

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİK-YL-2011-003**

**KEÇİLERDE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*'UN
BAKTERİYOLOJİK VE MOLEKÜLER OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

Vet. Hek. Deha Ali DENİZ

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Şükrü KIRKAN**

AYDIN-2011

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

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Vet. Hek. Deha Ali DENİZ tarafından hazırlanan “KEÇİLERDE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*’UN BAKTERİYOLOJİK VE MOLEKÜLER OLARAK ARAŞTIRILMASI” başlıklı tez, 23/11/2011 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı ve Soyadı :

Üniversitesi :

İmzası:

1- Prof. Dr. Osman KAYA

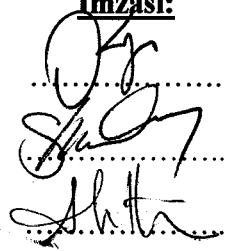
ADÜ, Veteriner Fakültesi

2- Doç. Dr. Şükrü KIRKAN

ADÜ, Veteriner Fakültesi

3- Doç. Dr. Cavit KUM

ADÜ, Veteriner Fakültesi



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

Doç. Dr. Sacide KARAKAŞ
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

S. aureus, küçük ruminantlarda özellikle dişi keçilerde bulunan önemli bakteriyel patojenlerden biridir. Bu patojen aynı zamanda infekte meme dokusundan yayılarak işlenmemiş süt ve süt ürünlerinde bakteriyel kontaminasyona ve bakterinin yayılmasına yol açmaktadır.

S. aureus kaynaklı hastalıkların patogenezinde ekzotoksinler, Stafilokokal enterotoksinler ve Stafilokokal enterotoksin benzeri proteinler rol oynamaktadır. Her iki ekzotoksinde süperantijen yapısındadır ve sindirildiği zaman primatlarda kusmaya yol açmaktadır. Stafilokokal infeksiyonlarda süperantijenlerin rolü hala açığa çıkarılmamıştır, fakat ruminantlarda meme içi infeksiyonun oluşum mekanizmasına immun yanıtı zayıflatan T hücrelerinin sayısının anormal şekilde artmasına yol açarak katılmaktadır.

Tez çalışmamızda, laktasyondaki keçilerde süt, deri ve mukozal yüzeylerden izole edilen *S. aureus* izolatlarında ekzotoksin salgısına yol açan SE gen profilinin moleküler yöntemlerle sınıflandırılması, böylece yetiştiricilere rehber olunması, ayrıca konvansiyonel ve moleküler metotların eş zamanlı olarak uygulanması amaçlanmıştır.

Çalışmamız, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Ofisi tarafından VTF-11023 kodlu proje olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
RESİMLER DİZİNİ	viii
KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Tarihçe	2
1.2. Sınıflandırma	3
1.3. Morfoloji ve Kimyasal Özellikler	4
1.4. Virulans ve Patojenite	5
1.4.1. Hücre duvarı	5
1.4.2. Kapsül ve Slime tabakası	6
1.4.3. Peptidoglikan	6
1.4.4. Penisilin bağlayan protein (PBP)	6
1.4.5. Teikoik asit	7
1.4.6. Protein-A	7
1.4.7. Koagülaz ve diğer yüzey adezyon proteinleri	8
1.4.8. Stoplazmik membran	8
1.5. Enzimler	8
1.5.1. Katalaz	8
1.5.2. Koagülaz	8
1.5.3. Lipaz	9
1.5.4. Hiyalüronidaz	9
1.5.5. Deoksiribonükleaz	9
1.5.6. Fibrinolizin	9
1.5.7. Nükleaz	10
1.5.8. Laktamazlar	10
1.5.8.1. Penisilinaz (beta-laktamaz)	10
1.6. Toksinleri	11

1.6.1. Sitolitik Toksinler	12
1.6.1.1. Alfa toksin	12
1.6.1.2. Beta toksin	12
1.6.1.3. Gama toksin ve Panton-Valentine (PV) lökosidin	12
1.6.1.4. Delta toksin	13
1.6.2. Lökosidin	13
1.6.3. Eksfoliyatif toksin (Eksfoliyatin)	14
1.6.4. Toksik �ok sendromu toksini-1 (TSST-1)	14
1.6.5. Enterotoksinler	15
1.6.5.1. SE'lerin dizi analizleri	15
1.6.5.2. Enterotoksin oluşumunu etkileyen faktörler	17
1.6.5.2.1. Ekstraselüler faktörler	17
1.6.5.2.2. İntraselüler faktörler	18
1.6.5.3. Enterotoksinlerin fiziksel ve kimyasal �zellikleri	19
1.6.5.4. Stafilokokal enterotoksinlerin genetik �zellikleri	19
1.7. Stafilokokların İdentifikasyonu	20
1.7.1. Katalaz Testi	20
1.7.2. Koagulaz Testi	20
1.7.2.1. Lam koagulaz testi	20
1.7.2.2. Tüpte koagulaz	21
1.7.3. Mannitol Fermentasyonu	21
1.7.4. Basitrasin Direnci	22
1.7.5. Novobiocin Direnci	22
1.7.6. Glukoz Fermentasyonu Deneyi	22
1.7.7. Amplifikasyon ve Dizi Analizi	22
1.7.8. Lateks aglütinasyon	23
1.7.9. Pasif hemaglütinasyon	23
1.8. <i>S. aureus</i> İçin Ek Doğrulayıcı Testler	24
1.8.1. Deoksiribonükleaz (DNase) testi	24
1.8.2. Termostabil endonükleaz testi	24
1.8.3. Mannitol fermentasyonu	24

1.9. Epidemiyoloji	25
1.10. Stafilokokların Antibiyotik Direnci	27
1.11. Tedavi	28
2. GEREÇ VE YÖNTEM	30
2.1. GEREÇ	30
2.1.1. İzolasyon Örnekleri	30
2.1.2. Besiyerleri, Ayıraçlar, Solusyonlar ve Antibiyotik Diskleri	30
2.1.2.1. Besiyerleri	30
2.1.2.1.1. Blood Agar (Merck 1. 10886)	30
2.1.2.1.2. Mannitol Salt Phenol Red Agar (MSA) (Merck 1.05404)	30
2.1.2.1.3. Mueller-Hinton Agar (MHA) (Oxoid CM 129)	31
2.1.2.1.4. Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (%20 Gliserinli) (Oxoid CM 0225)	31
2.1.2.1.5. Trypton Soya Broth-TSB (%7,5 Tuzlu) (Oxoid CM 129)	31
2.1.2.1.6. Stuart Transport Medium (BBL™)	31
2.1.2.1.7. DNase Test Agar (Merck 1.10449)	32
2.1.2.2. Solusyonlar	32
2.1.2.2.1. TAE Elektroforez Buffer	32
2.1.2.2.2. Gel Loading Buffer (6 X)	32
2.1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	33
2.1.3.1. Kullanılan Cihazlar	33
2.1.3.2. MgCl ₂ , Taq DNA Polymerase, 10X Taq Buffer, dNTP Set	33
2.1.3.3. Primerler	33
2.1.4. Elektroforez Cihazı	34
2.1.4.1. Agarose Jel Hazırlanışı	35
2.1.4.2. Marker	35
2.1.4.3. Etidyum Bromür	35
2.1.4.4. Standart Suşlar	35
2.2. Yöntem	35
2.2.1. Örneklerin Alınması	35
2.2.1.1. Sütler	35
2.2.1.2. Burun Sıvı	36
2.2.1.3. Deri Sıvı	36

2.2.1.4. Vajina Sıvı	36
2.2.2. <i>S. aureus</i> İzolasyonu	36
2.2.2.1. Fenotipik İdentifikasyon	36
2.2.2.1.1. Katalaz Testi	36
2.2.2.1.2. Basitrasin Duyarlılık Testi	37
2.2.2.1.3. Koagülaz Testi	37
2.2.2.1.4. Mannitol Fermentasyonu	37
2.2.2.1.5. Glukoz Fermentasyonu	37
2.2.2.1.6. DNase Testi	37
2.2.2.2. Genotipik İdentifikasyon	38
2.2.2.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	38
2.2.2.2.2. Amplikonların Elektrophorez Tankına Yükleneş	40
2.2.2.2.3. Amplikonların Elektrophorez Tankında Yürütölmesi	40
2.2.2.2.4. Görüntölleme ve Değerlendirme	40
3. BULGULAR	42
3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları	42
3.2. PCR Bulguları	43
4. TARTIŞMA	45
5. SONUÇ	51
ÖZET	52
SUMMARY	53
KAYNAKLAR	54
ÖZGEÇMİŞ	60
TEŞEKKÜR	61

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1.	Stafilokokal enterotoksin genlerinin tespiti için kullanılan primerler, dizileri, ampikon büyüklükleri ve kaynak	34
Çizelge 2.2.	Mastermiksin hazırlanma oranları	39
Çizelge 2.3.	Multipleks PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı	40
Çizelge 3.1.	İzole ve identifiye edilen <i>S. aureus</i> suşlarının dağılımı	42
Çizelge 3.2.	Saptanan enterotoksin genlerinin dağılımı	43

