75 olarak belirlemiştir.

Lee (2003), sığır dahil çeşitli çiftlik hayvanlarından izole ettiği MRSA suşları ile insan kökenli MRSA suşları arasında yakın benzerlik olduğunu göstermiş ve insanların bu hayvanlardan elde edilen MRSA ile kontamine gıdalar vasıtasıyla enfekte olduklarını ileri sürmüştür. Ancak, sığır mastitis kökenli MRSA'nın insan ve hayvanlar arasında geçtiği ilk kez Kaszanyitzky ve ark. (2007) tarafından rapor edilmiştir. Çalışmalarında, mastitisli ineklerden izole edilen MRSA ile bu hayvanlarla temasta bulunan çiftlik çalışanlarından izole edilen MRSA suşunun fenotipik ve genotipik olarak birbirinden ayırt edilemez olduğu gösterilmiştir (Kaszanyitzky ve ark., 2007). Türkiye'de yapılan bir çalışmada, Turutoglu ve ark. (2009) mastitisli sütlerden izole edilen 3 MRSA suşunun *mecA* geninde yapılan dizi analizi sonucunda insan kökenli MRSA suşlarıyla sadece 757. nükleotidinin değişik olması dışında aynı olduklarını belirtmişlerdir.

1.10.4.Vankomisin Dirençliliği

Dünya genelinde değişik ülkelerde yapılan çeşitli çalışmalarda, sığır mastitis vakalarından izole edilmiş stafilocok türlerinde vankomisine dirençlilik tespit edilmemiştir (Pereira ve Siqueira-Júnior, 1995; Huber ve ark., 2010; Kumar ve ark., 2010). Ancak bazı doğal olarak gelişen sığır kökenli *S. aureus* ST151 mutantının diğer suşlara göre vankomisin dirençlilik genini Enterokok türlerinden kabul etmede daha duyarlı olduğu gösterilmiş ve bu nedenle vankomisin dirençli *S. aureus* suşlarının gelişebileceği belirtilmiştir (Guinane ve ark., 2008). Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda, vankomisine fenotipik olarak dirençli bulunan suşlar bildirilmiştir (Shi ve ark., 2010). Shi ve ark. (2010), ADDT ile vankomisin dirençliliğinin mastitisli sütlerden izole edilmiş *S. aureus* suşlarında % 58,31 oranında belirlemişlerdir. Turkyılmaz ve ark. (2010), test ettikleri sığır mastitis vakalarından izole ettikleri MRSA suşlarında, fenotipik olarak vankomisine duyarlılığı azalmış olanlarına rastlamışlardır.

Bu tez çalışmasında, Burdur bölgesindeki süt sığırları işletmelerindeki mastitisli sığır meme loblarından toplanan süt örneklerinden izole edilen stafilocok suşlarının metisilin ve vankomisin için dirençlilik durumlarının fenotipik ve genotipik metotlar kullanarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Türkiye’de sığır mastitis vakalarından izole edilen suşlarda metisilin dirençliliğinin fenotipik ve genotipik olarak araştırılması birkaç çalışma ile sınırlı olup, bu tez çalışması ilave bilgi sağlaması açısından önemlidir. Diğer taraftan, mastitis kökenli stafilocok suşlarında vankomisin dirençliliğinin genotipik olarak araştırılmış olması bu konudaki ilk çalışmalardandır. Ayrıca, *S. aureus* suşlarına ilave olarak KNS suşlarını da içeriyor olması ve metisilin ve vankomisin dirençliliğinin genotipik olarak KNS suşlarında da araştırılmış olması çalışmanın önemini arttırmaktadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Örnekler

Bu tez çalışması kapsamında, Mayıs 2009 ve Eylül 2009 tarihleri arasında, Burdur ili merkez ve çevre köylerinde ziyaret edilen sığır işletmelerine ait laktasyondaki ineklerden alınan süt örnekleri ve bölge veteriner hekimleri tarafından Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarına mastitis şüphesi nedeniyle getirilen süt örnekleri materyal olarak kullanıldı. Bu kapsamda, klinik mastitis bulguları gösteren ve Kaliforniya Mastitis Testi (CMT) ile subklinik mastitisli olduğu belirlenen 57 işletmeye ait, laktasyondaki toplam 107 sığırın 306 meme lobundan alınan süt örnekleri incelendi. Süt örneklerinin 121'i klinik mastitisli, 185'i ise subklinik mastitisli meme lobundan toplandı. Süt örnekleri, meme başları temizlenip % 70'lik alkol ile silindikten sonra bir miktar boşa sağılmasının ardından en az 5 ml olacak miktarda steril tüpler içine sağılarak alındı. Süt örneklerinin sahada toplanmasını takiben 2 saat içinde soğuk şartlarda laboratuvara nakledildi.

2.1.2. Referans Suşlar

Çalışmada kontrol amacıyla, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan sağlanan 2 *S. aureus* referans suşu (ATCC 43300, ATCC 700699) ve 1 *E. faecalis* kanatlı suşu; Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan sağlanan 1 *S. aureus* suşu (ATCC 25923) ve Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda sığır mastitis vakasından izole ve identifiye edilen 1 *Echerichia coli* ve 1 *S. epidermidis* suşu kullanıldı.

2.1.3. Solüsyonlar

Karbonhidrat Solüsyonları (glukoz, fruktoz, ksiloz, laktoz, maltoz, mannitol, mannoz, N-asetil glukozamin, raffinöz, sükroz, trehaloz) (Merck, A.B.D.).

Fizyolojik Tuzlu Su

Hidrojen Peroksit Solüsyonu (% 3) (H_2O_2)

Taze tavşan plazması ve liyofilize EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid)'lı tavşan plazması (Bactident Coagulase, Merck, A.B.D.).

Alfa-naphtohol (% 5) (Pancreac Sintesis, E.U.)

Potasyum Hidroksit (KOH) (% 40)

CMT (Kaliforniya Mastitis Testi) Solüsyonu

Sodyum Klorid (Dizdarer Kimyevi Mad., Ankara)

Brom-Kreosol Moru (Fluka, İsviçre)

ONPG diski (O-nitrophenyl- β -D-galactopyranosidase, 100 μ g)(Becton, Dickinson and Company, A.B.D.)

2.1.4. Besiyerleri

Blood Agar Base (Oxoid, İngiltere)

Tryptic Soy Broth (TSB) (Merck, A.B.D.)

Nutrient Broth (NB) (Oxoid, İngiltere)

BBL Mueller Hinton II Agar (MHA) (Becton, Dickinson and Company, A.B.D.)

Oksidasyon/ Fermentasyon (O/F) Basal Medium (Merck, A.B.D.)

Methyl-Red / Voges-Proskauer (MR-VP) Medium (Oxoid, İngiltere)

Mannitol Salt Agar (MSA)(Oxoid, İngiltere)

Urea Broth Base (Lab M, İngiltere)

Peptone (Difco, U.S.A.)

2.1.5. Antibiyotik Diskleri

Oxacillin (OX1) (1,0 μ g) (Bioanalyse, Türkiye)

Vancomycin (VA30) (30 μ g) (Bioanalyse, Türkiye)

Teicoplanin (TEC30) (30 μ g) (Bioanalyse, Türkiye)

Polymixin (PB300) (300 units) (Bioanalyse, Türkiye)

Novobiocin (NV30) (30 μ g) (Bioanalyse, Türkiye)

Amoxycillin / Clavulanic Acid (AMC30) (20/10 μ g) (Oxoid, İngiltere)

2.1.6. Antibiyotikler

Oksasilin (Sigma, A.B.D.)

Vankomisin (Lek Pharmaceuticals, Slovenya)

2.1.7. DNA Ekstraksiyonu, PCR ve Elektroforez İşlemlerinde Kullanılan Kit, Buffer, Solüsyon ve Primerler

DNA Ekstraksiyon Kiti (Macherey-Nagel, Almanya)

EDTA (Bioshop, Kanada)

Lizostafin (Sigma, A.B.D.)

Tris-Cl (Amresco, A.B.D.)

Triton X-100 (Sigma, A.B.D.)

Nuclease Free H₂O (Fermentas, Litvanya)

Tris-borate-EDTA Buffer 0,5X (TBE Buffer 0,5X) (AppliChem, Almanya)

Ethidium Bromid

Agaroz (Basica Le Agarose, Prona, Fransa)

PCR Master Mix (2X) (Fermentas, Litvanya)

Recombinant Tag DNA Polymerase in reaction buffer	0,05 Units/ μ l
MgCl ₂	4 mM (milimol)
dATP	0,4 mM
dCTP	0,4 mM
dGTP	0,4 mM
dTTP	0,4 mM

Loading Dye (Yükleme Boyası) (Fermentas, Litvanya)

Tris-HCl (pH 7,6)	10 mM
Bromophenol blue	% 0,03
Xylene cyanol FF	% 0,03
Glycerol	% 60
EDTA	60 mM

DNA ladder (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, Fermentas, Litvanya)

DNA ladder, 100-3000 base pair (bp)	50 μ g
Tris-HCl (pH 7,6)	10 mM
EDTA	1 mM

Primerler:

Çalışmada ticari olarak (Thermo Scientific, Germany) sentezlettirilen aşağıdaki primerler kullanıldı.

Hedef gen	Primer nükleotid dizilimi	Amplikon Boyutu (bp)	Referans
<i>mecA</i>	Forward 5'-CCT AGT AAA GCT CCG GAA-3' Reverse 5'- CTA GTC CAT TCG GTC CA-3'	314 bp	Choi ve ark., 2003
<i>vanA</i>	Forward 5'-CAT GAA TAG AAT AAA AGT TGC AAT A-3' Reverse 5'- CCC CTT TAA CGC TAA TAC GAT CAA-3'	1030 bp	Clark ve ark., 1993

2.1.8. DNA Ekstraksiyonu, PCR, Elektroforez ve Görüntülemede Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar

Elektroforez güç kaynağı (Serva, Blue Power 500, Almanya)

Jel elektroforez cihazı (Thermo Electron Corporation, A.B.D.)

Isıtıcı blok (Techne Dri-Block DB-2D, İngiltere)

Hassas terazi (Scaltec sbc41, Almanya)

Soğutmalı santrifüj (Hettich Zentrifugen, Universal 32R, Almanya)

Steril kabin (Bioair Instruments, Aura 2000, M.A.C., İtalya)

Thermal cyclers (Biometra, Almanya)

UV transillüminatörlü bilgisayarlı görüntüleme sistemi (Genius, Bio Imaging System, Syngene, İngiltere)

Vorteks (Finepcr, Kore)

2.2. YÖNTEM

2.2.1. İzolasyon ve İdentifikasyon

Süt örnekleri vortekslendikten sonra 50 µl'si alınarak % 7'lik koyun kanlı agar (Oxoid, İngiltere) besiyerlerine ekildi. Üreyen bakteriler ilk olarak koloni özellikleri yönünden incelendi ve 1-2 mm çapında, düzgün yüzeyli, beyaz-sarı kolonilerden Gram boyama yapıldı. Işık mikroskobu altında, Gram pozitif kok görünümde olan ve kümeler oluşturan bakterilerin görüldüğü kolonilerden pasajlar yapıp saf kültürler elde edildi. İzole edilen şüpheli suşların identifikasyonu amacıyla aşağıda belirtilen testler yapıldı (Koneman ve ark.,1988; Arda, 2000; Winn ve ark., 2006).

Glukoz ile Oksidasyon/Fermentasyon Testi

Öncelikle, ticari O/F besiyerinden (Merck, A.B.D.) 11,0 g (gram) tartıp 900 ml distile su içinde çözdürüldü ve otoklavlanarak steril edildi. Besiyerinin 50 °C'ye kadar soğutulmasının ardından steril % 10'luk glukoz çözeltisinden 100 ml ilave edildi ve iyice karışması sağlandı. Ardından, steril tüplere 5 ml olacak şekilde dağıtıldı ve katılaşması için oda sıcaklığında beklendi.

Her bir bakteri suşu, 2 adet tüpteki O/F besiyerine iğne uçlu öze ile girilerek ekildi ve tüplerden birindeki besiyerinin üzeri ekimden hemen sonra 1 cm (santimetre) kalınlığında eritilmiş steril parafin ile kapatıldı. Her iki tüp 37 °C'de aerobik şartlarda 2 hafta süreyle inkübasyonda tutuldu ve her gün kontrol edildiler. Her iki tüpte besiyerinin renginin yeşilden sarıya dönmesi pozitif olarak kabul edildi (Winn ve ark., 2006).

Katalaz Testi

Bir öze ile koloninin orta kısmından bir miktar alınıp temiz bir lam üzerinde 1 damla % 3'lük H₂O₂ ile karıştırılmasını takiben gaz kabarcıklarının çıkması pozitif olarak kabul edildi (Arda, 2000; Winn ve ark., 2006).

Koagülaz Testi

Lam Koagülaz Testi

Temiz bir lam üzerinde 1 damla steril distile su ile koloni materyalinin yoğun bir süspansiyonu yapıldı ve 1 damla tavşan plazması ile (Merck, A.B.D.) karıştırıldı. Lam ileri ve geri hareketlerle sallanarak 3 dk içinde oluşacak kümelenme izlendi. (Arda, 2000; Winn ve ark., 2006).

Tüp Koagülaz Testi

Steril bir tüpe, bakterinin Tryptic Soy Broth (TSB)'da (Merck, A.B.D.) hazırlanmış kültüründen 0,5 ml kondu ve üzerine aynı miktar taze tavşan plazmasından ilave edildi. Karışması sağlandıktan sonra 37°C'de aerobik şartlarda inkübasyona alındı. İlk 4 saat içinde, her yarım saatte tüpü yavaşça eğerek pıhtı

oluşumu yönünden kontrol edildi. Bu süre sonunda, pıhtı şekillenmemiş ve kısmi pıhtılaşma şekillenmiş tüpler 20 saat daha inkübasyonda tutulup aynı şekilde kontrol edildiler. Hiçbir pıhtılaşma şekillenmemiş ve süspansiyon ilk baştaki gibi homojen ise negatif olarak kaydedildi (Arda, 2000; Winn ve ark., 2006).

Mannitol Fermentasyonu

Petrilerdeki Mannitol Salt Agar (MSA) (Oxoid, İngiltere) besiyerine suşların ekimi yapıldı ve pleyt 37 °C'de 48 saat aerobik şartlarda inkübasyonda tutuldu. Üreme sonrasında oluşan kolonilerin çevresinde sarı renk alanın oluşumu pozitif olarak kabul edildi (Winn ve ark., 2006).

Voges-Proskauer Testi (VP, Asetoin Testi)

Öncelikle testte kullanmak üzere, 5 g alfa naphthol (Pancreac Sintesis, E.U.) 100 ml absolut etil alkol içinde çözdürülerek % 5'lik alfa naphthol solüsyonu, 40 gr potasyum hidroksit 100 ml distile suda çözdürülerek % 40'luk KOH solüsyonu hazırlandı.

Tüp içindeki 5 ml Methyl-Red / Voges-Proskauer (MR-VP) sıvı besiyerine (Oxoid, İngiltere), suştan ekim yapıldı ve yoğun bir üreme elde etmek için tüpler 3 gün süre ile 37 °C'de inkübasyona alındı. Ardından, sırasıyla 0,6 ml % 5'lik alfa naphthol ve 0,2 ml % 40'luk KOH ilave edilip tüpler çalkalandı. Tüplerde 30 dk içinde kırmızı renk oluşumu pozitif olarak kabul edildi. Bir saatlik süre sonrasında tüplerde şekillenen bakır rengi pozitif sonuç olarak değerlendirilmedi (Arda, 2000; Winn ve ark. 2006).

Beta-Galaktosidase Test (ONPG)

Suşun steril bir tüp içinde 0,5 ml steril fizyolojik tuzlu su ile homojen yoğun bir süspansiyonu yapıldıktan sonra, steril bir pens vasıtasıyla ONPG diski (O-nitrophenyl- β -D-galactopyranosidase, 100 μ g) (Becton, Dickinson and Company, A.B.D.) tüpün içine bırakıldı ve tüpler 37 °C'de 24 saat süreyle inkübasyonda tutuldu. Bu süre içinde sarı renk oluşumu pozitif olarak değerlendirildi (Arda, 2000; Winn ve ark., 2006).

Karbonhidrat Fermentasyon Testleri

Peptone (Difco)	10,0 g/l
Sodium chloride	5,0 g/l
Distile su	1000 ml

Yukarıdaki oranlarda hazırlanan besiyerinin pH'sı 7,2'ye ayarlandıktan sonra % 0,6'lık Brom-Kreosol Moru (Fluka, İsviçre) solüsyonundan 2,5 ml ilave edilip karıştırıldı. Besiyeri otoklavlandıktan sonra steril tüplere 4,5 ml miktarında dağıtıldı. Ardından, glikoz, fruktoz, ksiloz, laktoz, maltoz, mannitol, mannoz, N-asetil glukozamin, rafinoz, sükroz, trehaloz'un (Merck, A.B.D.) % 10'luk steril solüsyonlarından 0,5 ml katıldı. Son olarak suşların saf kültürlerinden 0,1 ml ilave edilip tüpler 37 °C'de aerobik şartlarda 1 hafta inkübasyona bırakıldı. Her gün tüpler kontrol edilip, mor renkte olan besiyerinin renginin sarı renge dönmesi pozitif olarak kabul edildi.

Üreaz Testi

Tüp içindeki üreli buyyona (Urea Broth Base) (LabM, İngiltere) öze ile suşun kolonilerinden alınıp ekim yapıldı ve 37 °C'de aerobik şartlarda inkübasyona alındı. Yavaş üreaz aktivitesine sahip suşların belirlenmesi amacıyla inkübasyonda süresi 5 güne kadar uzatıldı (Arda, 2000; Winn ve ark., 2006). Kültürün renginin kırmızı renge dönmesi pozitif olarak kabul edildi.

Polimiksin ve Novobiosin Duyarlılık Testleri

Suşların novobiosin ve polimiksine duyarlılıklarının belirlenmesi suşların identifikasyonu amacıyla gerçekleştirildi ve CLSI protokolü takip edilerek agar-disk difüzyon tekniği kullanıldı (CLSI, 2006a). Suşun TSB (Merck, A.B.D.) içinde saf kültürü hazırlanıp bulanıklığı 0,5 McFarland'a ayarlandıktan sonra steril bir sıvı vasetasıyla petrilerdeki Mueller Hinton Agar (MHA) (Becton, Dickinson and Company, A.B.D.) besiyerinin tüm yüzeyine eşit şekilde sürülerek ekildi. Petrilerin kuruması için 5 dk bekledikten sonra steril bir pens ile polimiksin B (300 Units) (Bioanalyse, Türkiye) ve novobiosin (30 µg/ml) (Bioanalyse, Türkiye) diskleri yerleştirildi ve petri 35°C'de 24 saat aerobik şartlarda inkübasyona bırakıldı. Ancak, CLSI'nin polimiksin ve novobiosin için kriterleri bulunmadığından dolayı sonuçlar

diskleri üreten firmanın belirttiği kriterlere göre değerlendirildi. Polimiksin için disk çevresinde 9 mm'den daha dar çaplı inhibisyon zonu oluşumu dirençlilik, 9 mm ve daha geniş inhibisyon zonu oluşumu ise duyarlılık olarak kabul edildi. Novobiosin için ise, disk çevresinde 17 mm ve daha dar çaplı inhibisyon zonu oluşumu dirençlilik olarak kabul edildi.