RESİMLER

Resim 3.1. Keçi kökenli *S. aureus* izolatlarında SE enterotoksin geni varlığı 44

KISALTMALAR

SE: Stafilokokal enterotoksin

SEI: Stafilokokal enterotoksin like

MRSA: Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*

VISA: Vankomisin'e azalmış duyarlılık gösteren *S. aureus*

IL-1: İnterlökin-1

P-V: Panton-Valentin

TSS: Toksik şok sendrom

TSST-1: Toksik çok sendrom toksin

ETA: Eksfoliyatif toksin A

ETB: Eksfoliyatif toksin B

SEA: Stafilokokal Enterotoksin A

SEB: Stafilokokal Enterotoksin B

SEC: Stafilokokal Enterotoksin C

SED: Stafilokokal Enterotoksin D

SEE: Stafilokokal Enterotoksin E

SEG: Stafilokokal Enterotoksin G

SEH: Stafilokokal Enterotoksin H

SEI: Stafilokokal Enterotoksin I

SEJ: Stafilokokal Enterotoksin J

SEK: Stafilokokal Enterotoksin K

KNS: Koagulaz Negatif Stafilokok

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

nuc: Nükleaz

coa: Koagulaz

spA: Protein A

GIS: Gastrointestinal Sistem

TK: Toplum kökenli

PT: Pirojenik ekzotoksinler

MSA: Mannitol Salt Phenol Red Agar

MHA: Mueller-Hinton Agar

BHIB: Brain Heart Infusion Broth

TSB: Trypton Soya Broth

mPCR: Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PBP: Penisilin bağlayıcı protein

Ig: İmmunglobulin

kD: Kilodalton

CRF: Koagulaz reaktif faktör

HCl: Hidroklorik asit

DNA: Deoksiribonükleik asit

RNA: Ribonükleik asit

1. GİRİŞ

Stafilokoklar infeksiyon etkeni olarak tanımlandıkları 1881 yılından bu yana insan ve hayvanlarda geliştirdikleri hastalıklarla patojen mikroorganizmalar arasında ilk sıralarda yer almışlardır. Veteriner hekimlikte metisilin, penisiline dirençli stafilokokların tedavisinde kullanılmasından kısa bir süre sonra metisiline dirençliliği ortaya çıkmış *Staphylococcus aureus*'lar (MRSA) tanımlanmış ve bu bakteriler nozokomiyal patojen olarak tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir (Çetinkaya ve ark 1996).

S. aureus küçük ruminantlarda özellikle keçilerde önemli meme bakteriyel patojenlerindendir (Bergonier ve ark 2003, White 2007). Bu etkenle infekte olmuş memeler çiğ süt üretiminde bakteriyel kontaminasyonun önemli bir bölümünü temsil eder (Jørgensen ve ark. 2005).

İnfekte meme dokusu ruminantlarda genellikle *S. aureus* için primer rezervuar olarak değerlendirilmektedir. Fakat *S. aureus* sığırlardan ve küçük ruminantlardan meme derisi, normal deri, mukoz membranlar, burun ve vaginal dokudan da izole edilebilmektedir (Haveri ve ark 2008, Bergonier ve ark 2003, Valle ve ark 1991, Vautor ve ark 2005). Bakterinin patogenezinin bilinmesine rağmen *S. aureus*'un küçük ruminantlarda bulunan meme dışı rezervuarlarının önemi açığa kavuşturulamamıştır (Mørk ve ark 2010).

Keçilerde infekte meme bezinden *S. aureus* primer etken olarak izole edilmektedir. Ancak *S. aureus* aynı zamanda cilt, meme, meme derisi, vajinal ve ağız mukozasından izole edilebilir (Haveri ve ark. 2008, Jørgensen ve ark. 2005, Vautor ve ark. 2005, White 2007).

Günümüzde *S. aureus*'un virulent olduğu bilinmektedir. Bu etki kısmen ekzotoksinler tarafından oluşturulmaktadır (Foster, 2005). Bu ekzotoksinler stafilokokal enterotoksin (SE) ve SE-like (SEI) proteinlerdir. SEs ve SEIs her ikisi de süperantijendir. SEs primatlarda mideye verildiği zaman kusma etkisi yapar (Dinges ve ark. 2000). Süper antijenlerin stafilokokal infeksiyonlardaki rolü tam olarak anlaşılamamıştır. Bir teoriye göre ruminantlarda T hücre aktivasyonunu arttırarak immun sistemin baskılanmasını

sağlar. Böylece *S. aureus* meme içi infeksiyonun patojenitesinde önemli rol oynar (Ferens ve ark. 1998, Park ve ark. 2006).

1.1. Tarihçe

1860 yılında İngiliz cerrah Joseph Lister, Louis Pasteur'un infeksiyon ajanları üzerinde yaptığı çalışmalardan etkilenecek ameliyat sonrası infeksiyonun önlenmesinde karbolik asiti yara ve cerrahi örtülere direkt kullanmıştır. Stafilocokları ilk kez 1878'de Robert Koch tanımlamış, 1880'de Pasteur sıvı besiyerinde üretmiş ve 1881'de İskoçyalı cerrah Alexander Ogston fare ve kobaylar için patojen olduğunu vurgulamıştır. *Staphylococcus* terimi Yunanca *staphyle* (üzüm salkımı) tabirinden türetilmiştir ve karakteristik kümelenmeler yaptıklarından dolayı Alexander Ogston tarafından seçilmiştir (Waldvogel F. ve ark. 2000). Anton Rosenbach 1884'te beyaz renkli kolonileri *Staphylococcus albus*, sarı-portakal rengi kolonileri ise *Staphylococcus aureus* olarak isimlendirmiştir. Bu ayırım yakın zamana kadar devam etmiştir (Cengiz A. 1999).

Bakteriler ve diğer patojen mikroorganizmalarla oluşan infeksiyonların önlenmesi ve tedavisinde kullanılan etkili ajanların keşfi modern tıbbın ve veteriner hekimliğin en önemli gelişmelerinden biri olmakla birlikte, antienfektif potansiyele sahip maddeler aslında binlerce yıldır kullanılmıştır. Arsenik ve bizmut gibi ağır metaller 1900'lu yıllarda sifiliz dahil bazı enfeksiyonların tedavisinde kullanılmıştır (Cengiz A. 1999).

Bakterinin Kraus ve Clairmont tarafından 1900'da alfa toksini, Glenny ve Stevens tarafından 1935'te beta toksini bulunmuştur. Smith ve Price 1938'de gama toksin ve Williams ile Harper 1947'de delta toksin varlığını açıklamışlardır. Todd ve arkadaşları tarafından 1978'de yeni bir hastalık olarak "Toksik Şok Sendromu" tanımlanmıştır (Akçam ve ark., 2007).

Modern kemoterapi çağı 1936 yılında sülfonamidlerin keşfi ve klinik kullanıma girmesiyle başlamıştır. Penisilinin klinikte kullanılmaya başlandığı 1944 yılına kadar değişik 6 sulfonamid preparatları antibakteriyel tedavinin seçkin ilaçları olmuştur. 1940'lı yıllarda penisilinin tedavide kullanılmaya başlanmasıyla birlikte, stafilokokal infeksiyonlara bağlı mortalite oranı hızla azalma göstermiştir. Ancak kısa bir süre sonra, *S. aureus* suşları penisilinaz enzimi üretmeye başlayarak penisiline direnç geliştirmiş ve bu dirençli suşlar hızla yayılmıştır. Direnç ilk kez 1944'te tanımlanmıştır. 1950'lerin

sonlarında suşların yaklaşık % 50'si penisiline dirençli hale gelmiştir. Aynı tarihlerde tetrasiklin, kloramfenikol ve eritromisine karşı çoklu direnç gösteren *S. aureus* suşları bildirilmiştir. İlk semisentetik penisilinaza dirençli antimikrobiyal ajan olan metisilin 1959 yılında klinik kullanıma girmiştir. Bundan iki yıl sonra, 1961 yılında, insanlarda ilk metisiline dirençli *S. aureus* izolatlarının varlığı İngiltere'de bildirilmiştir. Sonradan 1960'lı yıllarda Avrupa'da ve 1970'li yıllarda ABD'de bir problem haline gelmiştir. Hayvanlarda ise ilk MRSA izolatı 1972 yılında mastitisli sığırlardan izole edilirken, bunu 1988 yılında kedi ve 1989 yılında köpek izolatları izlemiştir. Daha sonra dünyanın pek çok yerinde izolat sayısının artması ile MRSA infeksiyonlarının hayvanlarda da önemli bir problem olmaya başladığı görülmüştür (Leonard ve Markey 2008). 1990 yılında *S. aureus* infeksiyonlarının teikoplanin ile tedavisi sonrası, teikoplanine dirençli izolatların seleksiyonuna bağlı klinik başarısızlıklar bildirilmiştir. (Kaatz G. Ve ark 1990). İlk kez 1995 yılında Fransa'da Vankomisin'e azalmış duyarlılık gösteren *S. aureus* (VISA), 1996'da Japonya'da hetero-VISA 2002 yılı Haziran ayında ise ABD'de ilk vankomisine dirençli *Staphylococcus aureus* izolatı bildirilmiştir (Baddour ve ark 2007). Bu suş diyaliz tedavisi gören 40 yaşındaki bir erkek hastanın kateter ucundan izole edilmiştir (Sievert 2002).

1.2. Sınıflandırma

Stafilokok türleri *Micrococcaceae* familyası içinde yer alan, katalaz pozitif, Gram (+) koklardır. Stafilokoklar doğada; tozda, toprakta, hayvanların deri, mukoza dokularında ve salgılarında yaygın olarak bulunan, insan ve hayvanların deri, burun boşluğu ve lezyonlarında çoğalabilen bakterilerdir (Bilgehan H. 2004).

Stafilokok cins içinde 28 tür ve 32 alt tür bulunmaktadır. Bakteriyel taksonomide *Firmicutes* kolunda yer alırlar. Yeni toksinlerin bulunması sebebiyle bu sınıflandırma sıklıkla yenilenmektedir. Grubun en önemli üyesi koagulaz pozitif ve termostabil nukleaz (termonukleaz) pozitif bir bakteri olan *S. aureus* 'dur. Stafilokoklar *Micrococcus*, *Jeotgalicoccus*, ve *Salinicoccus* genuslarıyla birlikte *Bacillus* sınıfı *Bacillales* cinsi *Staphylococcaceae* familyası içinde yer alırlar (Bilgehan H. 2004).

Stafilokok türleri DNA/DNA ilişkileri ve fenotipik özelliklerine göre en az dört grup altında toplanabilirler. *Staphylococcus epidermidis* grubunda; *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* ve *S. saccharolyticus* türleri,

Staphylococcus saprophyticus grubunda; *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. xylosus* türleri, *Staphylococcus simulans* grubunda; *S. simulans*, *S. carnosus* türleri, *Staphylococcus sciure* grubunda; *S. sciure*, *S. lentus* türleri yer almaktadır. *S. aureus*, *S. auricularis*, *S. intermedius*, *S. hyicus* ve *S. caseolyticus* herhangi bir gruba sokulamamıştır. Fırsatçı patojenler olan *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* da sıklıkla enfeksiyona sebep olurlar. Daha nadiren *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. saccharolyticus*, *S. cohnii* ve *S. simulans* da fırsatçı enfeksiyonlara neden olmaktadır (Bilgehan H. 2004).

1.3. Morfoloji ve Kimyasal özellikleri

Staphylococcus genusunda bulunan bakteriler Gram pozitif kok görünümündedir. Tekli, ikili, dördü hücreler halinde bulunabilirler, üç veya dört hücreden oluşan kısa zincirler yapabilirler ve düzensiz uzum salkımı benzeri şekiller oluştururlar. Hareketsiz, spor oluşturmayan, genellikle katalaz pozitif, oksidaz negatif, kapsülsüz olup, anaerob, katalaz negatif olan ve karbohidratlardan gaz oluşturmayan *S. saccharolyticus* ve *S. aureus subsp. anaerobius* haricinde fakültatif anaerobtur. Daha çok aerob üremeyi tercih ederler. Anaerobik ortamda glukozdan asit oluştururlar. Stafilocoklar basit besi yerlerinde üreyebilirler. 18-24 saat içinde türe göre değişmekle beraber altın sarısı pigmentli “S” tipli koloniler oluştururlar. Çoğu % 7,5-10 NaCl içeren basit besiyerlerinde, 18-45°C’de kolaylıkla ürerler. Optimum üreme ısıları 37°C’dir. Birçok türünde karotenoid pigment bulunabilir (Waldvogel 2000, Bilgehan H. 2004). Basitrasin, furazolidon, lizostafine duyarlı olmakla birlikte lizozime direnç gösterirler. Gram (+) görünümünde olan streptokokların stafilocoklardan laboratuvar ayırımındaki en önemli fark streptokokların katalaz enzimi üretmemeleridir (Tünger A. 2004). Yeni koloniler renksizdir; eskidikçe lipokrom yapıda pigment oluştururlar. Patojen stafilocoklar kanlı agarda hemoliz yaparlar, aynı zamanda kan plazmasını koagüle ederler. Stafilocoklar Mac Conkey agarda da ürerler. Ancak, patojenik olanlar pembemsi-sarı, patojen olmayanlar kırmızı-menekşe koloniler oluştururlar (Akan 2006).

Stafilocoklar, sporsuz bakteriler içerisinde, dış etkenlere ve dezenfektanlara karşı, en fazla dayanıklı olanlardandır. Kültürlerde, +4°C’de 2-3 ay, -20 °C’de 3-6 ay kadar canlı kalabilirler. 60 °C’de ancak yarım saatte, % 2’lik fenolde 15 dakikada inaktif olurlar. % 9’luk sodyum klorüre ve sakaroz tolerans gösterirler. Antibiyotiklere karşı duyarlı oldukları halde, zamanla direnç kazanabilirler (Akan 2006).

1.4. Virulans ve Patojenite

S. aureus virulansı en yüksek olan stafilocok türüdür. Ancak infeksiyon olup olmaması mikroorganizmanın virulansı ile konak savunma sisteminin oluşturacakları dengeye bağlıdır. Stafilocokların virulansında rol oynayan faktörler hücre duvar yapıları, kapsül, yüzey proteinleri, toksinleri ve enzimleridir (Akan 2006).

1.4.1. Hücre duvarı

Protein A, peptidoglikan ve teikoik asit kompleksinden oluşmuştur. *S. aureus* suşlarının pek çoğunda bulunan ve hücreyi saran protein A, peptidoglikan tabakasına kovalent olarak bağlanmıştır. Fagositoya karşı bakterinin direncini artırır. Protein A, immunolojik ve teşhis yönünden önem taşır. Hücre duvarının önemli bir kısmını da peptidoglikan maddesi teşkil eder. Bunlar glikan zincirlerinin peptid bağları ile birbirine bağlanmıştır. Glikan zincirleri ise N-asetilmuramik asit ve N-asetilglukozamin alt ünitelerinden yapılmıştır. Hücre duvarında bulunan bir başka madde ise, polisakkarit kompleksi olan, peptidoglikan tabakası ve sitoplazmik membranla bağlantıları bulunan teikoik asittir. Bu polisakkarit, stafilocok türlerine göre ayrı özellik gösterir. Örneğin, ribitol teikok asit ile N-asetilglukozamin bileşiği (polisakkarit A) *S. aureus*' ta bulunur. Gliserol teikok asit ile glikoz bileşiği (polisakkarit B) *S. epidermis*'te yer alır. Bu bileşikler de kendilerine özgü antikorlar oluşmasına sebep olurlar. Protein, lipid ve karbonhidrat kompleksi bir yapıya sahip olan sitoplazmik membran hücreye girip çıkan maddeleri kontrol eder. Aynı zamanda solunumsal ve biyosentetik enzimleri de bünyesinde bulundurur (Akan 2006).

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

1.4.2. Kapsül ve Slime tabakası

Stafilokokların hücre duvarının en dış tabakası polisakkarit bir kapsül ile örtülebilmektedir. *S. aureus*'da 11 kapsüler serotip tanımlanmaktadır. Enfeksiyonların çoğu serotip 5 ve 7 ile ilişkilidir. Serotip 1 ve 2 çok kalın bir kapsüle sahiptir ve mukoid görünümlü koloniler oluşturur. Kapsül, bakteriyi fagositozdan korur. ve özellikle de kateterler gibi yabancı cisimlere adherensini sağlar (Tünger 2004). Genetik faktörler ve üreme ortamlarına bağlı olarak, çoğu Stafilokoklar tarafından monosakkarit, protein ve küçük peptidlerin oluşturduğu, suda çözünabilir, gevşek bağlı ince bir tabaka (slime tabakası) üretilir. Bu ekstrasellüler yapı bakteriyi dokulara ve kateter, greft, protez kapak, protez eklem ve şant gibi yabancı cisimlere bağlar. Bu da özellikle kısmen avirulent *Koagulaz Negatif Stafilokoklar*'ın hayatta kalması için önemlidir (Murray ve ark 2005).

1.4.3. Peptidoglikan

Gram (+) bakteriler için en genel özellik, hücre duvarı ağırlığının yarısını peptidoglikan tabakasının oluşturmasıdır. Glikan zincirlerin tabakalarından oluşan peptidoglikan iskelet N-asetilmuramik asit ve N-asetilglukozaminin 10-12 değişken subünitesinden meydana gelir. N-asetilmuramik asit subnitlerine bağlanan oligopeptid yan zincirler pentaglisin köprüleriyle çapraz bağlanırlar. Gram (-) bakterilerin aksine, Gram (+) bakterilerde peptidoglikan tabaka hücre duvarını daha rijit yapan birçok çapraz bağlı tabakadan meydana gelir. Peptidoglikan endojen pirojenlerin üretimini, kompleman aktivasyonu, monositlerden IL-1 üretimini ve lökositlerin kemotaksisini stimüle eden endotoksin benzeri aktiviteye sahiptir (Murray ve ark 2005).