2.2.2. Metisilin ve Vankomisin için Fenotipik Dirençliliğinin Tespiti

2.2.2.1. Agar-Disk Difüzyon Tekniği (ADDT)

Stafilokok suşlarının metisilin ve vankomisin için fenotipik dirençliliğinin belirlenmesi CLSI'nin önerdiği ADDT ile gerçekleştirildi (CLSI, 2006a; Wagner, 2007). Metisilin dirençliliğinin belirlenmesi % 2 NaCl içeren MHA (Becton, Dickinson and Company, A.B.D.) besiyeri ve 1 µg oksasilin içeren disk (Bioanalyse, Türkiye) kullanarak, vankomisin dirençliliği ise MHA (Becton, Dickinson and Company, A.B.D.) besiyeri ve 30 µg vankomisin içeren disk (Bioanalyse, Türkiye) kullanarak gerçekleştirildi. Suşun kanlı agar (Oxoid, İngiltere)'daki 24 saatlik üreme sonucu oluşmuş kolonilerinden bir öze ile alınarak TSB'de (Merck, A.B.D.) direkt süspansiyonu yapıldı ve bulanıklığı gerektiğinde steril besiyeri kullanarak 0,5 McFarland'a ayarlandı. Ardından, steril bir sıvıap kültüre batırıldı ve sıvabın ucu tüpün kenarına döndürür tarzda bastırarak sıvıaptaki fazla sıvı çıkarıldıktan sonra petrilere besiyerinin tüm yüzeyine eşit şekilde sürüldü. Oda sıcaklığında 5 dk agarın yüzeyinin kuruması için bekledikten sonra steril bir pens vasıtasıyla oksasilin diski (1 µg) (Bioanalyse, Türkiye) % 2 NaCl içeren MHA (Becton, Dickinson and Company, A.B.D.) besiyerinin üzerine, vankomisin diski (30 µg) (Bioanalyse, Türkiye) ise MHA (Becton, Dickinson and Company, A.B.D.) besiyerinin üzerine yerleştirildi. Vankomisin diski ile birlikte, olası dirençli suşun bulunması durumunda vankomisin dirençlilik tipini belirlemek için, teikoplanin diski (30 µg) (Bioanalyse, Türkiye) en az 2 cm aralık olacak mesafede vankomisin diskinin yanına kondu. Petriler aerobik şartlarda 33-35 °C'de 24 saat inkübe edildi. Süre sonunda disk çevresinde oluşan inhibisyon zon çapları ölçüldü ve ayrıca inhibisyon zonları içinde bakteri kolonisi olup olmadığı incelendi. Sonuçlar, çizelge 1.1 'de belirtilen CLSI tarafından belirlenmiş kritik zon çapları ile karşılaştırılarak oksasilin için duyarlılık durumları kaydedildi. Vankomisin için ise CLSI'nin kriterlerine göre, 15 mm ve

daha geniş inhibisyon zon çapına sahip olan suşlar duyarlı, daha dar olan suşlar ise dirençli olarak kabul edildi (CLSI, 2007). Bu testte referans suş olarak metisilin dirençli olan *S. aureus* ATCC 43300 ve metisiline duyarlı olan *S. aureus* ATCC 25923, vankomisin dirençli olarak *E. faecalis* kanatlı izolatu ve vankomisin duyarlı olarak *S. aureus* ATCC 43300 kullanıldı. Teikoplanin duyarlılığı için, inhibisyon zon çapı 10 mm ve altı dirençli, 14 mm ve üzeri duyarlı ve 11-13 mm ise orta derecede dirençli olarak kabul edildi (CLSI, 2006a).

Ayrıca, çalışmada fenotipik testler sonucunda dirençli çıkan ancak *mecA* geni taşımayan suşlarda, fenotipik dirençliliğin beta-laktamaz üretiminden olup olmadığına ortaya çıkarılması için, CLSI protokolü takip edilerek MHA (Becton, Dickinson and Company, A.B.D.) besiyerinde ticari amoksisilin klavulanik asit kombinasyonu diski (20/10 µg, Oxoid, İngiltere) ile ADDT gerçekleştirildi (Martineau ve ark., 2000; CLSI, 2006a). Sonuçlar, 19 mm ve daha dar inhibisyon zonu oluşturan suşlar dirençli, 20 mm ve daha geniş zon oluşturan suşlar ise duyarlı olarak kaydedildi (CLSI, 2007).

2.2.2.2. Agar Dilüsyon Tekniği

Stafilokok suşlarının metisilin ve vankomisin için MİK değerlerinin belirlenmesi amacıyla agar dilüsyon tekniği, CLSI'nin önerdiği protokol takip edilerek yapıldı (CLSI, 2006b; Hanlon ve ark., 2007). Metisilin dirençliliği için yapılan test, % 2 NaCl ilave edilerek hazırlanan MHA (Becton, Dickinson and Company, A.B.D.) besiyeri ve oksasilin (Sigma, A.B.D.) kullanarak, vankomisin için ise MHA (Becton, Dickinson and Company, A.B.D.) besiyeri ve vankomisin (Lek Pharmaceuticals, Slovenya) kullanarak gerçekleştirildi. Öncelikle antibiyotiklerin steril distile su ile 10,000 µg/ml ve 1,000 µg/ml yoğunluklarında olacak şekilde stok solüsyonları hazırlandı. Ardından, oksasilin için 1 litrelik bölümler halinde 13 litre % 2 oranında NaCl içeren MHA (Becton, Dickinson and Company, A.B.D.), vankomisin için ise aynı şekilde 1 litrelik bölümler halinde 13 litre MHA (Becton, Dickinson and Company, A.B.D.) besiyerleri hazırlandı ve otoklavlanarak steril edildiler. Besiyerinin sıcaklığı 45-50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra besiyerlerine çizelge 2.1'de belirtildiği oranlarda oksasilin ve vankomisin stok solüsyonlarından katıldı ve iyice karışmaları sağlandı. Böylece çizelge 2.1'de belirtilen değişik

yoğunluklarda oksasilin ve vankomisin içeren besiyerleri elde edilmiş oldu. Besiyerleri daha sonra steril petrilere, kalınlığı 4 mm olacak şekilde döküldüler ve katılaşmaları için beklendi. Hazırlanan petrillerdeki besiyerleri kullanılıncaya kadar 4°C’de tutuldular.

Çizelge.2.1. Değişik oksasilin ve vankomisin konsantrasyonları içeren besiyerleri elde etmek için antibiyotik stok solüsyonundan besiyerine katılan miktarlar

Besiyeri	10,000 µg/ml stok solüsyonundan 1 litre besiyerine katılan miktar	Besiyerinde oluşan antibiyotik konsantrasyonu
A	25,6 ml	256 µg/ml
B	12,8 ml	128 µg/ml
C	6,4 ml	64 µg/ml
D	3,2 ml	32 µg/ml
E	1,6 ml	16 µg/ml
	1,000 µg/ml stok solüsyonundan 1 litre besiyerine katılan miktar	Besiyerinde oluşan antibiyotik konsantrasyonu
F	8 ml	8 µg/ml
G	4 ml	4 µg/ml
H	2 ml	2 µg/ml
I	1 ml	1 µg/ml
K	0,5 ml	0.5 µg/ml
L	0,25 ml	0.25 µg/ml
M	-	0,0 µg/ml

İzolatin kanlı agar besiyerindeki 24 saatlik üreme sonucu oluşmuş kolonilerinden bir öze ile alınarak TSB’da (Merck, A.B.D.) direkt süspansiyonu yapıldı ve bulanıklığı, gerektiğinde steril besiyeri kullanarak, 0,5 McFarland’a ayarlandı. Ardından, bu bakteri süspansiyonundan bir öze dolusu tüm antibiyotik yoğunluklarındaki (0-256 µg/ml) petrilere suş için işaretlenmiş kısma ekimi yapıldı. Petrilere, 10 dk oda sıcaklığında bekletilip agarın yüzeyinin kuruması sağlandıktan sonra ters çevrilip 35 °C’de 24 saat aerobik şartlarda inkübasyona bırakıldılar. Bu süre sonunda petrillerdeki üremeler incelendi ve suşun üremesinin inhibe edildiği ilk antibiyotik konsantrasyonu MİK olarak kaydedildi. Bir kolonilik üreme göz ardı edildi ve negatif (inhibisyon) olarak değerlendirildi. Sonuçlar CLSI’nin belirlediği kritik MİK değerleri (Çizelge 1.3 ve Çizelge 1.4) ile karşılaştırılarak suşların metisilin ve vankomisin için direnç durumları değerlendirildi. Bu testlerde, referans suş olarak metisilin dirençli olan *S. aureus* ATCC 43300, metisiline duyarlı olan *S. aureus* ATCC 25923; vankomisin dirençli suş olan *E. faecalis*, vankomisin duyarlı olarak *S. aureus* ATCC 43300 kullanıldı.

2.2.3. Metisilin ve Vankomisin için Genotipik Dirençliliğinin Tespiti

2.2.3.1. DNA Ekstraksiyonu

Bu çalışmada, izole edilen 100 stafilokok suşunun ve referans suşların (*S. aureus* ATCC 43300, *S. aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* kanatlı suşu, *S. aureus* ATCC 700699 (MU50) DNA ekstraksiyonu, suşların saf kültürlerinden, ticari bir ekstraksiyon kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Öncelikle tüm suşların katı besiyerindeki saf kültürlerinden birer koloni alınıp, içinde 1 ml steril Nutrient Broth (NB) (Oxoid, İngiltere) bulunan tüplere ekildi ve 24 saat 37 °C’de inkübasyonda tutuldular. Ardından kültürler 8000 rpm’de (revolutions per minute) 5 dk santrifüj (Hettich Zentrifugen, Universal 32R, Almanya) edildi ve üstteki süpernatant atıldı. Tüplerde kalan pelet, içerisine 0,2 mg/ml (miligram/mililitre) lizostafin (Sigma, A.B.D.) ilave edilmiş 20 mM Tris/Cl (Amresco, A.B.D.), 2 mM EDTA (Bioshop, Kanada), % 1 Triton X-100 (Sigma, A.B.D.) (pH 8,0) solüsyonunun 180 µl’si ile homojen olacak şekilde sulandırılıp karıştırıldı ve tüpler 37 °C’de 30 dk inkübe edildiler. Inkübasyonu takiben 25 µl proteinaz K ilave edildi ve vorteksenerek (Finepcr, Kore) 56 °C’de 2 saat tutuldular. Ardından ekstraksiyon kiti (Macherey-Nagel, Almanya) içeriğindeki buffer ve spin kolonlar kullanılarak, üretici firmanın Gram pozitif bakterilerden DNA ekstraksiyon protokolüne göre, suşların DNA ekstraksiyonu gerçekleştirildi. DNA ekstraktları PCR’da kullanılıncaya dek -20 °C’de saklandılar.

2.2.3.2. PCR

Amplifikasyon için ekstrakte edilen her bir DNA örneği için 25 µl’lik PCR karışımı hazırlandı. PCR karışımının oluşturulmasında, 0,05 U/ µl rekombinant Tag DNA Polimeraz enzimi, reaksiyon buffer, 4 mM MgCl₂, 0,4 mM her bir dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) içeren premiks PCR master mix (Fermentas, Litvanya) kullanıldı. PCR master mix’in 12,5 µl’sine, her bir primerden 1 µl ilave edildi ve ardından hacim 23 µl’ye nükleaz enziminden arı H₂O kullanılarak tamamlandı. Template olarak ekstrakte edilmiş DNA’lardan 2 µl son olarak katılarak PCR karışımı oluşturuldu. **MecA** PCR’da *mecA* geninin 314 bp’lik kısmının amplifikasyonunu sağlayan spesifik primerler (Forward 5’-CCT AGT AAA GCT

CCG GAA-3'; Reverse 5'- CTA GTC CAT TCG GTC CA-3') (Choi ve ark., 2003), **vanA PCR**'da ise *vanA* geninin 1030 bp'lık kısmının amplifikasyonunu sağlayan spesifik primerler (Forward 5'-CAT GAA TAG AAT AAA AGT TGC AAT A-3'; Reverse 5'- CCC CTT TAA CGC TAA TAC GAT CAA-3') (Clark ve ark., 1993) kullanıldı. Çalışmadaki 100 suşun **mecA** için PCR'ı, pozitif referans suş olarak *S. aureus* 43300 (MRSA, *mecA* +), ve negatif referans suş olarak *S. aureus* ATCC 25923 (MSSA, *mecA* -) ile beraber; **vanA** için PCR ise, pozitif referans suş olarak *E. faecalis* kanatlı izolatu (VRE, *vanA* +) ve negatif referans suş olarak *S. aureus* ATCC 700699 (VISA, *vanA*-) ile beraber gerçekleştirildi.

Örnekler thermal cyclers'a (Biometra, Almanya) yüklendikten sonra **mecA PCR** protokolü Choi ve ark. (2003) ve Sareyyüpoğlu ve ark. (2006)'dan modifiye edilerek gerçekleştirildi. PCR protokolü, 94 °C'de 10 dk'lık ön denatürasyonu takiben 94 °C'de 1 dk, 54 °C'de 1 dk ve 72 °C'de 1 dk'dan oluşan bir döngü olmak üzere toplam 30 döngüden oluştu. Son olarak 72 °C'de 7 dk polimerizasyon aşamasından sonra reaksiyon sonlandırıldı. **VanA PCR** ise 95 °C'de 10 dk'lık ön denatürasyonu takiben 94 °C'de 30 sn (saniye), 58 °C'de 30 sn ve 72 °C'de 30 sn'den oluşan bir döngü olmak üzere toplam 30 döngü olarak gerçekleştirildi. Son olarak 72 °C'de 10 dk polimerizasyon aşamasından sonra reaksiyon tamamlandı (Clark ve ark., 1993).

2.2.3.3. Elektroforez ve Görüntüleme

MecA PCR ürünleri % 1,5'lik agaroz jel hazırlanarak, **VanA PCR ürünleri** ise % 1,8'lik agaroz jel hazırlanarak koşturuldu. Bu amaçla, **mecA PCR ürünleri** için 3 g agaroz (Basica Le Agarose, Prona, Fransa), **vanA PCR ürünleri** için ise 3,6 g agaroz (Basica Le Agarose, Prona, Fransa) 200 ml 0,5XTBE içinde iyice karıştırıldı ve su banyosunda agaroz eriyene kadar tutuldu. Eriyen agaroz soğutulduktan sonra içerisine ethidium bromide (0,5 µg/ml) eklenerek karıştırıldı ve tarakları yerleştirilmiş yatay DNA elektroforez cihazının (Thermo Electron Corporation, A.B.D.) kalıbına döküldü (Sareyyüpoğlu ve ark. 2006; Turutoglu ve ark., 2009; Clark ve ark., 1993).

Agaroz jel katılaştıktan sonra, elektroforez tankına yerleştirildi ve tanka jelin yüzeyini örtecek seviyede 0,5XTBE buffer (AppliChem, Almanya) ilave edildi. PCR

örneklerine % 20 oranında yükleme boyası (Fermentas, Litvanya) eklenip karıştırıldıktan sonra jeldeki gözlere 10 µl'lik hacimlerde yüklendi. **MecA PCR ürünleri** için, birinci çukurcuğa 100 bp'lik DNA marker (Fermentas, Litvanya), 2. çukurcuğa pozitif referans suş olarak *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA, *mecA* +) DNA'sı ile elde edilen PCR ürünü ve 3. çukurcuğa'da negatif referans suş olarak *S. aureus* ATCC 25923 (MSSA, *mecA* -) DNA'sı ile elde edilen PCR ürünü yüklendi. **VanA PCR ürünleri** için ise, birinci çukurcuğa 100 bp'lik DNA marker (Fermenta, Litvanya), 2. çukurcuğa pozitif referans suş olarak *E. faecalis* kanatlı suşu (VRE, *vanA* +) DNA'sı ile elde edilen PCR ürünü, ve 3. çukurcuğa'da negatif referans suş olarak *S. aureus* ATCC 700699 (VISA, *vanA* -)(MU50) DNA'sı ile elde edilen PCR ürünü yüklendi. Elektroforez cihazı güç kaynağına (Serva, Blue Power 500, Almanya) bağlanarak sabit akımda 170 volt'ta 60 dk elektroforez edildi. Sonuçlar UV-transillüminatorda (Genius, Bio Imaging System, Syngene, İngiltere) incelenerek görüntüleme ünitesinden fotoğraflandı.

3. BULGULAR

3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Çalışma kapsamında, 57 işletmede mastitis problemlili olan laktasyondaki 107 sığira ait 306 süt örneğinin 127'sinden (% 41,5) toplam 100 stafilocok suşu izole edildi. Çalışmadaki mastitis problemlili 107 ineğin 63 (% 58,9)'ünün stafilocok kaynaklı mastitise sahip olduğu belirlendi.

Toplam 100 suşun 45 (% 45)'i klinik mastitisli meme loblarından alınan süt örneklerinden (n:121), 55 (% 55)'i ise subklinik mastitisli meme loblarından alınan süt örneklerinden (n:185) izole edildi. Klinik mastitisli meme loblarından alınan süt örneklerinden izole edilen 45 stafilocok suşunun 38 (% 84,4)'i KPS ve 7 (% 15,6)'si KNS suşu olarak, subklinik mastitisli meme loblarından alınan süt örneklerinden izole edilen 55 suşun 44 (% 80)'ü KPS ve 11 (% 20)'i ise KNS olarak identifiye edildi. Toplamda 100 stafilocok suşunun 82 (% 82)'si KPS, 18 (% 18)'i ise KNS suşu olduğu belirlendi (Çizelge 3.1).

Çizelge 3. 1. Toplanan süt örnekleri ve izole edilen Stafilocokların dağılımı

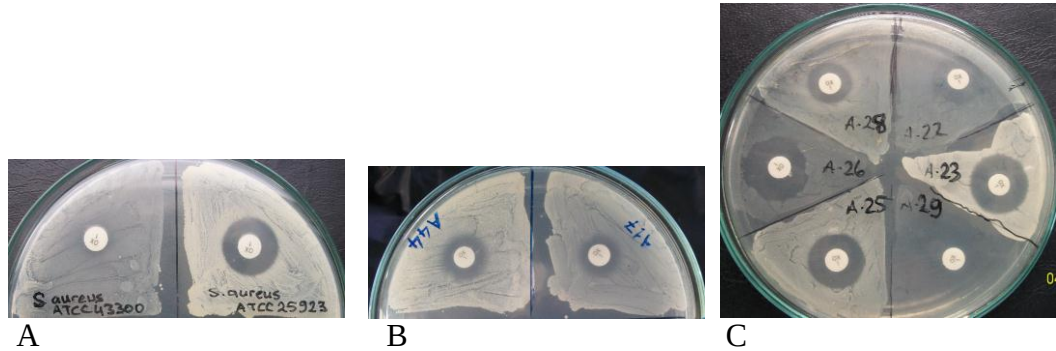
Mastitis	Süt Örneği (n)	Koagülaz Pozitif Stafilocok (n)	Koagülaz Negatif Stafilocok (n)	Toplam Suş (n)
Klinik	121	38	7	45
Subklinik	185	44	11	55
Toplam	306	82	18	100

İzole edilen 82 KPS suşunun 65 (65/82, % 79,3)'i *S. aureus*, 17 (17/82, % 20,7)'si diğer bir mastitis etkeni KPS türü olan *S. intermedius* olarak identifiye edildi. KNS suşu olarak izole edilen 18 stafilocok suşunun yapılan identifikasyon sonucunda, tür bazında dağılımının 4 *S. simulans*, 3 *S. chromogenes*, 3 *S. lugdunensis*, 3 *S. xylosus*, 2 *S. hemolyticus*, 1 *S. hominis* subsp. *hominis*, 1 *S. cohnii* subsp. *urealyticum* ve 1 identifiye edilemeyen KNS suşu şeklinde olduğu belirlendi.