1.4.4. Penisilin bağlayan protein (PBP)

Hücre duvarının sentezi çoklu enzimatik adımlardan oluşan bir süreçtir. Özetle, disakkarit peptidler şeklindeki prekürsörler plazma membranından transport edilir ve ilk duvar sentezine katılması sağlanır. Son basamakta, oluşan peptid zinciri henüz çapraz bağlanmamış peptid ve önceden hazırlanmış peptidoglikan arasında peptid bağı oluşturur. Bu bağlanma transpeptidaz enzimleri tarafından gerçekleştirilir. Bu transpeptidasyon olayı üç boyutlu bir ağ oluşumuna sebep olur ve hücre duvarına tam bir sağlamlık kazandırır. Transpeptidaz ve karboksipeptidazlar gibi hücre duvarı sentezinin son basamağına katılan bütün enzimler plazma membranına sıkıca bağlanmış durumdadırlar. Bu enzimler ayrıca

beta-laktam antibiyotiklere kovalent olarak bağlandığı ve yine bu antibiyotikler tarafından inaktive edildikleri için penisilin bağlayan proteinler olarak da isimlendirilirler. Kısaca PBP'ler hücre duvarında bulunan, transpeptidaz, karboksipeptidaz ve endopeptidaz gibi enzimlerdir. Bu enzimler bakterinin büyüme ve bölünmesi sırasında hücre duvarının bir araya gelmesi ve şekil almasından sorumludurlar. Bakteriler yapıları birbirine benzer dört ayrı özellikte PBP yaparlar (Cottagnoud 2002). Değişik bakteri türlerinde PBP'lerin sayısı, büyüklük, değişik penisilinlerin bunlara afinitesi ve inaktivasyonları sonucunda bakteride oluşan etki açısından farklılık vardır. Penisilinler bağlandıkları PBP'lere göre bakterilerde farklı etki gösterir. *S. aureus*'larda hücre duvarı sentezinde normalde PBP 1, 2 ve 3 görev alır. Bunlara ek olarak MRSA'lar farklı bir PBP olan PBP2a'ya sahiptirler. PBP'lerin inaktivasyonu bakterinin ölümüne yol açarken PBP'nin beta-laktam antibiyotiklere olan affinitesindeki azalma ise direnç neden olur (Cottagnoud 2002).

1.4.5. Teikoik asit

Hücre duvarı kuru ağırlığını % 30-50'sini oluşturan bir diğer önemli komponentidir. Teikoik asit, fibronektine spesifik olarak bağlanarak stafilocokların mukozal yüzeylere yapışmasına aracılık eder. Teikoik asitler eksik immunojen olmasına rağmen peptidoglikana bağlandığında spesifik bir antikor cevabını uyarır. Bu antikor cevabının izlenmesi sistemik stafilocok infeksiyonlarının saptanmasında kullanılmaktadır. Fakat bu diğer tanısal testlerden daha az duyarlıdır ve bugün kullanılmamaktadır (Muray ve ark 2005).

1.4.6. Protein-A

Çoğu *S. aureus*'un yüzeyi peptidoglikan tabakasına ya da stoplazmik membrana bağlanan protein-A ile kaplanmıştır. İmmunglobulin (Ig) G1, IgG2 ve IgG4'ün Fc reseptörlerine bağlanır. Bu da organizmanın antikor aracılı immün klirensini etkili bir şekilde önler. Kompleman aktivasyonu ve immunkompleks oluşumuna yol açar. Başka antijenlere karşı antikorların nonspesifik bir taşıyıcı olarak Protein-A'nın kullanımı koaglutinasyon deneyinde olduğu gibi bazı serolojik testlerde oldukça başarılı sonuçlar vermektedir. Protein-A antifagositik, kemotaktik ve mitojenik etkiler de gösterir. Koagülaz ve nükleaz aktiviteleri ile büyük oranda korelasyon gösterir ve virulans faktörüdür (Cottagnoud P. 2002). Ayrıca Protein-A'nın saptanması, *S. aureus* için spesifik bir identifikasyon testi olarak da kullanılabilir (Muray ve ark 2005).

1.4.7. Koagulaz ve diğer yüzey adezyon proteinleri

Stafilokoklarda çok sayıda yüzey proteini tanımlanmaktadır. Çoğu *S. aureus* suşunun en dış yüzeyinde clumping faktör (bağlı koagulaz olarak da adlandırılır) bulunmaktadır. Bu protein *S. aureus*'da önemli bir virulans faktörüdür. Clumping faktör, fibrinojene bağlanarak fibrine dönüştürür ve stafilokokların kümeleşmesine sebep olur. Bu proteinin saptanması, *S. aureus*'un tanımlanmasında temel bir testtir. Fibronektin, fibrinojen, elastin, kollojen gibi diğer yüzey proteinleri de konak matriks proteinlerine tutunmada önemlidir. Stafilokoklarda ve diğer bakterilerde bulunan yüzey adezyon proteinleri yeni tedavi yaklaşımlarında hedef oluşturmaktadır (Muray ve ark 2005).

1.4.8. Stoplazmik membran

Stoplazmik membran protein, lipit ve az miktardaki karbonhidratların bileşiminden oluşmaktadır. Hücrede osmotik bariyer olarak çalışır. Hücresel biyosentez ve solunum enzimlerinin sentezlenmesinde görevlidir (Muray ve ark 2005).

1.5. Enzimler

Stafilokoklar lipaz, hiyaluronidaz, fibrinolizin, penisilinaz, katalaz, koagulaz ve DNaz gibi birçok enzim üretirler. Bu enzimler özellikle stafilokokların komşu dokulara yayılımını kolaylaştırarak infeksiyon patogenezinde rol alırlar (Tünger A. 2004).

1.5.1. Katalaz

Tüm stafilokok türleri toksik hidrojen peroksidi toksik olmayan oksijen ve suya ayıran katalaz enzimi üretir. Bakteriler, bu enzim sayesinde fagositlerin içinde toksik oksijen radikalleri tarafından öldürülmeye direnç kazanır (Tünger 2004). Hemoprotein yapısındadır. Süperoksit dismutaz ve indirgenmiş flavoproteinlerin oksitlenmesi sırasında bakteri hücresi içerisinde açığa çıkan toksik hidrojen peroksiti su ve oksijene katalize eder (Cauwelier ve ark 2004).

1.5.2. Koagülaz

Stafilokoklar bağlı ve serbest olmak üzere 2 tip koagulaza sahiptir. Ekstrasellüler bir proenzimdir. Stafilokok hücre duvarına bağlı koagulaz doğrudan fibrinojeni fibrine dönüştürebilir ve stafilokoklarda kümelenmeye sebep olur. Serbest koagulaz ise bir plazma

globulin faktörü (coagulase reacting factor) ile reaksiyona girerek bir trombin benzeri faktör (staphylothrombin) oluşturur. Bu faktör fibrinojeni fibrine dönüştürerek bağlı koagulazla aynı sonucu oluşturur. Koagulaz, stafilokok absesinin çevresinde fibrin oluşumuna sebep olur ve böylece infeksiyon lokalize edilerek organizma fagositozdan korunur. Stafilokokların başka türleri de koagulaz üretebilir fakat bunlar genellikle hayvan patojenleridir ve nadiren insan infeksiyonuna neden olurlar (Zscheck ve ark 1993). Koagulaz pozitif stafilokokların üzerinde oluşan kalın fibrin tabakasının, mikroorganizmayı fagositoza karşı koruyarak, patojenliğe katkı sağladığı ileri sürülmektedir (Tünger A. 2004).

1.5.3. Lipaz

S. aureus'un tüm suşları ve *Koagulaz Negatif Stafilokoklar*'ın % 30'undan daha fazlası birkaç farklı lipaz üretirler (Cauwelier ve ark 2004). Lipaz, yağları hidrolize ederek vücudun lipid içeren bölgelerinde stafilokokların yaşamasını sağlamakta ve stafilokokların yüzeysel dokuları invaze ederek fronkül ve karbonkül gibi infeksiyonlarının gelişimine neden olmaktadır (Tünger 2004).

1.5.4. Hiyalüronidaz

S. aureus'ların % 90'dan fazlası tarafından üretilir. *S. aureus*'un dokulara yayılımını kolaylaştırır (Cauwelier ve ark 2004). Bağ dokusunun aseluler matriksindeki asit mukopolisakkaridler olan hiyaluronik asidi hidrolize eden enzimlerdir (Tünger 2004).

1.5.5. Deoksiribonükleaz (DN)

DNaz enzimleri endo ve ekzonükleaz aktivitesine sahip, nükleik asitleri 3'-fosfomononukleotidlere parçalayan fosfodiesterazlardır (Tünger 2004).

1.5.6. Fibrinolizin

Stafilokinaz olarak da adlandırılan bu enzim, *S. aureus* suşlarının neredeyse tamamı tarafından üretilir. Fibrin pıhtısını çözer (Cauwelier ve ark 2004).

1.5.7. Nükleaz

Diğer bazı türler de bu enzimi üretiliyor olmasına rağmen, termostabil nükleaz enzimi, *S. aureus* için önemli bir markerdir. Bu enzimin infeksiyon patogeneziindeki fonksiyonu bilinmemektedir (Chambers 1997).

1.5.8. Laktamazlar

Klinik kullanıma girdiği dönemlerde hemen tüm stafilokok kökenleri penisiline duyarlı iken, günümüzde özellikle hastane kaynaklı izolatlarda bu oran % 5'in altına düşmüştür. Stafilokoklarda penisilin direncine neden olan mekanizma beta-laktamaz üretimidir (Tünger 2004).

1.5.8.1. Penisilinaz (beta-laktamaz)

Penisilin tedavide ilk olarak kullanıldığı 1941'de Stafilokok izolatlarının % 90'dan fazlası bu antibiyotiğe duyarlıydı. Ancak, bu organizmaların primer olarak penisilinaz (beta-laktamaz) üretebilmeleri, penisiline çok hızlı bir şekilde direnç gelişmesine sebep oldu.

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

- 1- Karboksi peptidazlar (Düşük molekül ağırlıklı PBP'ler).
2. Transpeptidazlar (Yüksek molekül ağırlıklı PBP'ler)
3. Beta-laktamazlar (Berger-Bachi ve Rohrer 2002)

Bütün PBP'lerin yanı sıra, beta-laktamazların çoğunluğu da aktif bölgelerinde bir serin aminoasidine sahiptirler. Bu nedenle "serin peptidazlar" olarak adlandırılan bir enzim üst ailesinde yer alırlar. Bu enzimlerin beta-laktam ajanlara bağlanması sırasında önce bir açıl-enzim türevi oluşmaktadır. Bunu izleyen basamakta, bir deaçilasyon işlemi gerçekleşir ve enzim açıl molekülünden ayrılarak rejenere olur. PBP'ler ve Beta-laktamazlar arasındaki farkı bu deaçilasyon basamağının hızı belirler. Beta-laktamazlar açıl türevinden kısa sürede ayrılır, ancak PBP'lerde bu basamak gerçekleşmez. Sonuçta reaksiyon beta-

laktamazların aksine enzim inaktivasyonu ile sonlanır. Geniş bir enzim grubu olan beta-laktamazlar moleküler yapılarına ve işlevsel özelliklerine göre sınıflandırılırlar. Bu güne kadar dört farklı moleküler sınıf (A, B, C, D) tanımlanmıştır. A, C ve D moleküler sınıflarında yer alan Beta-laktamazlar yukarıda açıklanan serin-ester aracılıklı mekanizma ile işlev görürler. Sınıf B Beta-laktamazlar ise kofaktör olarak çinko gerektiren metalloenzimlerdir. A sınıfı, tercihen substratı penisilinler olan beta-laktamazlardan oluşur. Bu grup enzimler içerisinde *S. aureus* 'un beta-laktamazları (Grup 2a) da yer alır. Gram (+) bakteriler arasında Beta-laktamaz üreten en önemli patojen Stafilokoklardır. Stafilokokal beta-laktamazlar tercihen penisilinleri hidrolize ederler. Çoğu indüklenebilir ve ekstrasellüler olarak salınabilen enzimlerdir. Stafilokokal Beta-laktamazlar genellikle küçük plazmidlerle veya transpozonlarla taşınmakla beraber, büyük plazmidlerin kodladığı beta-laktamazlar ve diğer direnç mekanizmaları da bulunmaktadır. Bu Beta-laktamaz enzimini kodlayan genler sadece *S. aureus* 'lar arasında değil, *S. aureus* ve *Staphylococcus epidermidis* arasında da konjugasyonla transfer edilebilir (Kuyucu 2007).

1.6. Toksinleri

S. aureus, konak hücre morfolojisini ve/veya fonksiyonunu etkileyen çok sayıda ekstrasellüler toksin üretebilir. Bunlardan bir kısmı toksik etkilerini enzimatik aktivite ile gösterirken, diğerleri superantijen özellikleri nedeniyle sitokin salınımını indükler. Ayrıca, bu toksinler sayesinde stafilokoklar yoğun inflamatuvar yanıt olan bölgelerde bile üremelerini sürdürebilirler (Muray ve ark 2005).

S. aureus beş sitolitik veya membran hasarlayıcı toksin [alfa, beta, delta, gama ve Panton-Valentin (P-V) lökosidin], iki eksfoliyatif toksin (A ve B), sekiz enterotoksin (A, B, C, D, E, G, H ve I) ve toksik şok sendrom toksin-1 (TSST-1)'i içeren çok sayıda virulans faktörü üretir. Sitotoksinlerin nötrofilleri parçalaması sonucu salınan lizozomal enzimler çevre dokuda yıkıma neden olabilirler. Sitotoksinlerden biri ve P-V lökosidin şiddetli pulmoner ve kutanöz infeksiyonlarla ilişkilendirilmektedir (Muray ve ark 2005). Eksfoliyatif toksin A, TSST1 ve enterotoksinler süper antijenler olarak bilinen polipeptidler sınıfına aittir (Muray ve ark 2005).

1.6.1. Sitolitik Toksinler

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

1.6.1.1. Alfa toksin

Bu toksin ilk kez Kraus ve Clairmont tarafından 1900 yılında tanımlanmıştır. Bakteriyel kromozom ve plazmidlerin her ikisi tarafından da kodlanabilen, insan ve hayvanlarda hastalık oluşturan *S. aureus*'un çoğu suşları tarafından üretilen 33 kD'luk bir polipeptittir (Muray ve ark 2005). *S. aureus* insan suşlarının ana hemolizindir. Hemolitik, dermonekrotik, lizozom parçalayıcı ve doku kültürlerinde sitolitik etkileri vardır. Tavşan eritrositleri için hemolitik aktivitesi en fazladır, insan eritrositlerine fazla bir etkisi yoktur. İnsan makrofajları ve trombositleri üzerine litik etkisi vardır, monositlere etkisizdir. Dolaşım, kas ve böbrek korteksi dokuları toksine karşı duyarlıdır, bu dokularda tahribat yapar (Cengiz 1999).

1.6.1.2. Beta toksin

İlk kez 1935'te Glenny ve Stevens tarafından tanımlanmıştır. Stafilokok sfingomyelinazıdır. En iyi koyun, daha az olarak insan ve tavşan eritrositlerini eritir. Soğukta ve sfingomyelin üzerine etki ederek eritrositleri eritir (Cengiz 1999). Sfingomyelinaz C olarak da adlandırılan beta toksin, insan ve hayvanlarda hastalık oluşturabilen *S. aureus*'un çoğu suşu tarafından üretilen, 35 kD'lık ısıya duyarlı bir proteindir. Bu enzim sfingomyelin ve lizofosfatidilkolin için spesifikiteye sahiptir ve eritrosit, fibroblast, lökosit ve makrofajları da içeren çoğu hücre için toksiktir. Beta toksinin insan hastalıklarındaki rolü henüz tam olarak açıklanamamıştır. Ancak alfa toksinle birlikte Stafilokok hastalıklarının karakteristik abse formasyonu ve doku yıkımından sorumlu olabileceğine inanılmaktadır (Muray ve ark 2005).

1.6.1.3. Gama toksin ve Panton-Valentine (PV) lökositidin

1938'de Smith ve Price tarafından tanımlanmış, Mollby Wadstron tarafından elde edilmiştir. İnsan, tavşan ve koyun eritrositleri duyarlıdır, at ve kuş eritrositleri dirençlidir.

Özellikle stafilokoklara bağlı kemik infeksiyonlarında kanda bu toksine karşı antikor düzeyinin yüksek bulunması, bu toksinin bu hastalıklarda etkili olduğunu düşündürmektedir (Cengiz 1999).

Hemen hemen tüm *S. aureus* suşları tarafından üretilen gama toksin ve *S. aureus* suşlarının % 5'inden azı tarafından üretilen P-V lökosidin iki polipeptid zincirinden oluşan çift komponentli S (yavaş) ve F (hızlı) toksinlerdir. Şimdiye kadar üç S ve iki F protein tanımlanmıştır. Her iki toksini üretme yeteneğindeki bakteri bu proteinlerin tümünü 6 farklı toksin üretme potansiyeli ile kodlayabilir. Bu toksinler nötrofil ve makrofajları parçalayabilir. P-V lökosidin toksini lökotoksiktir ancak hemolitik aktivitesi yoktur. Bu toksinlerin sitolitik etkisi membranlarda porus oluşumunu takiben hücre katyon gradyanındaki değişikliklere bağlı gelişen osmotik değişikliklerden kaynaklanır (Martins ve ark 2007).