3.2. Metisilin için Fenotipik Dirençliliğin Belirlenmesi Amacıyla Yapılan Testlerin Bulguları

3.2.1. Agar-Disk Difüzyon Tekniği (ADDT)

CLSI protokolü takip edilerek metisilin dirençliliğinin belirlenmesi için yapılan ADDT sonuçlarına göre, test edilen 100 stafilokok suşunun 31 (% 31)'i dirençli, 5 (% 5)'i orta derecede dirençli, 64 (% 64)'ü ise duyarlı olarak belirlendi (Çizelge 3.2). KPS suşlarının 15 (15/82, % 18,3)'i dirençli, 5 (5/82, % 6,1)'i orta derecede dirençli ve 62 (62/82, % 75,6)'si duyarlı bulundu (Çizelge 3.2). Test edilen 65 *S. aureus* suşunun ise 15 (15/65, % 23,1)'i dirençli, 5 (5/65, % 7,7)'i orta derecede dirençli ve 45 (45/65, % 69,2)'i duyarlı bulunurken diğer KPS suşu olan *S. intermedius* 'un tümü (% 100) metisiline duyarlı bulundu (Çizelge 3.3). İzole edilen 18 KNS suşunun ise 16 (% 88,9)'sı dirençli bulunurken, 2 (% 11,1)'sinin duyarlı olduğu belirlendi (Çizelge 3.2; Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Bazı suşların oksasilin (1 µg) ile yapılan agar-disk difüzyon testi sonuçları

A) *S. aureus* ATCC43300 (Dirençli kontrol suşu); *S. aureus* ATCC25923 (Duyarlı kontrol suşu);
B) A44 (*S. aureus*, 10 mm, dirençli); A17 (*S. aureus*, 8 mm, dirençli); C) A22 (*S. chromogenes*, 13 mm, dirençli); A23 (*S. simulans*, 16 mm, dirençli); A29 (*S. chromogenes*, 19 mm, duyarlı); A25 (*S. intermedius*, 16 mm, duyarlı); A26 (*S. intermedius*, 16 mm, duyarlı); A28 (*S. aureus*, 11 mm, orta derecede dirençli).

3.2.2. Agar Dilüsyon Tekniği

CLSI protokolü izlenerek yapılan agar dilüsyon tekniği sonuçlarına göre, test edilen toplam 100 suşun 38 (% 38)'i dirençli, 62 (% 62)'si ise duyarlı olarak belirlendi (Çizelge 3.2). KPS suşlarının 20 (20/82, % 24,4)'si dirençli iken, 62 (62/82, % 75,6)'sinin duyarlı olduğu belirlendi (Çizelge 3.2). *S. aureus* suşlarının 20 (20/65, % 30,8)'si dirençli, 45 (45/65, % 69,2)'i duyarlı iken *S. intermedius*

suşlarının (n:17) tümünün duyarlı olduğu tespit edildi (Çizelge 3.3). Diğer taraftan, KNS suşlarının ise tümünün (% 100) dirençli olduğu görüldü (Çizelge 3.2, Şekil 3.2).

Çizelge 3.2. Stafilokok suşlarının oksasilin için ADDT ve agar dilüsyon tekniği sonuçları.

Stafilokok Suşları	ADDT			Agar Dilüsyon Tekniği		
	R	I	S	R	I	S
KPS (n:82)	15	5	62	20	n/a	62
KNS(n:18)	16	n/a	2	18	n/a	0
Toplam (n:100)	31	5	64	38	n/a	62

R: Dirençli, S: Duyarlı, I: Orta derecede dirençli, n/a: uygulanabilir değil.

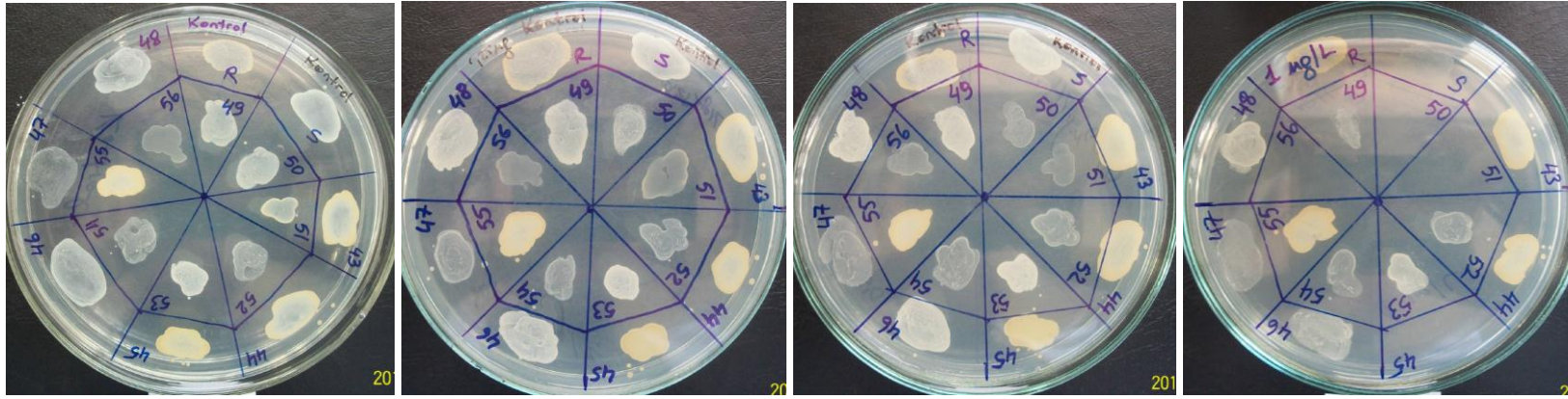
Çizelge 3.3. KPS suşlarının oksasilin için ADDT ve agar dilüsyon tekniği sonuçları

KPS Suşları	ADDT			Agar Dilüsyon Tekniği		
	R	I	S	R	I	S
<i>S. aureus</i> (n:65)	15	5	45	20	n/a	45
<i>S. intermedius</i> (n:17)	0	0	17	0	n/a	17
Toplam (n:82)	15	5	62	20	n/a	62

R: Dirençli, S: Duyarlı, I: Orta derecede dirençli, n/a: uygulanabilir değil

Oksasilin ile yapılan ADDT’de dirençli bulunan suşların tümü agar dilüsyon tekniği ile de dirençli bulunurken, ADDT ile orta derecede dirençli bulunan 5 *S. aureus* suşu, agar dilüsyon tekniğinde MİK değerlerinin 4-8 µg/ml olduğu yani dirençli oldukları bulundu. Yine ADDT’de duyarlı bulunan 2 KNS suşu (*S. simulans* ve *S. chromogenes*), agar dilüsyon testinde oksasiline dirençli bulundu.

Agar dilüsyon tekniğiyle belirlenen oksasilin için MİK değerlerinin dağılımı tüm suşlar için çizelge 3.4’de sunulmuştur.

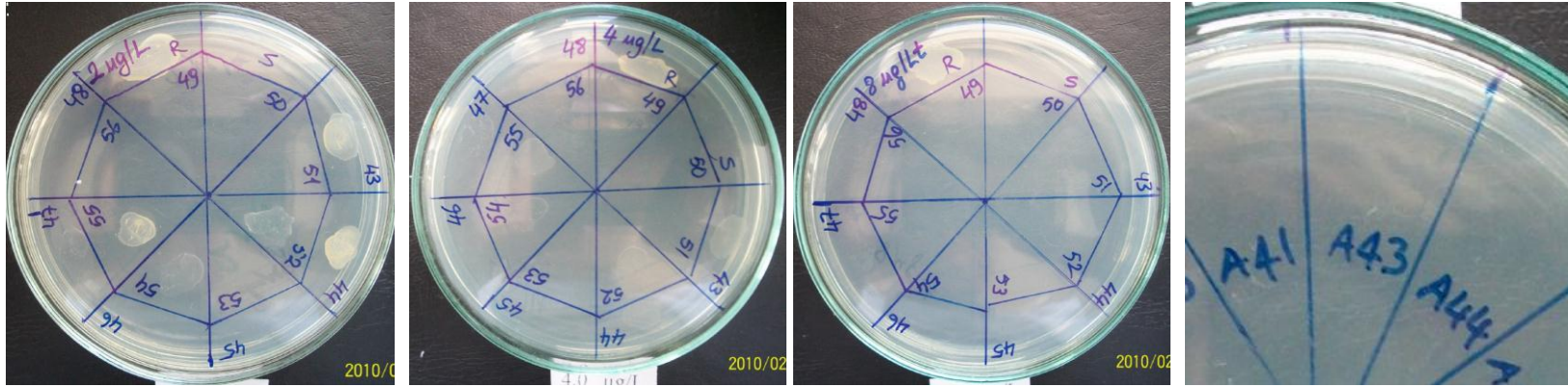


A) Kontrol (0 µg/ml oksasilin)

B) 0,25 µg/ml oksasilin

C) 0,5 µg/ml oksasilin

D) 1 µg/ml oksasilin



E) 2 µg/ml oksasilin

F) 4 µg/ml oksasilin

G) 8 µg/ml oksasilin

H) 16 µg/ml oksasilin

Şekil 3.2. Bazı suşların oksasilin için yapılan agar dilüsyon testi sonuçları

R (Dirençli kontrol suşu, *S. aureus* ATCC43300); S (Duyarlı kontrol suşu, *S. aureus* ATCC25923); A43 (*S. aureus*, 16 µg/ml); A44 (*S. aureus*, 16 µg/ml); A45 (*S. aureus*, 2 µg/ml); A46 (*S. aureus*, 2 µg/ml); A47 (*S. aureus*, 2 µg/ml); A48 (*S. aureus*, 2 µg/ml); A49 (*S. aureus*, 2 µg/ml); A50 (*S. aureus*, 1 µg/ml); A51 (*S. aureus*, 1 µg/ml); A52 (*S. xylosus*, 8 µg/ml); A53 (*S. lugdunensis*, 4 µg/ml); A54 (*S. aureus*, 16 µg/ml); A55 (*S. aureus*, 8 µg/ml); A56 (*S. aureus*, 1 µg/ml).

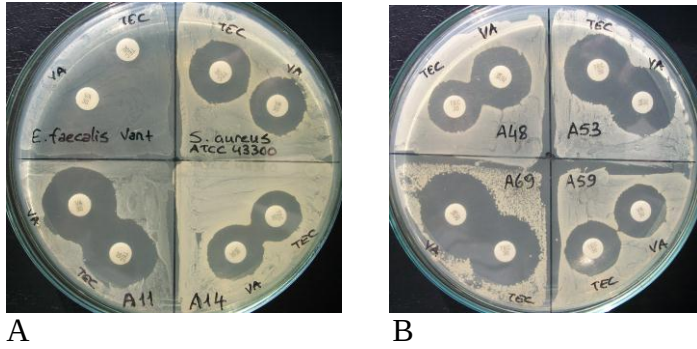
Çizelge 3.4. Stafilocok suşlarının oksasilin için MİK değerlerinin dağılımı

MİK (µg/ml)	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
Stafilokok											
KPS (n:82)	-	3	21	38	3	9	6	1	-	-	1
KNS (n:18)	-	-	2	11	1	3	1	-	-	-	-
Toplam (n:100)	-	3	23	49	4	12	7	1	-	-	1
Duyarlı											
Dirençli											

3.3. Vankomisin için Fenotipik Dirençliliğin Belirlenmesi Amacıyla Yapılan Testlerin Bulguları

3.3.1. Agar-Disk Difüzyon Tekniği

Oksasilin ile CLSI protokolü takip edilerek yapılan ADDT'ye göre, test edilen 100 stafilocok suşunun tümü vankomisine karşı duyarlı bulundu. Ayrıca, oluşan inhibisyon zon çapları içinde herhangi bir koloni tespit edilmedi (Çizelge 3.5, Şekil 3.3). Aynı anda gerçekleştirilen teikoplanin ile yapılan ADDT'de, disk etrafında dirençliliği işaret edecek büyüklükte inhibisyon zonu şekillenmedi ve tüm suşlar teikoplanin içinde duyarlı bulundu.



Şekil 3.3. Bazı suşların vankomisin (30 µg) ile yapılan agar-disk difüzyon testi sonuçları

A) *E. faecalis* (VRE, Dirençli kontrol suşu; VA:0 mm, TEC: 7 mm); *S. aureus* ATCC 43300 (Duyarlı kontrol suşu; VA:16 mm, TEC: 21 mm); A11 (*S. aureus*, VA:20 mm, TEC:18 mm); A14 (*S. aureus*, VA:16 mm, TEC:15 mm). B) A48 (*S. aureus*, VA:17 mm, TEC:16 mm); A53 (*S. aureus*, VA:19 mm, TEC:20 mm); A59 (*S. lugdunensis*, VA:16 mm, TEC:16 mm); A69 (*S. haemolyticus*, VA: 23 mm, TEC: 20 mm).

3.3.2. Agar Dilüsyon Tekniği

Vankomisin için tüm suşların MİK değerleri tespit edilerek yapılan agar dilüsyon testi sonucuna göre, 10 (% 10) stafilokok suşunun vankomisin için duyarlılığının azalmış olduğu belirlendi. Diğer 90 (% 90) suş ise duyarlı olarak belirlendi (Çizelge 3.5, Şekil 3.4).

Çizelge 3.5. Stafilokok suşlarının vankomisin için ADDT ve agar dilüsyon tekniği sonuçları

Stafilokok Suşları	ADDT			Agar Dilüsyon Tekniği		
	R	I	S	R	I	S
KPS (n:82)	0	n/a	82	0	7	75
KNS (n:18)	0	n/a	18	0	3	15
Toplam (n:100)	0	n/a	100	0	10	90

R: Dirençli, S: Duyarlı, I: Orta derecede dirençli, n/a: uygulanabilir değil.

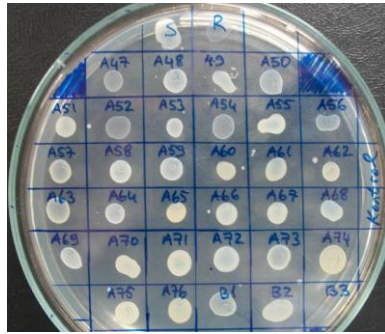
Çizelge 3.6. KPS suşlarının vankomisin için ADDT ve agar dilüsyon tekniği sonuçları

KPS Suşları	ADDT			Agar Dilüsyon Tekniği		
	R	I	S	R	I	S
<i>S. aureus</i> (n:65)	0	n/a	65	0	7	58
<i>S. intermedius</i> (n:17)	0	n/a	17	0	0	17
Toplam (n:82)	0	n/a	82	0	7	75

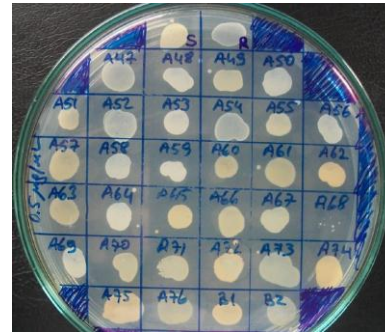
R: Dirençli, S: Duyarlı, I: Orta derecede dirençli, n/a: uygulanabilir değil.

Bu 10 suşun, 7'sinin *S. aureus*, 3'ünün ise KNS (2 *S. lugdunensis*, 1 *S. haemolyticus*) suşu olduğu belirlendi (Çizelge 3.5, Çizelge 3.6). Bu suşların vankomisin için MİK değerlerinin *S. aureus* suşları için 4 µg/ml, KNS suşları için ise 8 µg/ml olduğu belirlendi (Çizelge 3.7).

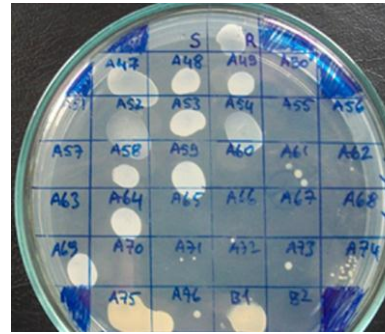
Agar dilüsyon tekniğiyle belirlenen vankomisin için MİK değerlerinin dağılımı tüm suşlar için çizelge 3.7'de sunulmuştur



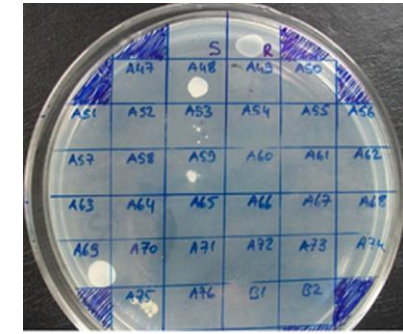
A) Kontrol (0 µg/ml vankomisin)



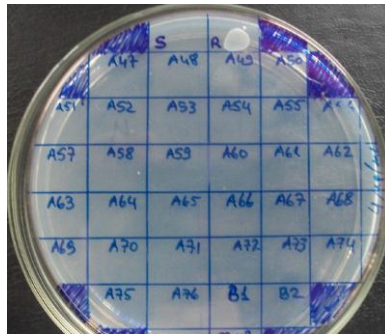
B) 0,5 µg/ml vankomisin



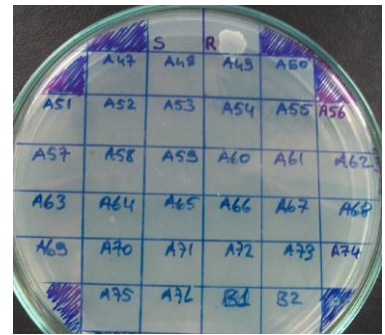
C) 1 µg/ml vankomisin



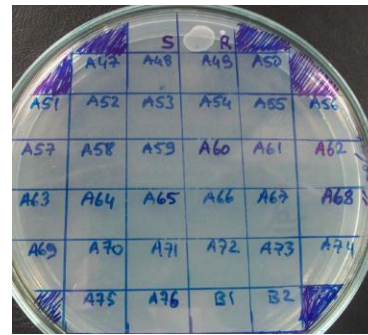
D) 2 µg/ml vankomisin



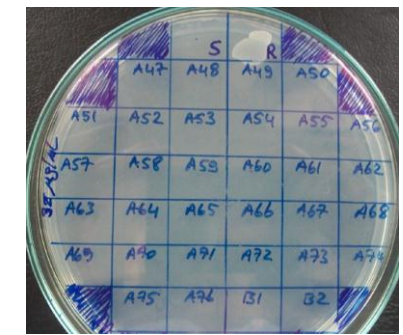
E) 4 µg/ml vankomisin



F) 8 µg/ml vankomisin



D) 16 µg/ml vankomisin



E) 32 µg/ml vankomisin

Şekil 3.4. Bazı suşların vankomisin ile yapılan agar dilüsyon testi sonuçları

R (Dirençli kontrol suşu ; *E. faecalis* kanatlı izolatu, *vanA* +); S (Duyarlı kontrol suşu, *S. aureus* ATCC 43300); A47(*S. aureus*, 2 µg/ml); A48 (*S. aureus*, 4 µg/ml); A49 (*S. aureus*, 2 µg/ml); A50 (*S. aureus*, 1 µg/ml); A51 (*S. aureus*, 1 µg/ml); A52 (*S. xylosum*, 2 µg/ml); A53 (*S. lugdunensis*, 4 µg/ml); A54(*S. aureus*, 2 µg/ml); A55 (*S. aureus*, 1 µg/ml); A56 (*S. aureus*, 1 µg/ml); A57 (*S. aureus*, 1 µg/ml); A58 (*S. hominis* subsp. *hominis*, 2 µg/ml); A59 (*S. aureus*, 4 µg/ml); A60 (*S. aureus*, 1 µg/ml); A61 (*S. aureus*, 2 µg/ml); A62 (*S. aureus*, 1 µg/ml); A63 (*S. aureus*, 1 µg/ml); A64 (*S. aureus*, 2 µg/ml); A65 (*S. aureus*, 1 µg/ml); A66 (*S. aureus*, 1 µg/ml); A67 (*S. aureus*, 1 µg/ml); A68 (*S. aureus*, 1 µg/ml); A69 (*S. haemolyticus*, 4 µg/ml); A70 (*S. aureus*, 2 µg/ml); A71 (*S. aureus*, 1 µg/ml); A72 (*S. aureus*, 1 µg/ml); A73 (*S. aureus*, 1 µg/ml); A74 (*S. lugdunensis*, 2 µg/ml); A75 (*S. lugdunensis*, 4 µg/ml); A76 (*S. aureus*, 1 µg/ml); B1 (*S. aureus*, 2 µg/ml); B2 (*S. aureus*, 1 µg/ml).