1.6.1.4. Delta toksin

Bu toksini 1947'de Williams ve Harper tanımlamıştır. *S. aureus* suşları ve diğer Stafilokoklar tarafından üretilen 3 kD'lik bir polipeptidtir. İnsan, tavşan, koyun ve maymun eritrositlerini eritir. Biyolojik etkinliği geniş olup, eritrosit, lokosit, makrofaj, lenfosit ve trombositleri hasara uğratan bir proteindir. Diğer memeli hücreleri ve hücre içi membran yapılarını da içeren geniş bir sitolitik aktiviteye sahiptir. Delta toksin kısmi nonspesifik membran toksitesiyle deterjan benzeri etki gösterir. Antijenik özelliğe sahip değildir (Pereira ve ark 2007). Bu sitolitik toksinlerden alfa ve delta toksin, insanlarda hastalık oluşturan *S. aureus* suşlarında en çok bulunanlardır. *S. aureus* suşlarının % 95'inde bunlardan biri, % 82'sinde her ikisi birlikte bulunur (Cengiz 1999).

1.6.2. Lökositin

S. aureus tarafından oluşturulan bu toksinin polimorf nükleik lokositler ve makrofajlar üzerine litik etkisi vardır. Diğer hücreleri etkilemez. Toksin elektroforetik olarak birbirinden ayrı F (hızlı) ve S (yavaş) adında iki protein komponentinden oluşmuştur. Bu komponentlerden her biri iyi antijen yapısında olup, her birinden ayrı toksoid oluşturulur. Hücre zarında potasyum ve diğer katyonlara karşı geçirgenliği artırıcı gözeneklerin açılmasını sağlayarak etkili olurlar (Cengiz 1999, Waldvogel 2000).

1.6.3. Eksfoliyatif toksin (Eksfoliyatin)

Epidermolitik toksin olarak da bilinen bu toksin, stafilokok enfeksiyonlarının veziküler ve eksfoliyatif deri lezyonlarından sorumludur. Haşlanmış deri sendromu bu toksinle oluşur. Eksfoliyatif toksinin iki farklı şekli (ETA ve ETB) tanımlanmıştır. Her ikisi de hastalık yapabilir. ETA ısıya dirençli ve geni kromozomaldır. ETB ise ısıya duyarlı ve plazmid aracılıdır (Bilgehan H. 2004). Ultrastrüktürel çalışmalar, serin proteazlar olan bu toksinlere maruz kalma sonucunda epidermisin stratum granulosum tabakasındaki intrasellüler köprüler (desmozomlar)'ın ayrılmasının gerçekleştiğini göstermiştir. Bu olayın tam mekanizması hala bilinmemektedir. Bu toksinler hücre yıkımı veya inflamasyonla ilişkili değildir. Bu yüzden epidermisin etkilenen tabakasında ne Stafilokoklar ne de lökositler bulunmamaktadır. Epidermisin toksine maruz kalması sonucu koruyucu nötralizan antikorlar gelişir. Haşlanmış deri sendromu çoğunlukla küçük çocuklarda ve nadiren de büyük çocuklar ve erişkinlerde görülür. Bunun muhtemel sebeplerinden birisi ETA ve ETB'nin, duyarlı yenidoğanların epidermisinde bulunup büyük çocuk ve erişkin epidermisinde bulunmayan GM4 benzeri glikopeptidlere bağlanmalarıdır (Livermore 2000).

1.6.4. Toksik şok sendromu toksini-1 (TSST-1)

Toksik şok sendromunda yer alan stafilokokların çoğu faj-1 grubundan 29 ve 52 tiplerindendir. Bu özgül toksini salgılayan *S.aureus* suşlarının hastane kaynaklı olabileceği bildirilmektedir (Cengiz 1999, Bilgehan H. 2004). Önceden pirojenik ekzotoksin C ve enterotoksin F olarak isimlendirilen TSST1, ısı ve proteolize dirençli, 22 kD'luk kromozom aracılı bir ekzotoksindir. Menstruasyonla ilişkili toksik şok sendromundan (TSS) *S. aureus* suşlarının % 90'ı, diğer TSS şekillerinden ise *S. aureus* suşlarının yarısının sorumlu olduğu tahmin edilmektedir. Enterotoksin B ve nadiren enterotoksin C menstruasyonla ilişkili olmayan TSS'lerin yaklaşık olarak yarısından sorumlu tutulmaktadır. TSST-1'in mukozal bariyerlerden penetre olma kabiliyeti TSS'nin sistemik etkisinden sorumludur. TSS'li hastalarda ölüm, multiorgan yetmezliğine neden olan hipovolemik şok nedeniyledir (Livermore 2000).

1.6.5. Enterotoksinler

Stafilokokal gıda zehirlenmeleri, enterotoksijenik özelliğe sahip stafilokokların gıdalarda 10^6 kob/g veya daha yüksek sayıya ulaşması sırasında sentezlenen bir ekzotoksin olan enterotoksinin, alimenter yol ile alımı sonucu oluşmaktadır. *S. aureus* enterotoksijenik stafilokoklar içerisindeki en önemli türdür. *S. aureus* dışında *S. intermedius*, *S. hyicus* ve *S. epidermidis* türleri de enterotoksin oluşturma özelliğine sahiptir (Bilgehan H. 2004).

Isıya dirençli, 100 °C'ye 30 dakika dayanabilen, polipeptid yapısında maddelerdir. Özellikle yüksek CO₂'li atmosfer ortamında karbonhidratlı ve proteinli besiyerlerinde üreyen stafilokoklar tarafından oluşturulurlar. Enterotoksinin A, B, C1, C2, D, E ve F şeklinde yedi immunolojik tipi vardır. *S. aureus* kökenlerinin % 35-50'sinin bu toksinleri oluşturabildikleri saptanmıştır. A ve D besin zehirlenmelerinde, B ise hastane enfeksiyonlarında çok karşılaşılan bir toksindir. Özellikle burun veya nazofarenks portörlerinden oluşan gıda elleyicilerinin kontamine ettiği gıdalarla besin zehirlenmesi tablolarına yol acarlar. Besin zehirlenmelerinde tablo, stafilokok üremiş ve enterotoksin oluşmuş besinlerin yenmesini izleyen 2-6 saat içinde bulantı, kusma ve ishal ile başlar. Semptom ve bulgular genellikle 24 saat içinde düzelir. İyileşme tamdır. Enterotoksijenik stafilokok üremesine uygun ortam oluşturan besin maddeleri arasında jambon, patates, salam, dondurulmuş tavuk, sut tozu, yağ, krema ve mayonez sayılabilir. Kusturucu etkileri mide ve barsaklardaki reseptörler aracılığıyla Nervus vagus ve sempatik sinirler yoluyla kusma merkezine iletilen uyarı ile oluşmaktadır. İshal oluşturmaları barsak lümeninden su absorpsiyonunun engellenmesi ve mukozadan barsak boşluğuna sıvı boşalmasının artması yoluyla olur (Waldvogel 2000, Bilgehan 2004).

1.6.5.1. SE'lerin dizi analizleri

Stafilokokal Enterotoksin A (SEA): SEA'yı kod-layan *entA* geni, bir bakteriyofaj tarafından taşınmaktadır. Bu fajın sirkülarizasyon ve karşılıklı gen aktarımının bakteriyel kromozom içerisinde tamamlandığı saptanmıştır. *entA* geninin faj bağlanma bölgesine yakın bir yerde lokalize olduğu, 771 baz çiftinden oluştuğu ve 257 aminoasit rezidüsünün *entA* prekürsörünü kodladığı bildirilmektedir. Bu yapıda 24-rezidürlük bir N-terminal hidrofobik ön dizilimi işlenmekte ve 27,100 Da moleküler ağırlığındaki SEA'nın son şeklini oluşturmaktadır (Erol ve İşeri 2004).

Stafilokokal Enterotoksin B (SEB): SEB salınımını düzenleyen *entB* geninin kodlama bölümü yaklaşık 900 nükleotit içerir. SEB prekürsör proteinleri 267 aminoasitten (31,400 Da) oluşur ve 27 aminoasitlik N-terminal sinyal peptidini içine alır. Gıda zehirlenme-lerinde *S. aureus*'un klinik izolatları içinde *entB* geninin kromozomal yapıda olduğu, fakat diğer bakteri suşlarında genin 750 kb (kilobaz)'lık bir plazmid tarafından taşındığı bildirilmektedir (Derbentli 2005).

Stafilokokal Enterotoksin C (SEC): Antijenik olarak SEC'nin SEC1, SEC2 ve SEC3 olmak üzere üç farklı alt tipi bulunmaktadır. Bütün SEC'ler 801 baz çifti ve 27 rezidülek bir sinyal peptid içermektedir. SEC1 ve SEC2'nin sinyal peptidleri benzerdir. *entC1* nükleotid dizilimi *entB*'yi kodlayan genle % 74, SPE A ile % 59 gibi oldukça yüksek bir oranda benzerlik gösterir. SEC3'ün sinyal peptidi diğer SEC'ler ile % 77.7'lik bir benzerlik gösterir. SEC3 ve SEC2'nin olgun formu ara-sında yalnızca 4 aminoasitlik bir fark (% 98 benzerlik) vardır. Diğer yandan SEC1'in SEC2 ile arasında 7 (% 97.4 benzerlik), SEC3 ile arasında da 9 aminoasitlik (% 97.9 benzerlik) bir fark olduğu bildirilmiştir (Erol ve İşeri 2004).