Çizelge 3.7. Stafilokok suşlarının vankomisin için MİK değerlerinin dağılımı

MİK (µg/ml)	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
Stafilokok											
KPS (n:82)	-	2	48	25	7	-	-	-	-	-	-
KNS (n:18)	-	-	9	6	-	3	-	-	-	-	-
Toplam (n:100)	-	2	57	31	7	3	-	-	-	-	-
Duyarlı	Orta derecede dirençli		Dirençli								

Diğer taraftan, çalışmada tespit edilen vankomisine orta derecede dirençli 10 stafilokok suşunun fenotipik testlerle 6 (3 *S. aureus* ve 3 KNS)'sının metisiline dirençli, 4 (*S. aureus*)'ünün duyarlı olduğu belirlendi (Çizelge 3.8). Bu suşların *mecA* geni taşıdığı belirlendi.

Çizelge 3.8. Vankomisine orta derecede dirençli suşların metisiline karşı direnç durumları

Suş	Vankomisin		Oksasilin	
	Fenotipik	<i>vanA</i>	Fenotipik	<i>mecA</i>
<i>S. aureus</i> (A4)	I	-	S	+
<i>S. aureus</i> (A5)	I	-	S	+
<i>S. aureus</i> (A11)	I	-	R	+
<i>S. aureus</i> (A14)	I	-	R	+
<i>S. aureus</i> (A48)	I	-	S	+
<i>S. lugdunensis</i> (A53)	I	-	R	+
<i>S. aureus</i> (A59)	I	-	S	+
<i>S. haemolyticus</i> (A69)	I	-	R	+
<i>S. lugdunensis</i> (A75)	I	-	R	+
<i>S. aureus</i> (B14)	I	-	R	+

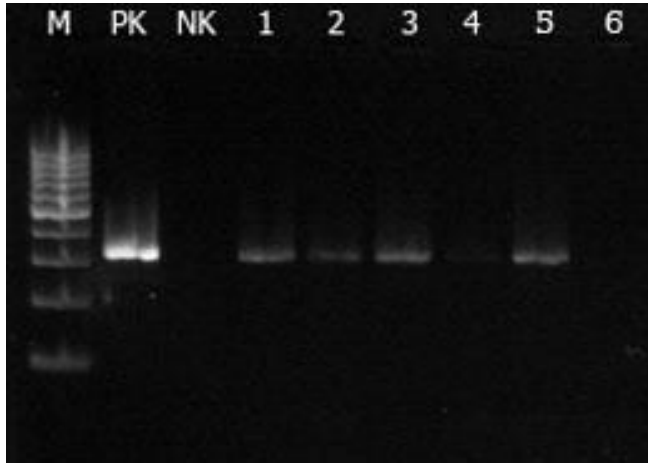
R: Dirençli, S: Duyarlı, I: Orta derecede dirençli

3.4. PCR Bulguları

Tüm suşların *mecA* genine spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR testi sonucu (Şekil 3.5), 57 (% 57) stafilokok suşunun *mecA* geni taşıdığı, 43 (% 43) suşun ise taşımadığı belirlendi. KPS suşlarından 49 (49/82, % 59,8)'u *mecA* genine sahip iken 33 (33/82, % 40,2)'ü sahip değil idi. KNS suşlarının ise 8 (8/18, % 44,4)'ünün *mecA* geni taşıdığı 10 (% 55,6)'unun ise taşımadığı belirlendi (Çizelge 3.9). ADDT ve agar dilüsyon testleri sonuçlarına göre gruplandırılmış olan suşların *mecA* genini

taşıma durumları çizelge 3.9 ve çizelge 3.10' da sunulmuştur. Yapılan testler sonucunda hem fenotipik olarak hemde genotipik olarak metisiline dirençli suş sayısının 20, duyarlı suş sayısının ise 25 olduğu görülmektedir (Çizelge 3.10).

VanA genine spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR testi sonucu gerek fenotipik olarak vankomisine duyarlı bulunan 90 suşun gerekse vankomisine duyarlılığı azalmış olarak belirlenen 10 suşun bu geni taşımadığı belirlendi (Şekil 3.6).



Şekil.3.5. Bazı suşların *mecA* için yapılan PCR sonuçları.

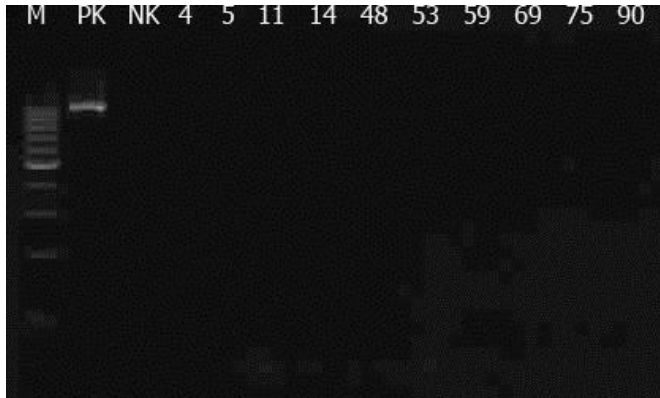
M (Marker, 100bp DNA ladder);

PK (Pozitif kontrol suşu, *S. aureus* ATCC4300, *mecA* +, 314 bp);

NK (Negatif kontrol suşu, *S. aureus* ATCC25923, *mecA* -);

Örnekler : A1, A2, A3, A4, A5 (*S. aureus*, *mecA* +);

A6: *S. aureus*, *mecA* -).



Şekil. 3.6. Çalışmadaki vankomisine orta derecede dirençli 10 suşun *vanA* için yapılan PCR sonuçları.

M (Marker, 100bp DNA ladder);

PK (Pozitif kontrol suşu, *E. faecalis* kanatlı suşu, *VanA* +, 1030 bp);

NK (Negatif kontrol, *S. aureus* ATCC 700699, *VanA* -);

Örnekler A4, A5, A11, A14, A48, A59, A90(B14) (*S. aureus*, *VanA* -);

Örnekler A53, A69, A75 (KNS, *VanA* -).

Çizelge 3.9. Oksasilin için ADDT & PCR sonuçlarının karşılaştırması

	Stafilokok suşları			PCR		Toplam
				<i>mecA</i> +	<i>mecA</i> -	
Agar-Disk Difüzyon Tekniği	KPS (n:82)	<i>S. aureus</i> (n:65)	S	25	20	45
			I	1	4	5
			R	11	4	15
		<i>S. intermedius</i> (n:17)	S	12	5	17
			R	0	0	0
	KNS (n:18)	S	2	0	2	
R		6	10	16		
	Toplam (n:100)			57	43	100

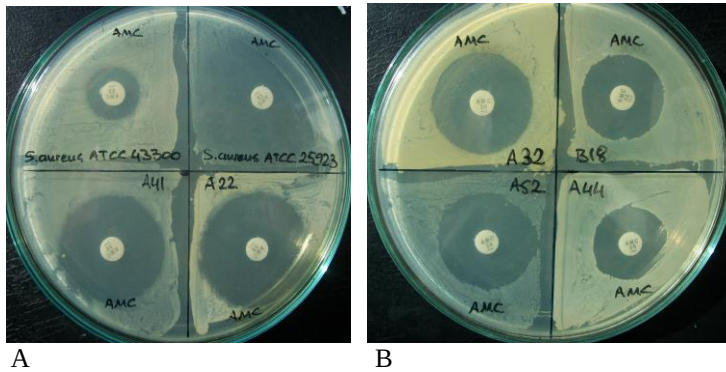
R: Dirençli, S: Duyarlı, I: Orta derecede dirençli

Çizelge 3.10. Oksasilin için agar dilüsyon tekniği & PCR sonuçlarının karşılaştırması

	Stafilokok suşları			PCR		Toplam
				<i>mecA</i> +	<i>mecA</i> -	
Agar Dilüsyon Tekniği	KPS (n:82)	<i>S. aureus</i>	S	25	20	45
		(n:65)	R	12	8	20
		<i>S. intermedius</i>	S	12	5	17
		(n:17)	R	0	0	0
	KNS (n:18)		S	0	0	0
			R	8	10	18
	Toplam (n:100)			57	43	100

R: Dirençli, S: Duyarlı, I: Orta derecede dirençli

MecA geni taşımadığı halde fenotipik testlerle dirençli oldukları belirlenen 8 *S. aureus* ve 10 KNS suşunun amoksisilin klavulanik asit kombinasyonunu içeren disk ile yapılan ADDT sonuçlarına göre tümü duyarlı oldukları belirlendi (Şekil 3.5).

Şekil 3.7. Bazı fenotipik olarak oksasiline dirençli *mecA* geni taşımayan suşların amoksisilin klavulanik asit (20/10 µg) ile yapılan ADDT sonuçları.

A) *S. aureus* ATCC43300 (MRSA, Dirençli kontrol suşu); *S. aureus* ATCC 25923 (MSSA, Duyarlı kontrol suşu); A41 (*S. aureus*, 26 mm, duyarlı); A22 (*S. chromogenes*, 30 mm, duyarlı); B) A32 (*S. xylosus*, 25 mm, duyarlı); B18 (*S. aureus*, 21 mm, duyarlı); A44 (*S. aureus*, 21 mm, duyarlı); A52 (*S. xylosus*, 25 mm, duyarlı);

4. TARTIŞMA

Süt sığırı işletmelerinde enfeksiyöz klinik ve subklinik mastitis, hayvan sağlığını etkilediği kadar süt veriminin ve kalitesinin düşmesine yol açtığından işletmenin kar oranının sürdürülebilirliğini de önemli oranda etkilemektedir (Baştan, 2002; Sabuncuoğlu ve Çoban, 2006). Türkiye, süt sığırı üretimi açısından dünyada önde gelen ülkelerden olup, 2009 yılı verilerine göre 4 133 148 baş sağılan sığır (kültür, melez ve yerli ırk) mevcuttur ve 11 583 313 ton süt üretimi yapılmıştır (TÜİK, 2010). Ülkemizde üretilen toplam sütün % 87,1'i inekten elde edilmektedir (TÜİK, 2010). Burdur ili ise 2010 yılı verilerine göre 102 795 baş sığır ve 37 844 baş buzağı ve dana sayısı ile büyükbaş hayvan yetiştiriciliğinde önemli bir ilimizdir (Tarım Bakanlığı, 2010). Süt sığırı yetiştiriciliği, Burdur ekonomisinde önemli bir yer tuttuğundan, stafilocoklardan kaynaklanan ve tedaviye zayıf yanıt veren mastitis vakalarının bölgedeki yaygınlığı, işletmelerin ekonomik kaybını azaltmak için her yönüyle üzerinde durulmasını gerektirmektedir. Bu tez çalışmasında, stafilocok mastitislerinin tedavisinde veteriner hekimler tarafından yaygın olarak kullanılan beta-laktam grubu antibiyotiklere dirençliliğinin temel göstergesi olan metisilin dirençliliğinin, mastitis vakalarından izole edilen stafilocok suşlarında araştırılması amaçlandı. Ayrıca, beşeri hekimlikte metisilin dirençli stafilocok enfeksiyonlarının tedavisinde son seçenek olarak değerini koruyan vankomisin için bu suşların duyarlılıkları araştırıldı.

Enfeksiyöz etkenlerden kaynaklanan mastitislerde stafilocok etkenleri en başta gelmektedir (Arda ve İstanbulluoğlu, 1979; Mc Donalds, 1979; Tenhagen ve ark., 2006; Olde Riekerink ve ark., 2008; Pyörala ve Taponen, 2009). Yapılan araştırmaların sonuçları, çalışmaların yapıldığı coğrafik bölgeye, işletme tiplerine ve çalışma sürülerinin seçimindeki kriterlere göre değişmekle birlikte, mastitis vakalarından izole edilen mikroorganizmaların genellikle % 30-50'sini stafilocokların oluşturduğu yönündedir (Sargeant ve ark., 1998; Giannechini ve ark., 2002; Tel ve ark., 2009). Bu çalışmada da mastitis problemlili olan sığırların % 58,9 (63/107)'undan stafilocok izole edildi. Enfekte meme lobu açısından değerlendirildiğinde ise meme loblarının % 41,5 (127/306)'inin stafilocok etkeni taşıdığı belirlendi.

Çalışmada izole edilen 100 stafilokok suşunun 82 (% 82)'si KPS suşları olarak tanımlandı ve bunların da 65'inin *S. aureus* ve 17'sinin *S. intermedius* suşlarından oluştuğu belirlendi. Geriye kalan 18 (% 18) suş ise KNS suşları olarak izole edildi. *S. aureus* suşlarının izole edilen KPS suşları içindeki oranı % 79,3 (65/82) olarak belirlendi. Bu sonuçlar, bölgede, Türkiye'de ve dünyanın diğer bölgelerinde yapılmış olan *S. aureus*'un KPS türleri ve tüm stafilokok türleri içerisinde sığır mastitis vakalarından izole edilen en yaygın tür olduğunu gösteren çalışmaların sonuçları ile uyumlu bulundu (Nickerson ve ark., 1995; Waage ve ark., 1999; Turutoglu ve ark., 2002). *S. intermedius*'un tüm suşlardaki oranı ise % 17 olarak bulundu. Bu oran daha önceki bildirilere göre biraz yüksek bulunmaktadır (Hodges ve ark., 1984; Capurra ve ark. 1999). Ancak, Vural ve ark. (1999), laktasyondaki aylara göre stafilokok suşlarının izole edilme oranlarına baktıklarında, laktasyonun 3. ve 4. aylarında izole edilen *S. intermedius* oranının daha yüksek olduğunu gözlemlemişler ve çalışmalarında, laktasyonun 3. ayında izole edilen stafilokok suşlarının % 13,05'inin *S. intermedius* olduğunu açıklamışlardır. Bu çalışmada, süt numunelerinin toplandığı ineklerin laktasyon evreleri kaydedilmedi. Ancak süt örneklerinin, çoğunluğu laktasyonun bu evrelerindeki ineklerden toplanmış olma ihtimali *S. intermedius* sayısının bu seviyelerde çıkmasının nedeni olabilir.

KNS türleri önceleri hafif subklinik mastitisten sorumlu tutulurlarken son yıllarda yapılan çalışmalarda KNS türlerinin prevalansında artış olduğu ve KNS'lerin üzerinde durulması gerektiği vurgulanmıştır (Pitkala ve ark., 2004; Rajala-schultz ve ark., 2004; Tenhagen ve ark., 2006; Taponen ve ark., 2006; Bradley ve ark., 2007). Bu çalışmada da stafilokok suşlarının % 18'ini KNS türleri oluşturdu. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, sığır mastitislerinde KNS prevalansının % 50'leri bulduğu görülmektedir. Pitkala ve ark. (2004), Finlandiya'da ülke çapında yapılan bir sırveyde, mastitisli meme loblarından izole edilen suşların % 50'sini KNS suşlarının oluşturduğunu belirlemiştir. Rajala-Schultz ve ark. (2004), Ohio eyaletinde bir araştırma çiftliğinde mastitis vakalarının % 78'inin KNS kaynaklı olduğunu bildirmiştir. Benites ve ark (2002), mezbahada topladıkları mastitisli meme dokularının bakteriyolojik muayenesinde, izole edilen bakterilerin % 53'ünün KNS suşlarından oluştuğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, bu tez çalışmasında, KNS suşlarının

% 61,2'si (11/18) subklinik vakalardan izole edilirken, % 38,8'inin (7/18) klinik vakalardan izole edildiği görüldü. Bu sonuç, KNS türlerinin daha çok subklinik enfeksiyonlara yol açtığını belirten araştırmacıları destekler niteliktedir (Pyörala ve Taponen, 2009). Diğer taraftan, KNS izolatlarının tür identifikasyonu sonuçları dünyanın diğer bölgelerinde yapılan çalışmaların sonuçları ile uyumlu bulundu. Çalışmalarda en sık izole edilen KNS türlerinin başında *S. chromogenes* ve *S. simulans* olduğu belirtilmekte (Waage ve ark., 1999; Taponen ve ark., 2006; Gillespie ve ark., 2009; Pyöral ve Taponen, 2009) ve bu çalışmada da KNS suşları içinde en fazla identifiye edilenler arasında *S. simulans* ve *S. chromogenes* suşları bulunmaktadır.

Gerek fenotipik gerekse genotipik olarak metisiline dirençli stafilokok suşlarının sığır mastitis vakalarından izole edildiğine ilişkin Türkiye'nin değişik bölgelerinde yapılmış çalışmalar mevcuttur. Fenotipik metisilin dirençliliği Erzurum bölgesinde ADDT ile *S. aureus* için % 8,7, KNS için % 1,6 (Kireççi ve Çolak, 2002); Burdur bölgesinde ADDT ile *S. aureus* için % 17,5, KNS için % 22,8 (Türütoğlu ve ark 2006); Aydın bölgesinde ADDT ile *S. aureus* için % 60 ve KNS için % 73 (Kırkan ve ark. 2005) ve Afyonkarahisar bölgesinde ADDT ile KNS için % 58,9 (Şeker ve Özenç, 2010) olarak rapor edilmiştir. Bu sonuçlardan metisilin dirençliliğinin bölgeden bölgeye farklılık gösterdiği, bununda çoğunlukla bölgedeki suşların farklı olmasından kaynaklanabildiği gibi test metotların farklı olmasından, çalışmada kullanılan örnekleme metodunun farklılığından, test edilen örnek sayısının farklılığından ve test sonuçlarını değerlendirmedeki olabilecek farklılıklardan da kaynaklanabilmektedir (Erksine ve ark. 2004). Ayrıca çalışma popülasyonlarını oluşturan sığırların yaşlarındaki, sürü büyüklüklerindeki, önceden antibiyotik uygulamasının yapılıp yapılmadığı (seleksiyon baskısı) gibi faktörlerdeki farklılıklarda çalışmalarda birbirinden oldukça farklı sonuçların çıkmasına neden olabilir. Özellikle antibiyotik kullanımı (seleksiyon baskısı) dirençli alt popülasyonların seleksiyonunu sağlamakta ve antibiyotik dirençliliği yüksek çıkabilmektedir. Rajala-Schultz ve ark. (2004), doğal mastitis vakalarından izole ettiği KNS suşlarında tespit ettiği dirençlilik oranı ile antibiyotik kullanımı arasında uyum olduğunu göstermiştir. Çoğunlukla çalışmalarda, bahsedilen bu faktörler hakkında detaylı bilgi verilmediğinden, sonuçları tam anlamıyla karşılaştırarak

değerlendirip sonuca gitmek mümkün olmamaktadır. Bu çalışmada, agar-disk difüzyon tekniği ile araştırılan 100 stafilokok suşunda fenotipik dirençlilik, ADDT ile % 31 (31/100), agar dilüsyon tekniği ile ise % 38 (38/100) olarak belirlendi. Çalışmadaki *S. aureus* için fenotipik dirençlilik ADDT ve agar dilüsyon tekniği ile sırasıyla % 23,1 (15/65) ve % 30,8 (20/65), KNS suşları için ise % 88,9 (16/18) ve % 100 (18/18) olarak belirlendi. ADDT’inde orta derecede dirençli çıkan 5 suş agar dilüsyon tekniğinde dirençli olarak belirlendi. Ayrıca, bu çalışmada KNS suşlarındaki metisilin dirençliliğinin *S. aureus* suşlarından yüksek çıkması Türütoğlu ve ark. (2006) ve Kırkan ve ark. (2005)’nin çalışmalarının sonuçları ile uyumlu bulundu. Bu sonuçlar, bölgede metisilin dirençliliğinin yüksek olduğunu ve tedaviden cevap alabilme olasılığının düşük olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada, PCR sonuçlarına göre ise toplam 100 stafilokok suşunun 43 (% 43)’ü *mecA* genini taşımaz iken, 57 (% 57)’sinin sahip olduğu görülmektedir. Suşların 20’si hem fenotipik olarak hemde genotipik olarak dirençli çıkarken, 25’i hem fenotipik olarak hem de genotipik olarak metisiline duyarlı bulundu (Çizelge 3.10). Ayrıca, *mecA* geninin mevcut olduğu 37 stafilokok suşu (25 *S. aureus* ve 12 *S. intermedius*) fenotipik olarak duyarlı bulundu (Çizelge 3.10). Böyle suşlardaki durum, *mecA* geninin ekprese olamaması yani baskılanmasına ve metisilin dirençliliğinin heterojen karakter taşımasına bağlanmaktadır.