Stafilokokal Enterotoksin D (SED): SED'yi kodla-yan gen olup bu gen 27.6-kb penisilinaz plazmidi üzerinde yer alır. Bu plazmid pIB485 olarak bilinir. *entD* geni 30 aminoasitlik sinyal peptid içeren 258 aminoasidi kodlar. 228 aminoasit olgun polipeptid yapısı 26,360 Da moleküler ağırlığa sahiptir ve diğer SE'lerin dizilimine yüksek düzeyde benzerlik gösterir. SED süperantijeni MHC sınıf II molekülleri ile yüksek düzeyde afinite göstermek için Zn^{+2} 'ye bağlanır ve bunun sonucunda SED Zn^{+2} ile birlikte kristalize olur (Waldvogel 2000).

Stafilokokal Enterotoksin E (SEE): *entE* geni 771 baz çifti içerir ve 26.000 Da moleküler ağırlığı ile olgun ekstraselüler bir form oluşturur. DNA dizilimleri SEE, SED ve SEA'nın yakın ilişkili olduğunu göster-mektedir. SEE, SEA ile birlikte % 84 gibi yüksek bir oranda dizilim benzerliğini paylaşır (Waldvogel 2000).

Stafilokokal Enterotoksin G (SEG): *entG* geni 777 nükleotid içerir ve 233 aminoasitli toksine dönüşmek üzere bölünen 258 aminoasitli prekürsör proteini kodlar. SEG SPEA, SEB, SEC ve SSA'ya (streptokokal süperantijen A) en çok benzeyen toksindir (Erol ve İşeri 2004).

Stafilokokal Enterotoksin H (SEH): SEH, 27,300 Da moleküler ağırlığında bir enterotoksindir. SEH grup I ile % 36-38 oranında benzerlik gösterir. SEH, diğer SE'ler ile benzer yapıya sahiptir, fakat biyolojik özellikleri daha az karakterize edilmiştir. SEH, SEA'dan daha az potansiyele sahip olmasına rağmen insan T hücreleri içerisinde güçlü mitojenik aktivite gösterir ve insan MHC sınıf II molekülüne bağlanma afinitesi yüksektir (Ferens 1998).

Stafilokokal Enterotoksin I (SEI): *entI* geni 729 nükleotid içerir ve 242 prekürsör proteini kodlayan ami-noasit ile sonlanır. 24,928 Da moleküler ağırlığında olgun proteinlere karşılık 218 aminoasitten oluşan toksin formuna dönüşür. SEI, grup I'e grup II'den daha çok benzerlik gösterir, fakat diğer SE'lere oranla bu benzerlik daha azdır. SEI % 26-28 aminoasit oranıyla en fazla SEA, SEE ve SED'ye benzer (Erol ve İşeri 2004, Ferens 1998).

Stafilokokal Enterotoksin J (SEJ) : *entD* bir plazmid tarafından kodlanmaktadır. Enterotoksin D ve J'nin açık okuma bölümleri zıt yönlerde yer almakta ve birbirinden her bir kolu 21 nükleotid uzunluğunda olan dönüşüm tekrarı içeren 895 nükleotid intergenik bölgeyle ayrılır. 269 aminoasitli SEJ proteini SEA, SEE ve SED'ye % 64-66 oranlarında dizilim benzerliği gösterir. PCR uygulamaları, *entJ* determinantının bütün SED'leri kodlayan plazmidlerde bulunabileceğini düşündürmektedir (Fueyo 2001).

Stafilokokal Enterotoksin K (SEK): SEK son zamanlarda keşfedilen yeni bir enterotoksindir. 26,000 Da moleküler ağırlığına sahiptir ve deneysel çalışmalarda izoelektrik noktası 7.0-7.5 olarak belirlenmiştir (Park 2006).

1.6.5.2. Enterotoksin oluşumunu etkileyen faktörler

1.6.5.2.1. Ekstrasellüler faktörler

Besin maddeleri: Düşük su aktivi-tesi değerine sahip besi yerine prolin ilave edilmesiyle SEB oluşumunun stimüle edildiğini ancak, glisin, betain ve karnitin ilavelerinde bu etkinin görülmediğini bildirmişlerdir. Demir, inorganik fosfat, karbondioksit veya bikarbonat içeren besiyerleri sekonder metabolitlerin oluşumunu artırmaktadır. Magnezyumun SEC, de-mirin ise SEB oluşumunu yüksek düzeyde etkilediği bildirilmiştir (Katsuhiko 2002).

Sıcaklık: *S. aureus*'un üremesi için gerekli optimum sıcaklık derecesi 37°C iken enterotoksin üretimi için optimum sıcaklık 40-45°C arasında değişmektedir (Erol ve İşeri 2004, Silva 2006).

pH değeri: Enterotoksinlerin oluşumu için optimum pH değerleri 6-7 arasındadır. SEB oluşumu ile karşılaştırıldığında SEA oluşumu pH değişikliklerine daha toleranslıdır (Silva 2006).

Atmosferik koşullar: Anaerobik koşulların *S. aureus*'un gelişimi ve SEA oluşumu üzerine etkilerini araştırdıkları bir çalışmada, stafilokokal hücre yoğunluğunun aerobik koşullarda anaerobik koşullara göre 9-17 kat daha fazla olduğu bulunmuş ve SE oluşumunun gelişmeye bağlı olduğu gösterilmiştir. Anaerobik ortamda yavaş gelişme az toksin oluşumuna neden olurken her iki koşulda da inkübasyonun 120. dakikasından sonra SEA belirlenebilmiştir (Silva 2006).

Sodyum klorür (NaCl) ve su aktivitesi: % 5'lik NaCl konsantrasyonları tuzsuz ortamlara oranla *S. aureus* üremesini artırırken, % 7.5 ve % 10 düzeylerindeki tuz konsantrasyonu üremeyi kısmen geciktirdiği bildirilmiştir. Düşük a_w değerinin SEA ve SEB biyosentezi üzerine etkisini araştırdıkları bir çalışmada, SEB oluşumunun düşük a_w değerine SEA oluşumundan daha duyarlı olduğunu ortaya koymuşlardır. (Erol ve İşeri 2004, Silva 2006)

Diğer kimyasal maddeler: Laktobasiller tarafından üretilen veya gıdalara ilave edilen hidrojen peroksit *S. aureus*'un üremesini inhibe edebilmektedir (Park 2006).

Rekabetçi özellik: Stafilokoklar genel olarak zayıf rekabetçi özelliğe sahip bakterilerdir. Sıvı besi yerinde *Pediococcus cerevisiae* ve toksin oluşturan *S. aureus* suşları arasındaki etkileşimler stafilokokların 20 kat daha az SEA, SEB ve SEC oluşturmalarıyla sonuçlanmıştır (Park 2006).

1.6.5.2.2. İntraselüler faktörler

Stafilokokal enterotoksin tiplerinin oluşturulmasında enterotoksijenik özellikteki stafilokok hücrelerinin bulunduğu gelişme fazları önemli etkiye sahiptir. Buna ilişkin olarak SEA, hücrenin logaritmik fazında, SEB, SEC ve SED geç logaritmik faz veya erken

duraklama fazında oluşturulur. *S. aureus* 'un virulans faktörlerinin düzenlenmesinde *agr* (accessory gene regulator) geninin rolü büyüktür. *Agr* lokusundaki mutasyonlar birçok SE ve diğer ekzo-proteinlerin oluşumunun azalmasıyla sonuçlanır (Katsuhiko 2002).

1.6.5.3. Enterotoksinlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri

SE'ler tek zincirli basit proteinlerden oluşan heterojen bir gruptur. Bunların çoğu nötral ya da bazik proteinlerdir. Hidroliz yoluyla 18 aminoasit üretirler ve yüksek oranda lizin, aspartik asit, glutamik asit ve tirozin içerirler. Zincirde sadece iki adet yarım sistin rezidüsü ile bir veya iki adet triptofan molekülü bulunur.

SE'ler higroskopik özellik göstererek su ve tuzlu solüsyonlarda çözünme özelliğine sahiptirler. Enterotoksinler pH<2'de pepsin hariç insan intestinal sisteminin proteolitik enzimlerine dirençlidir.

SE'lerin ısıya dayanıklılıkları üzerine yaptıkları bir çalışmada, SEA ve SEB'nin 100°C'de 90 dakikada, 120°C'de 30 dakikada, SEC'nin 100°C'de 180 dakikada, 120°C'de 60 dakikada tamamen inaktive olduğunu bildirmişlerdir. Termal dayanıklılıkta önemli kriterler; toksinin saflığı, serolojik tipi, yaklaşık toksin miktarı, ısı işlemi uygulanan ortam, ortamın pH değeri ile teşhis ve saptama yöntemidir. Toksinler kurumaya ve gama ışınlarına yüksek direnç gösterirler (Katsuhiko 2002, Erol İ., İşeri Ö. 2004).