Genel olarak, *mecA* genini taşıyan ancak fenotipik olarak duyarlı olan suşlarda *mecA* geninin ekspresyonunu kontrol eden başta regülatör genler olmak üzere (*mecI-MecRI*), diğer kromozomal genlerin, *mecA* ekspresyonunu baskıladığı bilinmektedir. Böyle suşlarda, *mecI-MecRI* regülatör bölgesi tam fonksiyoneldir ve güçlü şekilde *mecA* ekspresyonu baskılanmaktadır. *MecI-MecRI* regülatör genleri sağlam olan suşlarda beta-laktam antibiyotikler, *mecRI* regülatör genini yeterli seviyede ve hızda aktive edemez. Bir başka ifade ile oksasilin gibi beta-laktam antibiyotikler oldukça zayıf indükleyicidirler ve böylece direncin ekspresyonu kısmen veya tümüyle baskılanmış olur. Bu suşlarda, fenotipik testlerde duyarlı olarak tespit edilmektedirler. (Kuwahara-Arai ve ark., 1996; Stapleton ve Taylor, 2002). Bu suşlarda direncin gelişmesi, antibiyotiklerle karşılaşma sonrasında selektif baskı sonucu *mecI* veya *mecA* operator-promoter bölgelerinde mutasyonlar veya silinmeler (deletion) ile *mecI*’nin inaktive olması ve takiben devamlı PBP2a üretimi ile

gerçekleşmektedir (Stapleton ve Taylor, 2002). Ayrıca, *fem* faktörleri bakteri hücre duvarı peptidoglikan tabakasının oluşumuna etki ederek, dolaylı olarak metisiline karşı direnç mekanizmasında rol oynadıklarından, bunlardaki inaktivasyonlar metisilin dirençliliğinin etkilenmesiyle sonuçlanabilir (Stapleton ve Taylor, 2002).

Ayrıca, fenotipik testlerin heterojen olarak metisiline dirençli suşların ve borderline dirençli suşların belirlenmesinde yetersiz kaldığı bilinmekte ve bu durumun heterojen dirençli suşların kültürlerinde, fenotipik testlerle belirlenebilecek seviyede dirençlilik gösteren bakterilerin sayısının az olmasından ($1/10^6$) kaynaklandığı belirtilmektedir. (Brown, 2001; Gosbell ve ark., 2003). Bu az sayıdaki bakterideki direnç, *mec* elementinin dışında ilave kromozomal mutasyonlardan kaynaklandığı belirtilmektedir (Stapleton and Taylor, 2002). Böyle heterojen karakterde dirençli *mecA* geni taşıyan suşlar, fenotipik testler tarafından duyarlı olarak rapor edildiğinde, beta-laktam antibiyotik kullanımı ile dirençli alt popülasyonların varlığından dolayı tedavi başarısız olabilmektedir (Martineau, ve ark. 2000; Sakoulas ve ark., 2001). Ayrıca bir çok dış faktörün (inokulasyon miktarı, inkübasyon süresi ve sıcaklığı, besiyerinin pH ve NaCl yoğunluğu gibi) dirençliliğin ekspresyonu üzerine etkili olmakta ve fenotipik testlerin sonuçlarını etkilemektedir (Brown, 2001; Brown ve ark., 2005). Benzer şekilde, Sareyyüpoğlu ve ark. (2006), Ankara'nın Haymana ilçesinde mastitisli ineklerden izole ettiği *S. aureus* suşlarında fenotipik dirençlilik tespit etmez iken (% 0), PCR ile *mecA* geninin suşların % 3,1'inde bulunduğunu belirlemiştir. Bu çalışmada da, *S. aureus* suşlarında fenotipik direnç % 30,8 (20/65) iken *mecA* geni taşıma oranı % 56,9 (37/65) olarak belirlendi (Çizelge 3.10).

Diğer taraftan bu çalışmada fenotipik testlerle dirençli bulunan 20 *S. aureus* suşunun 12 (% 60)'sinin *mecA* geni taşıdığı, 8 (% 40)'inin *mecA* genini taşımadığı, 18 fenotipik testlerle dirençli bulunan KNS suşlarının 8 (% 44,4)'inin *mecA* geni taşıdığı, 10 (% 55,6)'unun ise *mecA* genini taşımadığı görüldü (Çizelge 3.10). Benzer şekilde, Türütoğlu ve ark. (2009), fenotipik olarak dirençli bulduğu 18 *S. aureus* suşunun 3 (% 16,7)'ünün *mecA* genini taşıdığını, Kore'de Moon ve ark. (2007) fenotipik metotlarla belirlenen 21 MRSA suşunun 13(% 61,9)'ünde *mecA* geninin bulunduğunu, Kumar ve ark. (2010), Hindistanda yaptıkları çalışmada, fenotipik olarak metisiline dirençli bulduğu *S. aureus* suşlarının % 77'sinin *mecA* geni

taşıdığını rapor etmiştir. Sareyyüpoğlu ve ark. (2006), Ankara'nın Çubuk ilçesindeki mastitis vakalarından izole edilmiş *S. aureus* suşlarında, fenotipik dirençliliği % 58,6 genotipik dirençliliği ise % 31 olarak belirlemiştir. Böyle fenotipik testlerle dirençli bulunup *mecA* geni taşımayan suşlardaki direnç için değişik mekanizmalar sorumlu tutulmaktadır. Bunlar, aşırı beta laktamaz üretimi, aşırı PBP'lerin üretimi ve PBP'lerde nokta mutasyonları olarak sayılabilir (Chambers, 1997; Gülay, 2002; Sancak, 2007). Ancak, amoksisilin klavulanik asit kombinasyonu ile yapılan disk difüzyon testinde bu suşların (10 KNS ve 8 *S. aureus* suşu) duyarlı olduğu görüldü ve çalışmadaki bu suşlardaki fenotipik dirençliliğin aşırı beta-laktamaz üretiminden kaynaklandığı belirlendi. Ancak bu durum, böyle suşlarda fenotipik metisilin dirençliliğinde diğer mekanizmaların tamamıyla olmayacağı anlamına gelmeyeceği belirtilmektedir (Martineau ve ark., 2000).

KNS suşlarında, ADDT ile metisiline dirençlilik oranı % 88,9 (16/18) çıkarken, agar dilüsyon duyarlılık tekniği ile tümünün (%100) MİK değeri 0,5 µg/ml üzerinde bulunduğundan tümü dirençli olarak tespit edildi (Çizelge 3.10). CLSI'nın 1999'da KNS suşları için kritik MİK değerlerini değiştirmeden önceki kritik değerlere göre sonuçlar değerlendirildiğinde ise (MİK 4 µg/ml ve üzeri dirençli, 2 µg/ml ve aşağısı duyarlı) KNS suşlarının sadece 5 (% 27,8)'i dirençli çıkmaktadır.

Agar dilüsyon tekniği, ADDT'de orta derecede dirençli çıkan 5 *S. aureus* suşunun ve duyarlı çıkan 2 KNS suşunun dirençli bulunması dışında diğer tüm suşlarda ADDT ile aynı sonuçları verdi. Bu durum, agar dilüsyon tekniğinin yüksek duyarlılığa sahip olmasından ve heterojen dirençli suşları belirleyebilmede daha etkin olmasından kaynaklanmaktadır ve nitekim bu nedenlerden dolayı CLSI tarafından standart test olarak kabul edilmektedir (CLSI, 2006b; Hanlon ve ark. 2007). Ayrıca, ADDT sonuçları çevre şartlarında kolaylıkla etkilenmekte olup dirençli suşların tümü ve borderline heterojen dirençli suşlar belirlenemeyebilmektedir (Brown, 2001). Diğer taraftan, aşırı beta-laktamaz üreten suşlar dar inhibisyon zonu oluşturabilmektedir (Brown, 2001). Bu nedenle, PCR ile *mecA* geninin araştırılması ve birden fazla fenotipik testin kullanılması gerçek *mecA* kökenli metisilin dirençli suşların belirlenmesi açısından önerilmektedir (Brown, 2001). Bu çalışmada, ikinci bir fenotipik test olarak agar dilüsyon tekniği kullanıldı.

Vankomisin, MRSA ve metisilin dirençli KNS türlerinin yol açtığı enfeksiyonlarda son seçenek olarak önemini korumakta olup, hastane kökenli ve toplum kökenli olan bu enfeksiyonların tedavisinde beşeri hekimlikte yaygın biçimde kullanılmaktadır. Yapılan gerek fenotipik gerek genotipik çalışmalarda hayvanlardan izole edilmiş stafilocok suşlarında *vanA* geni taşıyan vankomisin dirençli suşa rastlanılmamıştır (Pereira ve Siqueira-Júnior, 1995; Huber ve ark., 2010; Kumar ve ark., 2010; Türkyılmaz ve ark., 2010). Bu çalışmanın sonuçları da yapılan çalışmalarla uyumlu bulundu ve test ettiğimiz 100 stafilocok suşunun tümü ADDT’de duyarlı olarak bulundu. Ayrıca, bugüne kadar bilinen VRSA suşlarının, uzun bir süre vankomisin tedavisi almış olan hasta kişilerden izole edilmiş olduğu ve Türkiye’de vankomisin içeren bir preparatın veteriner hekimlikte kullanımının mevcut olmadığı düşünüldüğünde, sığır mastitis vakalarından vankomisin dirençli stafilocok suşunun izole edilme olasılığı düşük olmaktadır. Ancak daha duyarlı test olan ve referans test olarak bilinen agar dilüsyon tekniği ile 10 suş (7 *S. aureus* ve 3 KNS), vankomisine orta derecede dirençliliği işaret eden MİK değeri (MİK:4-8 µg/ml) verdi. Bu sonuçlar, vankomisine duyarlılığı azalmış suşların sığır mastitis vakalarından izole edilebileceğini göstermektedir. ADDT ile agar dilüsyon tekniği sonuçları arasında şekillenen bu farklılık, vankomisin dirençliliğinin heterojen karakterde olabilmesi ve MİK değeri farklı alt popülasyonlarının bulunmasından kaynaklanmış olabilmektedir. Popülasyon Profil Analiz yöntemi ile bu suşlardaki durumun homojen veya heterojen karakteri ortaya çıkartılmalıdır. Aynı şekilde, Türkyılmaz ve ark. (2010), Aydın bölgesinde sığırların mastitis vakalarından izole edilmiş 16 MRSA suşunun vankomisin için MİK değerlerini agar dilüsyon tekniği ile araştırmış ve bunların 7’sinin MİK değerini 4 µg/ml olarak yani duyarlılığı azalmış suş olarak bulmuştur.

CLSI tarafından vankomisin dirençliliğinin belirlenmesinde, ADDT kullanımının yanlış sonuçlar verebilmesinden dolayı güvenilir olmadığı, bu nedenle agar dilüsyon tekniği gibi referans ikinci bir testin kullanımının gerekliliği belirtilmektedir (CLSI, 2006b). Bu çalışmada da, agar dilüsyon tekniği kullanılarak CLSI’nin önerileri doğrultusunda çalışılmış olundu ve bu çalışmanın sonuçlarının güvenilirliğini artırmaktadır.

Yapılan *vanA* spesifik PCR sonuçlarına göre, fenotipik testlerle gerek duyarlı çıkan 90 suşun gerekse duyarlılığı azalmış bulunan 10 suşun hiçbirinin söz konusu geni taşımadığı belirlendi. Bu sonuçlarda, Aydın bölgesinde Türkyılmaz ve ark. (2010)'nın, PCR ile test ettiği 7 VISA suşunda *vanA* geninin bulunmadığını gösteren bulguları ile uyumlu bulundu. Bu şekilde vakomisine duyarlılığın azalması, bakteri hücre duvarı peptidoglikan biyosentezindeki oluşan değişiklikle açıklanabilmektedir. Böyle suşlarda peptidoglikan sentezi artmıştır. Ayrıca, peptidoglikan zincirindeki çapraz bağlanmalarda azalma şekillenmiş ve D-alanin-D-alanin rezidülerinin sayısında artış olmuştur. Bu değişiklikler kapan etkisi yapmakta ve vankomisin molekülleri bu fazlaca bulunan D-alanin-D-alanin rezidüleri tarafından tutulduğunda, vankomisin molekülleri bakteri yüzeyinde birikerek diğer vankomisin moleküllerinin bakteri hücre duvarı sentezinin gerçekleştiği plazmik membrana yakın yerdeki hedef bölgelere ulaşması engellenmiş olmaktadır (Hiramatsu ve ark., 1997a; Hanaki ve ark., 1998; Geisela ve ark., 1999; Hiramatsu, 2001).

Çalışmada, KNS suşlarının % 16,7 (3/18)'si ve *S. aureus* suşlarının % 10,8 (7/65)'i VISA suşu olarak belirlendi. Bu durum, KNS suşlarının *S. aureus* suşlarına göre daha yüksek antibiyotik dirençliliği geliştirdiklerine ilişkin bildirimleri desteklemektedir (Pitkala ve ark., 2004; Taponen ve Pyörala, 2009). Türkiye'de Nakipoglu ve ark. (2005), İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yaptığı çalışmada, 54 KNS suşunun 7'sinde vankomisine azalmış duyarlılık tespit ederken inceledikleri 82 *S. aureus* suşunun tümünü duyarlı olarak belirlemişlerdir.

Mastitis kaynaklı stafilokokların, başta sağım esnasında ve sütün işlenmesi sırasında olmak üzere çeşitli yollarla insanlara geçip enfeksiyon oluşturma olasılığı bulunmaktadır. Bu çalışmada, metisilin dirençli suşlara rastlanıldığından dolayı MRSA suşlarının insanlara bulaşma riski vardır ancak suşların vankomisine dirençli olmaması, bu yolla insanlarda hayatı tehdit edici tedavisi güç enfeksiyonların oluşma riskini ortadan kaldırmaktadır. Fakat, çalışmada vankomisine duyarlılığı azalmış suşların bulunmuş olması dikkat çekici olup, heterojen karakterde vankomisine orta derecede dirençli olmaları durumunda, vankomisin kullanımı ile MİK değeri 4-8 µg/ml olan alt populasyonların, seleksiyon baskısı ile homojen dirençli VISA suşlarının gelişimi için prekürsör olarak rol oynayabilme olasılıkları bulunmaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Klinik ve subklinik mastitis problemlili meme loblarından izole edilen stafilokok suşlarının metisilin ve vankomisin için duyarlılıklarının araştırılması amacıyla yapılan bu tez çalışması sonucunda aşağıdaki sonuçlara varılmıştır:

- Stafilokok türlerinin Burdur bölgesi'ndeki sığır mastitislerinden önemli derecede sorumlu olduğu,
- Bu suşlarda, gerek fenotipik olarak gerekse genotipik olarak metisilin dirençliliğinin yaygın olduğu, vankomisin dirençliliğinin ise fenotipik olarak sadece duyarlılığı azalmış suşların olduğu ancak genotipik olarak dirençliliğinin olmadığı,
- Fenotipik olarak dirençliliğinin tespitinde birden fazla testin uygulanmasının metisilin ve vankomisin dirençliliğinin heterojen karakterde olabilmesinden dolayı gerektiği, vankomisin duyarlılığı azalmış suşların CLSI'nın önerdiği biçimde ancak agar dilüsyon tekniği gibi duyarlılığı yüksek olan ve MİK değerini veren referans testlerle yapılması gerektiği,
- MecA* geni henüz eksprese olmayan suşların olduğu, böyle suşların ortaya konulmasının önemli olduğu ve bunu için fenotipik testlerin yanında PCR ile bu genin varlığının araştırılması gerektiği,
- Sadece fenotipik olarak metisiline dirençli olup, *mecA* geni taşımayan suşların olduğu,
- Vankomisin dirençli suşun çıkmamasının suşların zoonoz karakterinden dolayı halk sağlığı yönünden bir riskin olmadığı ancak duyarlılığı azalmış suşların bulunmasının önemli olduğu sonucuna varıldı.
- Ayrıca, bölgede metisilin dirençli stafilokok mastitislerinin yaygınlığından dolayı koruma yöntemlerine önem verilmesi gerektiği sonucuna varıldı.

ÖZET

Mastitisli Sığır Sütlerinden İzole Edilen Stafilocok Türlerinde Metisilin ve Vankomisin Dirençliliğinin Fenotipik ve Genotipik Analizi

Bu tez çalışmasında, Burdur bölgesinden toplanan subklinik ve klinik mastitisli inek sütlerinden izole edilen stafilocok suşlarında metisilin ve vankomisin dirençliliğinin fenotipik ve genotipik metodlarla araştırılması amaçlandı. Bu amaçla, 121 klinik mastitisli ve 185 subklinik mastitisli olmak üzere toplam 306 meme lobundan alınan süt örnekleri kanlı agara ekilip 37 °C’de 24 saat inkübasyonda tutuldu. Stafilocok suşlarının izolasyon ve identifikasyonu, koloni görünimleri, Gram boyama ile mikroskopik görünimleri ve biyokimyasal testler kullanarak gerçekleştirildi.

Öncelikle, agar-disk difüzyon tekniği ile tüm suşların oksasilin ve vankomisin için fenotipik dirençlilik durumlarının belirlenmesinin ardından, ikinci bir fenotipik test olarak agar dilüsyon tekniği ile oksasilin ve vankomisin için MİK değerleri de belirlendi. Bu testler, CLSI’nın metisilin ve vankomisin için önerdiği protokoller takip edilerek gerçekleştirildi ve test sonuçları CLSI’nın kritik değerlerine göre değerlendirildi. Son olarak, tüm suşların, *mecA* ve *vanA* genlerine spesifik primerler kullanılarak PCR ile genotipik dirençlilik durumları araştırıldı.

Süt örneklerinden 82’si KPS, 18’i KNS olmak üzere toplam 100 stafilocok suşu izole ve identifiye edildi. KPS suşlarının 65’i *S. aureus* olarak, 17’si *S. intermedius* olarak identifiye edildi. KNS suşlarının tür dağılımının ise 4 *S. simulans*, 3’er *S. chromogenes*, *S. lugdunensis* ve *S. xylosus*, 2 *S. haemolyticus*, 1’er *S. hominis* subsp. *hominis* ve *S. cohnii* subsp. *urealyticum* şeklinde olduğu belirlendi.

Agar-disk difüzyon tekniği ile yapılan antibiyogram testinde, oksasiline karşı *S. aureus* suşlarının 15’i dirençli, 5’i orta derecede dirençli ve 45’i ise duyarlı bulurken, KNS suşlarının 16’sı dirençli 2’si ise duyarlı bulundu. Agar dilüsyon tekniği ise agar-disk difüzyon tekniğinde orta derecede dirençli çıkan 5 *S. aureus* suşunun ve duyarlı çıkan 2 KNS suşunun dirençli çıkmaları dışında aynı sonuçları verdi. *S. intermedius* suşlarının tümü ise her iki test sonucuna göre duyarlı bulundu. Vankomisin için yapılan agar-disk difüzyon tekniğinde ise tüm suşlar duyarlı çıkarken, agar dilüsyon tekniği’nde ise 10 suşun (7 *S. aureus* ve 3 KNS) vankomisine duyarlılığı azalmış suş (MİK: 4-8 µg/ml) oldukları belirlendi.

PCR sonuçlarına göre ise toplam 100 suşun 57’sinde *mecA* geni varlığı tespit edilirken *vanA* geni ise hiçbir suшта belirlenmedi. Hem fenotipik olarak hem genotipik olarak metisiline dirençli ve duyarlı bulunan suşların sayısı, sırası ile 20 ve 25 olarak belirlendi.

Sonuç olarak, Burdur bölgesinde sığır mastitislerinden sorumlu stafilocok suşlarında metisilin dirençliliğinin yüksek olduğu, *mecA* geni aktif olmayan suşların bulunduğu gibi sadece fenotipik olarak dirençli olan suşlarında bulunduğu; vankomisin açısından ise, vankomisin dirençli suşun bulunmadığı ancak duyarlılığı azalmış suşlarının bulunmasının dikkat çekici olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar sözcükler: *MecA*, metisilin, *Staphylococcus* spp., *vanA*, vankomisin.

SUMMARY

Phenotypic and genotypic methicillin and vancomycin resistance analysis of *Staphylococcus* species isolated from cattle milk samples with mastitis

In this study, determination of resistance to methicillin and vancomycin, by phenotypic and genotypic methods, in staphylococcus strains isolated from subclinical and clinical mastitic milk samples collected from the city of Burdur was aimed. For this purpose, 306 quarter milk samples, from udder with 121 clinical and 185 subclinical mastitis, were streaked to blood agar and the plates were incubated at 37 °C, in aerobic condition for 24 hours. Isolation and identification of *Staphylococcus* strains were performed based on colony characteristics, microscopical characteristics after Gram staining and biochemical tests.

Firstly, phenotypical resistance of all staphylococcus strains in the study to oxacillin and vancomycin was determined by agar-disc diffusion technique and then MIC values for oxacillin and vancomycin were determined by a second phenotypic test, agar dilution technique. In these antimicrobial susceptibility tests, CLSI protocols were followed and the results were evaluated according to CLSI critical values.

Total 100 *Staphylococcus* strains, 82 CPS and 18 CNS, were isolated. Sixty five of CPS strains were identified as *S. aureus* and 17 were identified as *S. intermedius*. CNS strains were identified as *S. simulans* (n:4), *S. chromogenes* (n:3), *S. lugdunensis* (n:3) ve *S. xylosus* (n:3), *S. haemolyticus* (n:2), *S. hominis*, subsp. *hominis* (n:1) and *S. cohnii*. subsp. *urealyticum* (n:1).

According to oxacillin agar-disc diffusion technique results, 15, 5 and 45 out of 65 *S. aureus* strains were determined as resistant, intermediate resistant and sensitive; 16 and 2 out of 18 CNS strains were determined resistant and sensitive to oxacillin, respectively. In agar dilution technique, the similar results were obtained, except 5 intermediate resistant *S. aureus* strains and 2 sensitive CNS strains in agar-disc diffusion technique were found resistant. All *S. intermedius* strains were found susceptible in both techniques. In vancomycin agar-disc diffusion technique, all strains were found sensitive but in agar dilution technique 10 strains (7 *S. aureus* and 3 CNS) had reduced susceptibility to vancomycin.

In PCR, although the presence of *mecA* gene were determined in 57 out of 100 strains, none of the strains had *vanA* gene. The number of strains with both phenotypically and genotypically resistant and susceptible to methicillin were found as 20 and 25, respectively.

In conclusion, we suggest that methicillin resistance in staphylococcus strains responsible from mastitis in cattle in Burdur province is high and the strains having nonexpressed *mecA* gene and the strains with only phenotypically resistant to methicillin are present; in terms of vancomycin resistance there is no resistant staphylococcus strains but presence of strains with reduced susceptibility to vancomycin is noteworthy.

Key words: *MecA*, methicillin, *Staphylococcus* spp., *vanA*, vancomycin.

KAYNAKLAR

- AKAN, M. (2006). Staphylococcus infeksiyonları. *Veteriner Mikrobiyoloji*. Ed.: N. Aydın, J. Paracıkoğlu. İlke-Emek yayınları. Olgunlar Sokak 26/B, Bakanlıklar/Ankara. s.: 5-13.
- AKINEDEN, O., ANNEMULLER, C., HASSAN, A.A., LAMMLER, C., WOLTER, W., ZSCHOCK, M. (2001). Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8 : 959-964.
- ANDRESEN, L.O. (2005). Production of exfoliative toxin by isolates of *Staphylococcus hyicus* from different countries. *Vet. Rec.* 157 : 376-378.
- APPELBAUM, P.C. (2007). Microbiology of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* 45 : 165-170.
- ARDA, M., İSTANBULLUOĞLU, E. (1979). Mastitislere neden olan aerob, anaerob, mikoplasma ve mantarların izolasyonu, identifikasyonu, bunlara karşı etkili olan antibiyotik ve fungusitlerin saptanması. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* 26 : 14-29.
- ARDA, M. (2000). Pratik Bakteriyoloji. Bazı Önemli Biyokimyasal Testler. *Temel Mikrobiyoloji*, 2. Baskı (Genişletilmiş), Medisan Yayın Serisi No 46, Medisan Yayınevi, Ankara. s.: 294-314.
- ARIZA, J., PUJOL, M., CABO, J., PENA, C., FERNANDEZ, N., LINARES, J., AYATS, J., GUDIOL, F. (1999). Vancomycin in surgical infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin. *Lancet.* 353 : 1587-1588.
- BALABAN, N., RASOOLY, A. (2000). Staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* 61 : 1-10.
- BASELGA, R., ALBIZU, I., DE LA CRUZ, M., DEL CACHO, E., BARBERAN, M., AMORENA, B. (1993). Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implications in colonization and virulence. *Infect. Immun.* 61 : 4857-4862.
- BAŞTAN, A. (2002). *İneklerde Meme Hastalıkları*. Şahin Matbaası, Ankara.
- BENITES, N.R., GUERRA, J.L., MELVILLE, P.A., da COSTA E.O. (2002). Aetiology and histopathology of bovine mastitis of spontaneous occurrence. *J. Vet. Med. B.* 49 : 366-370.
- BERGER-BACHI, B. (1995). Factors affecting methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 6 : 13-21.
- BERGER-BACHI, B. (1999). Genetic basis of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Cell. Mol. Life Sci.* 56 : 764-770.
- BERGER-BACHI, B., ROHRER, S. (2002). Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. *Arch. Microbiol.* 178 : 165-171.
- BIAVASCO, F., GIOVANETTI, E., MONTANARI, M.P., LUPIDI, R., VARALDO, P.E. (1991). Development of in-vitro resistance to glycopeptide antibiotics: assessment in staphylococci of different species. *J. Antimicrob. Chemother.* 27 : 71-79.
- BIAVASCO, F., VIGNAROLI, C., LAZZARINI, F., VARALDO, P.E. (2000). Glycopeptide susceptibility profiles of *Staphylococcus haemolyticus* bloodstream isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44 : 3122-3126.

- BLACK, J.G. (1996). Characteristics of prokaryotic and eukaryotic cells. In: *Microbiology Principles and Applications*. 3rd Ed. Ed: D. K. Brake. Prentice-Hall, Inc. Simon and Schuster, A viacom company, New Jersey, USA. p.: 74-108.
- BOYNUKARA, B., GULHAN, T., ALISARLI, M., GURTURK, K., SOLMAZ, H. (2008). Classical enterotoxigenic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Van, Turkey. *Int. J. Food Microbiol.* 125 : 209-211.
- BRADLEY, A. (2002). Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet. J.* 164 : 116-128.
- BRADLEY, A.J., LEACH, K.A., BREEN, J.E., GREEN, L.E., GREEN, M.J. (2007). Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *Vet. Rec.* 160 : 253-258.
- BROWN, D.F. (2001). Detection of methicillin/oxacillin resistance in Staphylococci. *J. Antimicrob. Chemother.* 48 : 65-70.
- BROWN, D.F.J., EDWARDS, D.I., HAWKEY, P.M., MORRISON, D., RIDGWAY, G.L., TOWNER, K.J., WREN, M.W.D. (2005). Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J. Antimicrob. Chemother.* 56 : 1000-1018.
- BROWN, M. (1999). The gram positive bacteria: Staphylococci. In: *VEM 5141 Veterinary Microbiology Laboratory Textbook*. University of Florida, USA. p.: 32-41.
- CALDERON, C.B., SABUNDAYO, B.P. (2007). Antimicrobial Classifications: Drugs for bugs. In: *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*. Ed.: R. Schwalbe, L. Steele-Moore, A. C. Goodwin. CRC Press, Taylor and Francis Group. Boca Raton, Florida, USA. p.: 7-53.
- CAPURRO, A., CONCHA, C., NILSSON, L., OSTENSSON, K. (1999). Identification of coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *Acta Vet. Scand.* 40 : 315-21.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2002). *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin— United States, *MMWR*. 51 : 565-567.
- CDC (2004). Brief Report: Vancomycin resistant *S. aureus*-New York. *MMWR*. 53 : 322-323.
- CENGİZ, A.T. (1999). Staphylococcus. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ed: Ş. Ustaçelebi. Güneş Kitabevi, Ankara. s.: 339-347.
- CHABBERT, Y.A., BAUDENS, J.G. (1962). Staphylococcus strains naturally resistant to methicillin and 5-methyl-3-phenyl-4-iso-oxazolyl-penicillin. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*. 103 : 222-230.
- CHAMBERS, H.F., 1997. Methicillin resistance in Staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* 10 : 781-791.
- CHAMBERS, H.F., HACKBARTH, C.J. (1987). Effect of NaCl and nafcillin on penicillin-binding protein 2a and heterogeneous expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31 : 1982-1988.
- CHANG, S., SIEVERT, D.M., HAGEMAN, J.C., BOULTON, M.L., TENOVER, F.C., DOWNES, F.P., SHAH, S., RUDRIK, J.T., PUPP, G.R., BROWN, W.J., CARDO, D., FRIDKIN, S.K. (2003). Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *N. Engl. J. Med.* 348 : 1342-1347.

- CHOI, S.M., KIM, S., KIM, H., LEE, D.G., CHOI, J.H., YOO, J.H., KANG, J.H., SHIN, W.S., KANG, M.W. (2003). Multiplex PCR for the detection of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes and methicillin resistance among *Staphylococcus* species. *J. Korean Med. Sci.* 18 : 631-636.
- CIFRIAN, E., GUIDRY, A.J., BRAMLEY, A.J., NORCROSS, N.L., BASTIDA-CORCUERA, F.D., MARQUARDT, W.W. (1996). Effect of staphylococcal β toxin on the cytotoxicity, proliferation and adherence of *Staphylococcus aureus* to bovine mammary epithelial cells. *Vet. Microbiol.* 48 : 187-198.
- CLARK, N.C., COOKSEY, R.C., HILL, B.C., SWENSON, J.M., TENOVER, F.C. (1993). Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from U.S. hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37 : 2311-2317.
- CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE) (2006a). *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test*. Approved standard. M2-A9, 9th ed., Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, P.A.
- CLSI (2006b). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility testing for bacteria that grow aerobically*. Approved standard M7-A7, 7th ed., Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- CLSI (2006c). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. 16th informational supplement, Approved standard M100-S16, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- CLSI (2007). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. 17th informational supplement, Approved standard M100-S17, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- CLSI (2008). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. 18th informational supplement, Approved standard M100-S18, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- CLSI (2010). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. 20th informational supplement, Approved standard M100-S20, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- COURVALIN, P. (2006). Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin. Infect. Dis.* 42 : 25-34.
- DEVRIESE, L.A., VANDAMME, L.R., FAMEREE, L. (1972). Methicillin (cloxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. *Zbl. Vet. B.* 19 : 598-605.
- DINGES, M.M., ORWIN, P.M., SCHLIEVERT, P.M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 13 : 16-34.
- ERKSINE, R., CULLOR, J., SCHAELLIBAUM, M., YANCEY, B., ZECCONI, A. (2004). Bovine mastitis pathogens and trends in resistance to antibacterial drugs. *NMC Annual Meeting Proceedings*. p: 400-414.
- EYCKMANS, L., TOMPSETT, R. (1965). In vivo studies on staphylococcal penicillinase. *J. Bacteriol.* 90 : 589-593.
- FITZGERALD, J.R., HARTIGAN, P.J., MEANEY, W.J., SMYTH, C.J. (2000). Molecular population and virulence factor analysis of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infection. *J. Appl. Microbiol.* 88 : 1028-1037.
- FOX, L.K. (2009). Prevalence, incidence and risk factors of heifer mastitis. *Vet. Microbiol.* 134 : 82-88.

- FOX, L.K., GAY, J.M. (1993). Contagious mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 9 : 475-487.
- FRIDKIN, S.K. (2001). Vancomycin-intermediate and resistant *Staphylococcus aureus*: what the infectious disease specialist needs to know. *Clin. Infect. Dis.* 32 : 108-115.
- GEISELA, R., SCHMITZA, F.J., THOMASA, B.L., BERNISA, G., ZETSCHEC, O., ULRICH, B., FLUITB, A.C., LABISCHINSKY, H., WITTEE, W. (1999). Emergence of heterogeneous intermediate vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates in the Düsseldorf area. *J. Antimicrob. Chemother.* 43 : 846-848.
- GIANNECHINI, R., CONCHA, C., RIVERO, R., DELUCCI, I., MORENO LOPEZ, J. (2002). Occurrence of clinical and sub-clinical mastitis in dairy herds in the west littoral region in Uruguay. *Acta Vet. Scand.* 43 : 221-230.
- GIESBRECHT, P., KERSTEN, T., MAIDHOF, H., WECKE, J. (1998). Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 : 1371-1414.
- GILLESPIE, B.E., HEADRICK, S.I., BOONYAYATRA, S., OLIVER, S.P. (2009). Prevalence and persistence of coagulase-negative *Staphylococcus* species in three dairy research herds. *Vet. Microbiol.* 134 : 65-72.
- GOSBELL, I.B., NEVILLE, S.A., MERCER, J.L., FERNANDES, L.A., FERNANDES, C.J. (2003). Detection of intrinsic oxacillin resistance in non-multiresistant, oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (NORSA). *J. Antimicrob. Chemother.* 51 : 468-470.
- GRADELSKI, E., VALERA, L., ALEKSUNES, L., BONNER, D., FUNG-TOMC, J. (2001). Correlation between genotype and phenotypic categorization of staphylococci based on methicillin susceptibility and resistance. *J. Clin. Microbiol.* 39 : 2961-2963.
- GUINANE, C.M., STURDEVANT, D.E., HERRON-OLSON, L., OTTO, M., SMYTH, D.S., VILLARUZ, A.E., KAPUR, V., HARTIGAN, P.J., SMYTH, C.J., FITZGERALD, J.R. (2008). Pathogenomic analysis of the common bovine *Staphylococcus aureus* clone (ET3): emergence of a virulent subtype with potential risk to public health. *J. Infect. Dis.* 197 : 205-213.
- GÜLAY, Z. (2002). Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Yorumu. *Thoraks Derg.* 3 : 75-88.
- HACKBARTH, C.J., CHAMBERS, H.F. (1989). Methicillin-resistant staphylococci: genetics and mechanisms of resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33 : 991-994.
- HACKBARTH, C.J., CHAMBERS, H.F. (1993). *blaI* and *blaR1* regulate beta-lactamase and PBP2a production in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37 : 1144-1149.
- HAGEMAN, J.C., PATEL, J.B., CAREY, R.C., TENOVER, F.C., MCDONALD, L.C., (2006). Investigation and control of vancomycin-intermediate and resistant *Staphylococcus aureus*: A Guide for Health Departments and Infection Control Personnel. Atlanta, Georgia, USA.
Erişim : [http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/ar/visa_vrsa_guide.pdf].
Erişim Tarihi : 22.09.2010.
- HANAKI, H., KUWAHARA-ARAI, K., BOYLE-VAVRA, S., DAUM, R.S., LABISCHINSKI, H., HIRAMATSU, K. (1998). Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. *J. Antimicrob. Chemother.* 42 : 199-209.

- HANLON, A., TAYLOR, M., DICK, J.D. (2007). Agar dilution susceptibility testing. In: *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*. Ed.: R. Schwalbe, L. Steele-Moore, A. C. Goodwin. CRC Press, Taylor and Francis Group. Boca Raton, Florida, USA. p.: 91-105.
- HARTMAN, B.J., TOMASZ, A. (1984). Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 158 : 513-516.
- HARTMAN, B.J., TOMASZ, A. (1986). Expression of methicillin resistance in heterogeneous strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29 : 85-92.
- HAVERI, M. (2008). *Staphylococcus aureus* in bovine intramammary infection: molecular, clinical and epidemiological characteristics. Academic Dissertation. Department of Production Animal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Finland.
- HIRAMATSU, K. (2001) Vancomycin-resistant *S. aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet Infect. Dis.* 1 : 147-155.
- HIRAMATSU, K., ARITAKA, N., HANAKI, H., KAWASAKI, S., HOSODA, Y., HORI, S., FUKUCHI, Y., KOBAYASHI, I. (1997b). Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *The Lancet.* 350 : 1670-1673.
- HIRAMATSU, K., HANAKI, H., INO, T., YABUTA, K., OGURI, T., TENOVER, F. C. (1997a). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.* 40 : 135-136.
- HODGES, R.T., JONES, Y.S., HOLLAND, J.T. (1984). Characterization of staphylococci associated with clinical and subclinical bovine mastitis. *N. Z. Vet. J.* 32 : 141-145.
- HOGAN, J.S., WHITE, D.G., PANKEY, J.W. (1987). Effects of teat dipping on intramammary infections by staphylococci other than *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci.* 70 : 873-879.
- HOWE, R. (2010). Automated Systems: An Overview. BSAC Standardized Disc Susceptibility Testing Method User Group Day, Cardiff.
Erişim : [<http://www.bsac.org.uk/Resources/BSAC/Robin%20Howe.ppt>].
Erişim Tarihi : 10.10.2010.
- HOWE, R.A., BOWKER, K.E., WALSH, T.R., FEEST, T.G., MACGOWAN, A.P. (1998). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* 351 : 602.
- HUBER, H., GIEZENDANNER, N., STEPHAN, R., ZWEIFEL, C. (2010). Genotypes, antibiotic resistance profiles and microarray-based characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from livestock and veterinarians in Switzerland. *Zoon. Publ. Health.* no. doi: 10.1111/j.1863-2378.2010.01353.x. 16 Eylül 2010.
- JEVONS, M.P. (1961). Celbenin-resistant Staphylococci. *Br. Med. J.* 1 : 124-125.
- KARADZHOV, I.A., MEKHANDZHIISKA, L., GERGANOVA, E. (1981). Coagulase-Negative Staphylococci isolated from the milk of cows with subclinical mastitis. *Vet. Med. Nauki.* 18 : 51-54.
- KARAHAN, M., ACIK, M.N., CETINKAYA, B. (2009). Investigation of toxin genes by polymerase chain reaction in *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Turkey. *Foodborne Pathog. Dis.* 6 : 1029-1035.

- KARTHY, E.S., RANJITHA, P., MOHANKUMAR, A. (2009). Performance of CHROM agar and oxacillin resistant screening agar base media for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from chronic wound. *Modern Applied Sciences*. 3 : 51-56.
- KASZANYITZKY, E.J., EGYED, Z., JANOSI, S.Z., KESERU, J., GAL, Z., SZABO, I., VERES, Z., SOMOGYI, P. (2004). Staphylococci isolated from animals and food with phenotypically reduced susceptibility to β -lactamase-resistant β -lactam antibiotics. *Acta Vet. Hung.* 52 : 7-17.
- KASZANYITZKY, E.J., JANOSI, S., SOMOGYI, P., DAN, A., BLOOIS, L.G., VANDUIJKEREN, E., WAGENAAR, J.A. (2007). MRSA transmission between cows and humans. *Emerg. Infect. Dis.* 13 : 630-632.
- KATO, D., HANAKI, H., CUI, L., OGURI, T., HIRAMATSU, K. (1998). In vitro susceptibilities of clinical isolates of Coagulase-Negative Staphylococci to glycopeptide antibiotics. *Jpn. J. Antibiot.* 51 : 735-745.
- KIRKAN, S., GOKSOY, E.O., KAYA, O. (2005). Identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and Coagulase Negative Staphylococci from bovine mastitis in the Aydın region of Turkey. *Turk J. Vet. Anim. Sci.* 29 : 791-796.
- KİREÇCİ, E., ÇOLAK, A. (2002). Kuru dönem başlangıcında subklinik mastitisli ineklerden izole edilen stafilokok suşlarında metisilin direnci. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.* 8 : 98-100.
- KLOOS, W.E., BANNERMAN, T.L. (1994). Update on clinical significance of Coagulase-Negative Staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 7 : 117-140.
- KONEMAN E.W., ALLEN, S.D., DOWELL, V.R., JANDA, W.M., SOMMERS, H.M., WINN, W.C. (1988). Preliminary identification of aerobic and facultatively anaerobic Gram positive cocci. In: *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 3rd Ed., J.B. Lippincott. Philadelphia.
- KUMAR, R., YADAV, B.R., SINGH, R.S. (2010). Genetic determinants of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from milk of mastitic crossbred cattle. *Curr. Microbiol.* 60 : 379-386.
- KUWAHARA-ARAI, K., KONDO, N., HORI, S., TATEDA-SUZUKI, E., HIRAMATSU, K. (1996). Suppression of methicillin resistance in a *mecA*-containing pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain is caused by the *mecI*-mediated repression of PBP 2a production. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40 : 2680-2685.
- LEE, J.H. (2003). Methicillin (Oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 : 6489-6494.
- LELOĞLU, N. (1999). Gram pozitif koklar, Staphylococcus ve Staphylococcus infeksiyonları. *Özel Mikrobiyoloji, Epidemiyoloji, Bakteriyel ve Mikotik İnfeksiyonlar*. Ed.:M. Arda, A. Minbay, N. Aydın, Ö. Akay, M. İzgür, N. Leloğlu, M. Kahraman, A. Ilgaz, K.S. Diker. 4. baskı. Medisan Yayın Serisi No:26, Ulus/Ankara. s.: 39-45.
- LEVINE, D. (2006). Vancomycin: A History. *Clin. Infect. Dis.* 42 : 5-12.
- LINA, G., PIEMONT, Y., GODAIL-GAMOT, F., BES, M., PETER, M., GAUDUCHON, V., VANDENESCH, F., ETIENNE, J. (1999). Involvement of Panton-Valentine Leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* (1999). 29 : 1128-1132.

- LÜTHJE, P., SCHWARZ, S. (2006). Antimicrobial resistance of Coagulase-Negative Staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide-lincosamide resistance phenotypes and genotypes. *J. Antimicrob. Chemother.* 57 : 966-969.
- MARTINEAU, F., PICARD, F.J., LANSAC, N., ME'NARD, C., ROY, P.H., OUELLETTE, M., BERGERON, M.G. (2000). Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44 : 231-238.
- MATTHEWS, P.R., STEWART, P.R. (1984). Resistance heterogeneity in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 22 : 161-166.
- MC DONALDS, J.S. (1979). Bovine Mastitis. *J. Dairy Sci.* 62 : 117-118.
- MCCORMICK, M.H., STARK, W.M., PITTENDER, R.C., MCGUIRE, J.M. (1956). Vancomycin, a new antibiotic. *Antibiotics Annual.* 3 : 606-611.
- MOON, J.S., LEE, A.R., KANG, H.M., LEE, E.S., KIM, M.N., PAIK, Y.H., PARK, Y.H., JOO, Y.S., KOO, H.C. (2007). Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea. *J. Dairy Sci.* 90 : 1176-1185.
- MULLIS, K.B.(1990). Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann. Biol. Clin. (Paris).* 48 : 579-582.
- MYLLYS, V., ASPLUND, K., BROFELDT, E., HIRVELA-KOSKI, V., HONKANEN-BUZALSKI, T., JUNTILA, J., KULKAS, L., MYLLYKANGAS, O., NISKANEN, M., SALONIEMI, H., SANDHOLM, M., SARANPAA, T. (1998). Bovine mastitis in Finland in 1988 and 1995-Changes in prevalence and antimicrobial resistance. *Acta Vet. Scand.* 39 : 119-126.
- NAKATOMI, Y., SUGIYAMA, J. (1998). A rapid latex agglutination assay for the detection of penicillin-binding protein 2'. *Microbiol. Immunol.* 42 : 739-743.
- NAKIPOGLU, Y., DERBENTLI, S., ATAHAN A., CAGATAY, A.A., KATRANCI, H. (2005). Investigation of Staphylococcus strains with heterogeneous resistance to glycopeptides in a Turkish university hospital. *BMC Infect. Dis.* 5 : 31.
- NAM, H.M., KIM, J.M., LIM, S.K., JANG, K.C., JUNG, S.C. (2010). Infectious aetiologies of mastitis on Korean dairy farms during 2008. *Res. Vet. Sci.* 88 : 372-374.
- NCCLS (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS). (1999). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. 9th informational supplement, Approved standard M100-S9, NCCLS, Wayne, Pennsylvania
- NCCLS (2000). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. Approved standard M7-A5, 5th ed., NCCLS, Wayne, Pennsylvania.
- NCCLS (2004). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. 14th informational supplement, Approved standard M100-S14, NCCLS, Wayne, Pennsylvania.
- NICKERSON, S.C., OWENS, W.E., BODDIE, R.L. (1995). Mastitis in dairy heifers: initial studies on prevalence and control. *J. Dairy Sci.* 78 : 1607-1618.
- NOBLE, W.C., VIRANI, Z., CREE, R.G. (1992). Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *E. faecalis* NCTC 12201 to *S. aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 72 : 195-198.

- NUNES, A.P.F., TEIXEIRA, L.M., IORIO, N.L.P., BASTOS, C.C.R., DE SOUSA FONSECA, L., SOUTO-PADRÓN, T., DOS SANTOS, K.R.N. (2006). Heterogeneous resistance to vancomycin in *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus warneri* clinical strains: characterisation of glycopeptide susceptibility profiles and cell wall thickening. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 27 : 307-315.
- OLDE RIEKERINK, R. G. M., BARKEMA H. W., KELTON, D. F., SCHOLL, D. T. (2008). Incidence rate of clinical mastitis on canadian dairy farms. *J. Dairy Sci.* 91 : 1366-1377.
- OLIVEIRA, G.A., DELL'AQUILA, A.M., MASIERO, R.L., LEVY, C.E., GOMES, M.S., CUI, L., HIRAMATSU, K., MAMIZUKA, E.M. (2001). Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 22 : 443-448.
- OWENS, W.E. (1987). Isolation of *Staphylococcus aureus* L forms from experimentally induced bovine mastitis. *J. Clin. Microbiol.* 25 : 1956-1961.
- PERICHON, B., COURVALIN, P. (2009). VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53 : 4580-4587.
- PEREIRA, M.S., SIQUEIRA-JUNIOR, J.P. (1995). Antimicrobial drug resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from cattle in Brazil. *Lett. Appl. Microbiol.* 20 : 391-395.
- PETERSSON-WOLFE, C.S., MULLARKY, I.K., JONES, G.M. (2010). *Staphylococcus aureus* mastitis: Cause, detection, and control. *Virginia Cooperative Extension*. Publication No : 404-229.
- PITKALA, A., HAVERI, M., PYÖRALA, S., MYLLYS, V., HONKANEN-BUZALSKI, T. (2004). Bovine mastitis in Finland 2001- prevalence, distribution of bacteria and antimicrobial resistance. *J. Dairy Sci.* 87 : 2433-2441.
- PLOY, M.C., GRELAUD, C., MARTIN, C., DE LUMLEY, L., DENIS, F. (1998). First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital. *Lancet*. 351 : 1212.
- PYÖRALA, S. (2003). Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet. Res.* 34 : 565-578.
- PYÖRALA, S. (2006). Treatment of clinical mastitis: local and/or systemic? short or long?. *World Buiatrics Congress 2006 - NICE, FRANCE*.
- PYÖRALA, S., TAPONEN, S. (2009). Coagulase-Negative Staphylococci-Emerging mastitis pathogens. *Vet. Microbiol.* 134 : 3-8.
- QAIYUMI, S. (2007). Macro- and microdilution methods of antimicrobial susceptibility testing. In: *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*. Ed.: R. Schwalbe, L. Steele-Moore, A. C. Goodwin. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, Florida, USA. p.: 75-81.
- RAINARD, P., CORRALES, J.C., BARRIO, M.B., COCHARD, T., POUTREL, B. (2003). Leucotoxic activities of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows, ewes, and goats with mastitis: Importance of LukM/LukF-PV leukotoxin. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10 : 272-277.
- RAJALA-SCHULTZ, P.J., SMITH, K.L., HOGAN, J.S., LOVE, B.C. (2004). Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. *Vet. Microbiol.* 102 : 33-42.

- REYNOLDS, P.E. (1989). Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 8 : 943-950.
- ROBERSON, J.R., FOX, L.K., HANCOCK, D.D., GAY, J.M., BESSER, T.E. (1996). Prevalence of Coagulase-Positive Staphylococci, other than *Staphylococcus aureus*, in bovine mastitis. *Am. J. Vet. Res.* 57 : 54-58.
- RSHM (REFİK SAYDAM HIFZISSİHHA MERKEZİ). (2010). Klinik örneklerden *Staphylococcus aureus* tanımlaması ve metisilin direncinin belirlenmesi için laboratuvar standart uygulama prosedürleri. Erişim : [<http://www.rshm.gov.tr/enfeksiyon/dosya/lab.doc>]. Erişim Tarihi : 01.10.2010.
- RYFFEL, C., KAYSER, F.H., BERGER-BACHI, B. (1992). Correlation between regulation of *mecA* transcription and expression of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 36 : 25-31.
- SABATH, L.D. (1977). Chemical and physical factors influencing methicillin resistance of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 3 : 47-51.
- SABATH, L.D., WALLACE, S.J., GERSTEIN, D.A. (1972). Suppression of intrinsic resistance to methicillin and other penicillins in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2 : 350-355.
- SABUNCUOĞLU, N., ÇOBAN, Ö. (2006). Mastitis Ekonomisi. *Atatürk Üniv. Vet. Bil. Derg.* 1 : 1-5.
- SAKOULAS, G., GOLD, H.S., VENKATARAMAN, L., DEGIROLAMI, P.C., ELIOPOULOS, G. M., QIAN, Q (2001). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA*-positive susceptible strains. *J. Clin. Microbiol.* 39 : 3946-3951.
- SAMPIMON, O.C., VERNOOIJ, J.C., MEVIUS, D.J., SOL, J. (2007). Sensitivity to various antibiotics of Coagulase-Negative Staphylococci isolated from samples of milk from Dutch dairy cattle. *Tijdschr Diergeneeskd.* 132 : 200-204.
- SANCAK, B. (2007). *Staphylococcus aureus*'ta metisilin ve vankomisin direnci. *Hacettepe Tıp Derg.* 38 : 127-134.
- SAREYYÜPOĞLU, B., CANTEKİN, Z., AKAN, M. (2006). Mastitisli sütlerden izole edilen stafilokoklarda metisilin direncinin fenotipik ve genotipik belirlenmesi. VII. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, Bildiri Özet Kitabı, s.: 98-99.
- SARGEANT, J.M., SCOTT, H.M., LESLIE, K.E., IRELAND, M.J., BASHIRI, A.. (1998). Clinical mastitis in dairy cattle in Ontario: Frequency of occurrence and bacteriological isolates. *Can. Vet. J.* 39 : 33-38.
- SCHLEGLOVA, J., BABAK, V., KLIMOVA, E., LUKASOVA, J., NAVRATILOVA, P., SUSTACKOVA, A., SEDIVA, I., RYSANEK, D. (2002). Prevalence of and resistance to anti-microbial drugs in selected microbial species isolated from bulk milk samples. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health.* 49 : 216-225.
- SCHWALBE, R.S., STAPLETON, J.T., GILLIGAN, P.H. (1987). Emergence of vancomycin resistance in Coagulase-Negative Staphylococci. *N. Engl. J. Med.* 316 : 927-931.
- SHI, D., HAO, Y., ZHANG, A., WULAN, B., FAN, X. (2010). Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in China. *Transbound. Emerg. Dis.* 57 : 221-224.

- SIERADZKI, K., VILLARI, P., TOMASZ, A. (1998). Decreased susceptibilities to teicoplanin and vancomycin among coagulase-negative methicillin-resistant clinical isolates of *Staphylococci*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42 : 100-107.
- SIEVERT, D.M., RUDRIK, J.T., PATEL, J.B., MCDONALD, L.C., WILKINS, M.J., HAGEMAN, J.C. (2008). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002-2006. *Clin. Infect. Dis.* 46 : 668-674.
- SOL, J., SAMPIMON, O.C., BARKEMA, H.W., SCHUKKEN, Y.H. (2000). Factors associated with cure after therapy of clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci.* 83 : 278-284.
- SPOHR, M., RAU, J., FRIEDRICH, A., KLITTICH, G., FETSCH, A., GUERRA, B., HAMMERL, J.A., TENHAGEN, B.A. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in three dairy herds in Southwest Germany. *Zoon. Publ. Health.*, no. doi: 10.1111/j.1863-2378.2010.01344.x. 11 July 2010.
- STAPLETON, P.D., TAYLOR, P.W. (2002). Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. *Sci. Prog.* 85 : 57-72.
- STASTKOVA, Z., KARPISKOVA, S., KARPISKOVA, R. (2009). Findings of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* in livestock. *Czech J. Food Sci.* 27 : 36-41.
- STUCKEY, S. (2007). Automated systems: An overview. In: *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*. Ed.: R. Schwalbe, L. Steele-Moore, A. C. Goodwin. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, Florida, USA. p.: 81-91.
- SUTRA, L. and POUTREL, B. (1994). Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* 40 : 79-89.
- SUTRA, L., RAINARD, P., POUTREL, B. (1990). Phagocytosis of mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* and expression of type 5 capsular polysaccharide are influenced by growth in the presence of milk. *J. Clin. Microbiol.* 28 : 2253-2258.
- SWENSON, J.M., TENOVER, F.C., THE CEFOXITIN DISK STUDY GROUP. (2005). Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp. *J. Clin. Microbiol.* 43 : 3818-3823.
- SWENSON, J.M., WILLIAMS, P.P., KILLGORE, G., O'HARA, C.M., TENOVER, F.C. (2001). Performance of eight methods, including two new rapid methods for detection of oxacillin resistance in a challenge set of *Staphylococcus aureus* organisms. *J. Clin. Microbiol.* 39 : 3785-3788.
- ŞEKER, E., ÖZENÇ, E. (2010). Mastitisli inek sütlerinden izole edilen Koagülaz Negatif Stafilokokların antibiyotik dirençlilikleri. *Y.Y.Ü. Vet. Fak. Derg.* 21 : 109 – 113.
- TAPONEN, S., PYÖRALA, S. (2009). Coagulase-Negative *Staphylococci* as cause of bovine mastitis-Not so different from *Staphylococcus aureus*?. *Vet. Microbiol.* 134 : 29-36.
- TAPONEN, S., SIMOJOKI, H., HAVERI, M., LARSEN, H.D., PYÖRALA, S. (2006). Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of Coagulase-Negative *Staphylococci* identified with API or AFLP. *Vet. Microbiol.* 115 : 199-207.
- TARIM BAKANLIĞI, BURDUR TARIM İL MÜDÜRLÜĞÜ. (2010). Erişim : [<http://www.burdur-tarim.gov.tr>]. Erişim Tarihi : 01.07.2010.

- TEL, O.Y., KESKİN, O., ZONTURLU, A.K., ARSERİM KAYA, N.B. (2009). Şanlıurfa yöresinde subklinik mastitislerin görülme oranı, aerobik bakteri izolasyonu ve duyarlı antibiyotiklerin belirlenmesi. *F.Ü. Sağ. Bil. Vet. Derg.* 23 : 101-106.
- TENHAGEN, B.A., KOSTER, G., WALLMANN, J., HEUWIESER, W. (2006). Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J. Dairy Sci.* 89 : 2542-2551.
- TENOVER, FC. (2006). Mechanisms of antibacterial resistance in bacteria. *Am. J. Infect. Control.* 34 : 3-10.
- TENOVER, F.C., JONES, R.N., SWENSON, J.M., ZIMMER, B., MCALLISTER, S., JORGENSEN, J.H., THE NCCLS STAPHYLOCOCCUS WORKING GROUP. (1999). Methods for improved detection of oxacillin resistance in Coagulase-Negative Staphylococci: results of a multicenter study. *J. Clin. Microbiol.* 37 : 4051-4058.
- TENOVER, F.C., WEIGEL, L.M., APPELBAUM, P.C., MCDUGAL, L.K., CHAITRAM, J., MCALLISTER, S., CLARK, N., KILLGORE, G., O'HARA, C.M., JEVITT, L., PATEL, J.B., BOZDOGAN, B. (2004). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 : 275-280.
- TOLLERSRUD, T., KENNY, K., REITZ, A.J., LEE, J.C. (2000). Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus* spp. from Europe and the United States. *J. Clin. Microbiol.* 38 : 2998-3003.
- TURKYILMAZ, S., TEKBIYIK, S., ORYASIN, E., BOZDOGAN, B. (2010) Molecular epidemiology and antimicrobial resistance mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. *Zoon. Publ. Health.* 57 : 197-203.
- TURUTOGLU, H., ERCELİK, S., OZTURK, D. (2006). Antibiotic resistance of *S. aureus* and Coaguase Negative Staphylococci isolated from bovine mastitis. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 50 : 41-45.
- TURUTOGLU, H., HASOKSUZ, M., OZTURK, D., YILDIRIM, M., SAGNAK, S. (2009). Methicillin and aminoglycoside resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis and sequence analysis of their *mecA* genes. *Vet. Res. Commun.* 33 : 945-956.
- TURUTOGLU, H., MUDUL, S., PEHLIVANOGLU, F. (2002). Antibiotic susceptibility and β -lactamase prevalence for Staphylococci isolated from bovine mastitic milk samples. *Acta Vet-Beograd.* 52 : 337-344.
- TÜİK (Türkiye İstatistik Kurumu) (2010). Hayvansal Üretim İstatistikleri. Erişim: [<http://www.tuik.gov.tr>]. Erişim Tarihi : 01.07.2010.
- ÜNAL, S. (1996). Stafilokoklarda melisilin direnç mekanizmaları ve metisilin direnç tespit yöntemleri. *Flora.* 1 : 14-17.
- ÜNAL, S. (2009). MRSA problemi. *ANKEM Derg.* 23 : 1-12.
- VANDERHAEGHEN, W., CERPENTIER, T., ADRIAENSEN, C., VICCA, J., HERMANS, K., BUTAYE, P. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. *Vet. Microbiol.* 144 : 166-171.
- VIRGIN, J.E., VAN SLYKE, T.M., LOMBARD, J.E., ZADOKS, R.N. (2009). Short communication: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* detection in US bulk tank milk. *J. Dairy Sci.* 92 : 4988-4991.

- VURAL, R., ESENDAL, Ö., İZGÜR, H., ASLAN, S., KILIÇOĞLU, Ç. (1999). Holstein düvelerde subklinik mastitis olguları. I. İlk laktasyon süresince meme içi enfeksiyonları. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* 46 : 287-298.
- WAAGE, S., MØRK, T., RØROS, A., AASLAND, D., HUNSHAMAR, A., ØDEGAARD, S. A. (1999). Bacteria associated with clinical mastitis in dairy heifers. *J. Dairy. Sci.* 82 : 712-719.
- WAGNER, A. (2007). Disk difüzyon test and gradient methodologies. In: *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*. Ed.: R. Schwalbe, L. Steele-Moore, A. C. Goodwin. CRC Press, Taylor and Francis Group. Boca Raton, Florida, USA , p.: 53-75.
- WANESS, A. (2010). Revisiting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *J. Global Infect. Dis.* 28 : 49-56.
- WARD, P.B., JOHNSON, P.D., GRABSCH, E.A., MAYALL, B.C., GRAYSON, M.L. (2001) . Treatment failure due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with reduced susceptibility to vancomycin. *Med. J. Aust.* 175 : 480-483.
- WEIGEL, L.M., CLEWELL, D.B., GILL, S.R., CLARK, N.C., MCDOUGAL, L.K., FLANNAGAN, S.E., KOLONAY, J.F., SHETTY, J., KILLGORE, G.E., TENOVER, F.C. (2003). Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science*. 302 : 1569-1571.
- WEIGEL, L.M., DONLAN, R.M., SHIN, D.H., JENSEN, B., CLARK, N.C., MCDOUGAL, L.K., ZHU, W., MUSSER, K.A., THOMPSON, J., KOHLERSCHMIDT, D., DUMAS, N., LIMBERGER R.J., PATEL, J.B. (2007). High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51 : 231-238.
- WELCH, W.D., SOUTHERN, P.M. (1984). Unusual susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to erythromycin, clindamycin, gentamicin, and tetracycline at 30 degrees C but not at 35 degrees C. *J. Clin. Microbiol.* 19 : 831-833.
- WINN, W.Jr., ALLEN, S., JANDA, W., KONEMAN, E., PROCOP, G., SCHRECKENBERGER, P., WOODS, G. (2006). *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th Ed. Lippincott Williams and Wilkins. Baltimore, MD, USA.
- WONG, S.S., HO, P.L., WOO, P.C., YUEN, K.Y. (1999). Bacteremia caused by *Staphylococci* with inducible vancomycin heteroresistance. *Clin. Infect. Dis.* 29 : 760-767.
- WOOTTON, M., HOWE, R.A., HILLMAN, R., WALSH, T.R., BENNETT, P.M., MACGOWAN, A.P. (2001). A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* 47 : 399-403.
- YOUNIS, A., LEITNER, G., HELLER, D.E., SAMRA, Z., GADBA, R., LUBASHEVSKY, G., CHAFFER, M., YADLIN, N., WINKLER, M., SARAN, A. (2000). Phenotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Israeli dairy herds. *J. Vet. Med. B.* 47 : 591-597.
- ZHU, W., CLARK, N.C., MCDOUGAL, L.K., HAGEMAN, J., MCDONALD, L.C., PATEL, J.B. (2008). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with Inc18-Like *vanA* plasmids in Michigan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52 : 452-457.

ZSCHOCKA, M., KLOPPERTB, B., WOLTERB, W., HAMANNA, H.P., LAMMLERC, C.H. (2005). Pattern of enterotoxin genes *seg*, *seh*, *sei* and *sej* positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 108 : 243-249.

ÖZGEÇMİŞ

I-Bireysel Bilgiler

Adı : Faruk
 Soyadı : PEHLİVANOĞLU
 Doğum yeri ve tarihi : Ayazkent-Bergama (İZMİR), 29/06/1970
 Uyuşu : T.C.
 Medeni Durumu : Evli
 Askerlik Durumu : Yapmış
 İletişim adresi ve telefonu : Armağan İlci Bulvarı, Bozkurt Mahallesi,
 Toki Evleri, C4/32, Merkez/Burdur
 0 536 450 51 90

II-Eğitimi

1998 – 2001 University of Florida, College of Veterinary Medicine, Gainesville-Florida, USA.
 1997 – 1998 The Ohio State University, College of Veterinary Medicine (Master of Science), Columbus-Ohio, USA.
 1996 – 1997 University of Pennsylvania, English Language Programs, Philadelphia-Pennsylvania, USA.
 1995 – 1996 Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Yabancı Diller Yüksek Okulu, Temel İngilizce Bölümü, İngilizce Dil Eğitim Programı, Ankara.
 1988 – 1993 Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Bursa.
 1984 – 1987 İzmir Bergama Lisesi
 1981 – 1984 Bergama Ayazkent Ortaokulu
 1976 – 1981 Bergama Ayazkent İlkokulu

Yabancı Dili: İngilizce

III-Ünvanları

Veteriner Hekim (1993)

Master Derecesi (1998)

Öğretim Görevlisi (2002)

IV- Mesleki Deneyim

2002 – 2006 Akdeniz Üniversitesi, Burdur Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı - Öğretim Görevlisi.

2006 – Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı - Öğretim Görevlisi.

V. Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları

PEHLIVANOĞLU, F., MORISHITA, T.Y., AYE, P.P., PORTER, R.E. (Jr.), ANGRICK, E.J., HARR, B.S., NERSESSIAN, B. (1999). The effect of route of inoculation on the virulence of raptorial *Pasteurella multocida* isolates in Pekin ducks (*Anas platyrhynchos*). *Avian Dis.* 43 : 116-121.

TURUTOĞLU, H., MUDUL, S., **PEHLIVANOĞLU, F.** (2002). Antibiotic susceptibility and beta-lactamase prevalence for Staphylococci isolated from bovine mastitic milk samples. *Acta Vet-Beograd.* 52 : 337-244.

PEHLIVANOĞLU, F., YARDIMCI, H. (2007). Deniz Memelilerinin Bakteriyel Hastalıkları. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi.* 78 : 51-56.

TURUTOĞLU, H., OZTURK, D., GULER, L., **PEHLIVANOĞLU, F.** (2007). Presence and characteristics of sorbitol-negative *Escherichia coli* O157 in healthy sheep faeces. *Veterinarni Medicina,* 52 : 301- 307.

KURSUN, O., TASCI, F., AKCAN KALE, A.S., BASKAYA, R., **PEHLIVANOĞLU, F.** (2009). Study on microbiological quality of rabbit meat. *Indian Vet. J.* 86 : 18-21.

OZTURK, D., **PEHLIVANOĞLU, F.**, TOK, A.A., GUNLU, S., GULDALI, Y., TURUTOĞLU, H. (2010). Seroprevalence of Paratuberculosis in the Burdur province (Turkey), in dairy cattle using The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Isr. J. Vet. Med.* 65 : 53-57.

- ÖZTÜRK, D., **PEHLİVANOĞLU, F.**, KALE, M., TOK, A.A., GULDALI, Y., TURUTOĞLU, H. (2010) In vitro diagnosis of bovine Tuberculosis by gamma-interferon assay. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 16 : 875-878.
- ATA, A., TURUTOĞLU, H., KALE, M., GULAY, M.S., **PEHLİVANOĞLU, F.** (2010). Microbial flora of normal and abnormal cervical mucous discharge associated with reproductive performance of cows and heifers in estrus. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 23 : 1007-1012.
- PEHLİVANOĞLU, F.**, KALE, M., YUKARI, B.A. (2006). Keneler ve Kanamalı Kırım Kongo Ateşi. *Tarımın Sesi.* 11 : 13-15.
- KALE, M., BULUT, O., YAPKIC, O., GULAY, M.S., **PEHLİVANOĞLU, F.**, ATA, A., YAVRU, S. (2007). Effects of subclinical Bovine Leukemia Virus Infection on some production parameters in a dairy farm in Southern Turkey. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 78 : 130-132.
- KALE, M., KURSUN, O., **PEHLİVANOĞLU, F.** (2007). Detection of central nervous system tissues as BSE specified risk material in processed and raw meat products in Turkey. *J. Food Saf.* 27 : 56-65.
- ACAR, A., YAVRU, S., KALE, M., BULUT, O., AVCI, O., **PEHLİVANOĞLU, F.** (2008). Caprine Arthritis Encephalitis Virus Infection in kids with arthritis. *Indian Vet. J.* 85 : 824-825.
- KALE, M., KURSUN, O., AKCAN KALE, A., **PEHLİVANOĞLU, F.**, GÜNER, A. (2009). Detection of spinal cord tissues as Bovine Spongiform Encephalopathy specified risk material (BSE-SRM) in beef carcasses during splitting in Turkish abattoirs. *J. Food Saf.* 29 : 575-587.

Ulusal Kongre ve Sempozyumlar

- TÜRÜTOĞLU, H., ERÇELİK, Ş., TAŞÇI, F., **PEHLİVANOĞLU, F.** (2004). Subklinik mastitisli inek sütlerinde koagülaz pozitif stafilocokların tüp koagülaz testi ile direkt teşhisi. VI. *Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı)*, Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Elazığ, 14-16 Eylül 2004.
- ATA, A., KALE, M., TÜRÜTOĞLU, H., YAVRU, S., YAPKIÇ, O., **PEHLİVANOĞLU, F.**, BULUT, O., ÇELİK, H.H. (2004). İnek ve düvelerde anormal servikal mukusun fertilite üzerine etkisi. 3. *Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi*, Örsem, Çolaklı-Manavgat, Antalya, 30 Eylül-02 Ekim 2004.
- TÜRÜTOĞLU, H., ÖZTÜRK, D., GÜLER, L., **PEHLİVANOĞLU, F.** (2006). Sağlıklı koyun dışkılarında *E. coli* O157 : H7 'nin varlığı ve özellikleri. VII. *Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı)*, Side-Antalya, 26-28 Eylül 2006.

- KURŞUN, Ö., TAŞCI, F., AKÇAN KALE, A.S., BAŞKAYA, R., **PEHLİVANOĞLU, F.** (2006). Tavşan etlerinin mikrobiyolojik kalitesi üzerine bir araştırma. 2. *Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi (Uluslararası Katılımlı)*, İstanbul, 18-20 Eylül 2006.
- KALE, M., KURŞUN, Ö., **PEHLİVANOĞLU, F.** (2006). Türkiye’de üretilen et ve et ürünlerinde BSE risk materyali olan merkezi sinir sistemi dokularının kontrolü. 2. *Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi (Uluslararası Katılımlı)*, İstanbul, 18-20 Eylül 2006.
- KALE, M., KURŞUN, Ö., AKCAN KALE, A.S., **PEHLİVANOĞLU, F.**, GÜNER, A., BAŞKAYA, R., DOĞRUEK, Y., ÖZTÜRK, Ç. (2008). Türk mezbahalarında sığır karkaslarının ikiye ayrılması esnasında Bovine Spongiform Encephalopati spesifik risk materyali (BSE-SRM) olarak bilinen spinal kord dokularının kontrolü. VIII. *Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı)*, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Van, 07-09 Ekim 2008.
- KALE, M., KURŞUN, Ö., AKCAN KALE, A.S., **PEHLİVANOĞLU, F.**, HASIRCIOĞLU, S., YAVRU, S. (2008). Türkiye’nin güney bölgesinde özel bir mezbaha işletmesinde parçalanmış sığır etlerinde spinal kord dokusunun araştırılması. VIII. *Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı)*, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Van, 07-09 Ekim 2008.
- ÖZTÜRK, D., **PEHLİVANOĞLU, F.**, KALE, M., TOK, A.A., GÜLDALİ, Y., TÜRÜTOĞLU, H. (2008). Tüberkülozis’in gamma interferon testi ile in vitro teşhisi. VIII. *Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı)*, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Van, 07-09 Ekim 2008.
- PEHLİVANOĞLU, F.**, ÖZTÜRK, D., GÜNLÜ, S., GÜLDALİ, Y., TÜRÜTOĞLU, H. (2008). Burdur ilinde yavru atma problemlili süt sığırları işletmelerinde Brusellozis’in görülme sıklığı. VIII. *Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı)*, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Van, 07-09 Ekim 2008.
- KALE, M., ÖZTÜRK, D., HASIRCIOĞLU, S., **PEHLİVANOĞLU, F.**, TÜRÜTOĞLU, H. (2010). Süt sığırlarında bazı viral ve bakteriyel üst solunum yolu enfeksiyonlarının araştırılması. IX. *Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi*, Yakınoğu Üniversitesi, Lefkoşa, KKTC, 5-7 Ekim 2010.
- ÖZTÜRK, D., **PEHLİVANOĞLU, F.**, TOK, A.A., GÜNLÜ, S., GÜLDALİ, Y., TÜRÜTOĞLU, H. (2010). Burdur ili süt sığırlarında Paratüberkülozun seroprevalansı. IX. *Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi*, Yakınoğu Üniversitesi, Lefkoşa, KKTC, 5-7 Ekim 2010.
- ÖZTÜRK, D., KALE, M., **PEHLİVANOĞLU, F.**, HASIRCIOĞLU, S., TÜRÜTOĞLU, H. (2010). Bazı bakteriyel ve viral abortlar yönünden Burdur ili’ndeki süt sığırları işletmelerinin değerlendirilmesi. IX. *Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi*, Yakınoğu Üniversitesi, Lefkoşa, KKTC, 5-7 Ekim 2010.

Uluslararası Kongre ve Sempozyumlar

- MORISHITA, T.Y., **PEHLIVANOGLU, F.**, AYE, P.P., PORTER, R.E.(Jr), ANGRICK, E.J., HARR, B.S., NERSESSIAN, B. (1999). Virulence and pathogenicity of *Pasteurella multocida* in Pekin ducks (*Anas platyrhynchos*). *AAAPAVMA Annual Meeting*, New Orleans, USA.
- ATA, A., TURUTOGLU, H., KALE, M., GULAY, M.S., **PEHLIVANOGLU, F.** (2007). Microbial flora of normal and abnormal cervical mucous discharge associated with reproductive performance of cows and heifers in estrus. *ADSA. PSA. AMPA. ASAS. 2007 Joint Annual Meeting*, San Antonio, TX, USA, July 8-12, 2007.
- YAVRU, S., KALE, M., ATA, A., BULUT, O., GULAY, M.S., YAPKIC, O., **PEHLIVANOGLU, F.** (2007). Association of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) and Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1) in abnormal cervical mucous discharge and fertility in cows and heifers. *XXV. Jubilee World Buiatrics Congress*, Budapest, HUNGARY.
- KALE, M., BULUT, O., YAPKIC, O., GULAY, M.S., **PEHLIVANOGLU, F.**, ATA, A., YAVRU, S. (2007). Effects of Subclinical Bovine Leukemia Virus Infection on some production parameters in dairy cows. *15'th International Congress of Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants*, Kusadasi, Aydin, TURKEY.
- KALE, M., KURSUN, O., AKCAN KALE, A.S., **PEHLIVANOGLU, F.**, HASIRCIOGLU, S., YAVRU, S. (2008). Spinal cord tissue detection in comminuted beef in a private abattoir in Southern Turkey. *XVI. Congress of The Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants (FeMeSPrum)*, Zadar, CROATIA.
- KALE, M., KURSUN, O., AKCAN KALE, A.S., **PEHLIVANOGLU, F.**, GUNER, A., BASKAYA, R., DOGRUER, Y., OZTURK, C. (2008). Detection of spinal cord tissues as Bovine Spongiform Encephalopathy Specified Risk Material (BSE-SRM) in beef carcasses during splitting in Turkey." *XVI. Congress of The Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants (Femesprum)*, Zadar, CROATIA.
- YAVRU, S., YAPICI, O., KALE, M., SAHINDURAN, S., **PEHLIVANOGLU, F.**, ALBAY, M.K., AVCI, O. (2008). Serological, virological and haematological examination of Coronavirus Infection in calves with diarrhea and their dams." *XVI. Congress of The Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants (Femesprum)*, Zadar, CROATIA.
- YAVRU, S., BULUT, O., SAHINDURAN, S., KALE, M., YAPICI, O., AVCI, O., ALBAY, M.K., **PEHLIVANOGLU, F.** (2008). Serological, virological and haematological examination of Rotavirus Infection in calves with diarrhea and their dams". *XXV. Jubilee World Buiatrics Congress*, Budapest, HUNGARY.

VII-Bilimsel Etkinlikleri

Aldığı Burslar:

1. T.C. Milli Eğitim Bakanlığı Yurt Dışı Yüksek Lisans ve Doktora Bursu (1416 sayılı yasa ile). (1995).

Yer Aldığı Projeler:

1. Keçi sütlerinden izole edilen *S. aureus* suşlarında metisilin ve vankomisin dirençliliğinin araştırılması (Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Burdur).

Verdiği Seminerler:

1. The effect of route of inoculation on the virulence of Raptorial *Pasteurella multocida* isolates in Pekin ducks (*Anas platyrhynchos*). (1998). The Ohio State University, College of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Preventive Medicine, Columbus-OHIO, USA.
2. Deniz memelilerinin bakteriyel hastalıkları (2004). Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
3. Koyun ve keçilerde brusellozis'in dünyadaki dağılımı, aşılama ve tanı yöntemleri (2004). Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

Katıldığı Seminer ve Kongreler

1. VI. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası katılımlı). Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Elazığ, 14-16 EYLÜL 2004.
2. VIII. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası katılımlı). Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Van, 07-09 EKİM 2008.
3. IX. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi. Yakındoğu Üniversitesi, Lefkoşa-KKTC, 05-07 EKİM 2010.

VIII- Diğer Bilgiler

Eğitim programı haricinde aldığı kurslar ve katıldığı eğitim seminerleri

1. Jean Monnet Projesi AB Eğitim Semineri Programı. Akdeniz Üniversitesi, Sürekli Eğitim Merkezi (AKÜNSEM), Antalya, 23 Şubat-2 Mayıs 2003.
2. Birinci Hayvan Refahı ve Veteriner Hekimliği Eğitimi Konferansı. Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Ankara, 09-10 Haziran 2005.
3. Öğrenci Dostu Öğrenme Ortamları Oluşturma ve Değerlendirme. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Sürekli Eğitim Araştırma ve Uygulama Merkezi, Burdur, 18-23 Ağustos 2008.