1.6.5.4. Stafilokokal enterotoksinlerin genetik özellikleri

Stafilokokal enterotoksinler (SE) filogenetik ilişki, yapı ve dizilim homolojisini paylaşan stafilokokal ve streptokokal pirojenik ekzotoksinlerden (PT) oluşan geniş bir familya içerisinde yer alır. Bu gruba stafilokokal enterotoksinler, toksik şok sendrom toksininin (TSST) iki formu ve streptokokların pirojenik ekzotoksinlerinin bir grubu (SPE A, B, C, F, G, H, J ve streptokokal süperantijen) dahildir (Ferens 1998, Erol ve İşeri 2004).

SE'ler, 5 temel serolojik tipten oluşan (SEA, SEB, SEC, SED, SEE) ısıya dayanıklı enterotoksinlerin oluş-turduğu bir gruptur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda SE'lerin yeni tiplerinin de var olduğu (SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN ve SEO) bildirilmiş ancak bu enterotoksinlerin gıda zehirlenmeleri ile ilişkileri henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır (Fueyo 2001).

1.7. Stafilokokların İdentifikasyonu

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

1.7.1. Katalaz Testi

Micrococcaceae familyalarındaki stafilokok ve mikrokokları, *Streptococaceae* familyası üyelerinden ayırt edici bir deneydir. Bu test eritrosit içeren besiyerlerinde yapılmamalıdır. Çünkü eritrositlerde katalaz enzimi bulunmakta ve deney sonunda hatalı pozitiflik gözlenmektedir. *Micrococcaceae* familyası (*Staphylococcus* spp. ve *Micrococcus* spp.) katalaz pozitif, *Streptococaceae* familyası üyeleri ise katalaz negatiftirler (Bilgehan H. 2004).

1.7.2. Koagulaz Testi

Koagulaz enzimi plazmanın pıhtılaşmasında görev alır. Trombin katalizörlüğü ile meydana gelen fibrinojenden fibrin oluşumunu sağlar. Bakteriler bu enzim sayesinde plazmayı pıhtılaştırır. Oluşturdukları fibrin zırhı ile kaplanarak fagositoza karşı korunurlar. Koagulaz testi, *S. aureus*'un diğer stafilokoklardan ayırt edilmesinde en çok önem taşıyan deneydir. Stafilokok kolonisi görüntüsü veren ve Gram boyasında Gram (+) koklar saptanan tüm izolatlarda yapılmalıdır. Pigment hemoliz, mannitole etki gibi deneylerin hiç birisi *S. aureus*' un ayırımında bu kadar değerli değildir. Tüp deneyi ve lam deneyi olmak üzere iki şekilde yapılabilir. Tüp deneyinde stafilokokların besiyerine saldıkları serbest koagulaz; lam deneyinde ise kümeleştirme faktörü olarak da bilinen bağlı koagulaz araştırılmaktadır. Lam deneyi hızlı sonuç vermekle birlikte, *S. aureus* suşlarının % 10-15'i bu yöntemle negatif sonuç verebilir. Mannitolü yalnız *S. aureus* parçaladığı halde koagulaz negatif olanlar parçalamazlar (Bilgehan H. 2004, Waldvogel P. 2000).

1.7.2.1. Lam koagulaz testi

S. aureus suşlarının çoğu hücre duvarında bağlı koagulaza veya 'clumping faktör'e sahiptir. Bu faktör hızlı hücre aglütinasyonuna sebep olan plazmadaki fibrinojen ile direk tepkimeye girer. Bu test kanlı agar, Columbia Colistin Nalidixic Agar ya da diğer nonselektif nutrient besiyerinde üreyen kolonilerden yapılabilir. Fakat yüksek tuz oranı *S.*

aureus'un bazı suşlarında otoaglutinasyona sebep olduğu için bu test, yüksek tuz içeren besiyerlerinden (mannitol salt agar gibi) yapılmamalıdır. Clumping faktöre sahip olmayan suşlar serbest koagulaz üretebileceği için, herhangi bir suş lam koagulaz testinde negatif çıkarsa bu sonuç bir tüp koagulaz testi ile doğrulanmalıdır. *S. lugdunensis* ve *S. schleiferi* gibi koagulaz negatif bazı suşlar clumping faktör üretilen lam koagulaz testi ile pozitif sonuç verebilirler (Winn ve ark 2006).

1.7.2.2. Tüpte koagulaz

Bu metot ile saptanan koagulaz ekstrasellüler olarak salınır ve bir kompleks oluşturmak için plazmadaki Koagulaz Reaktif Faktör-Coagulase Reacting Factor (CRF) ile reaksiyona girerek stafilotrombin oluşturur. Stafilotrombin de fibrinojenle reaksiyona girerek fibrin oluşumunu tetikler. Bazı suşlar, 35°C'de uzayan inkübasyon periyodunda pıhtının çözülmesine sebep olan fibrinolizin üreteceği için testler 35°C'de 4 saat inkübasyondan sonra oda ısısına alınmalıdır ve 18–24 saat sonra tekrar okunmalıdır. Nadiren bazı *S. aureus* suşları koagulaz negatif olabilmektedir (Winn ve ark 2006). Yukarıda sözü edildiği gibi hem tüp hem de lam koagulaz testi için önerilen ortam EDTA'lı tavşan plazmasıdır. *Enterococcus* türleri gibi organizmalar sitratı kullanabildiği için sitratlı plazma kullanılmamalıdır. Şayet katalaz testi yapılarak stafilokok olduğu kesin tanımlanmamışsa yanlış pozitif sonuca gidilebilir. İnsan plazması çeşitli miktarda CRF ve antistafilokokal antikorlar içerdiğinden koagulaz testi yapmada kullanılmamalıdır (Winn ve ark 2006). Tüp koagulaz testi *S. aureus* identifikasyonu için referans testdir. Bu test, pozitif sinyal veren kan kültüründen doğrudan tavşan plazması içerisine inokule edilerekte yapılabilir (Winn ve ark 2006).

1.7.3. Mannitol fermentasyonu

Karışık bakteri florası içeren materyalden stafilokokların ayırımı için kullanılmaktadır. *S. aureus* mannitolü daima kullanır. Reaksiyon mannitolün asit bileşiklere dönüşmesine dayanır. *S. epidermidis* mannitol fermentasyonu yönünden nadiren pozitifdir. Mannitole etki etmesi, koagülaz testinden sonra *S. aureus*'u diğer stafilokoklardan ayırt etmede en yararlı testtir (Bilgehan 2004, Waldvogel 2000).

1.7.4. Basitrasin direnci

Micrococcaceae familyasındaki *Micrococcus* cinsi basitrasine duyarlı, *Staphylococcus* cinsi basitrasine dirençlidir (Falk ve Guering 1983).

1.7.5. Novobiocin direnci

S. saprophyticus ve çok nadir olarak izole edilen bazı koagulaz olumsuz stafilokoklar (*S. cohnii*, *S. lentus*, *S. sciuri* ve *S. xylosus*) bu antibiyotiğe dirençli olduğu halde *S. epidermidis* ve *S. aureus* duyarlıdır (Bilgehan 2004).

1.7.6. Glukoz fermentasyonu deneyi

Micrococcaceae familyasındaki *Micrococcus* genusu oksidatif, *Staphylococcus* genusu fermentatif etki verir (Bilgehan 2004).

1.7.7. Amplifikasyon ve Dizi analizi

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

Bakteri ribozomlarının 30S ve 50S alt birimlerinden elde edilen 5S ve 16S rRNA'ların baz dizileri çalışmalarda çok yaygın olarak kullanılmaktadır. rRNA'lar bütün mikroorganizmalarda bulunurlar ve mikroorganizma evrimi ile ilişkilerini araştırmada idealdirler. Bütün ribozomlardaki işlevleri aynıdır; sabit ve kritik rolleri nedeni ile de yapıları zaman boyunca çok az değişir. Ana filogenetik grupların çoğunda 16S rRNA bir veya daha çok karakteristik nükleotid dizilerine sahiptir; bunlara “oligonükleotid imzaları” denir. 16S rRNA gen sekansı 1980'li yıllardan beri bakterilerin sınıflandırılmasında ve genotipik analizleri için önemli bir araç olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin kullanılmasıyla pek çok yeni cins ve tür ayrılmıştır. rRNA mutasyonlardan en az etkilenen genetik materyaldir. Bu amaçla araştırılan 16S rRNA, rRNA 30 S alt ünitesinde yer alan bir dizidir. Özellikle kültürde üretilmemiş veya klasik yöntemlerle zor identifiye edilebilen bakterilerin identifikasyonu için 16S rRNA hedef dizidir. 16S rRNA'nın birkaç bölgesi tüm bakterilerde çok iyi korunmuştur. Bu korunmuş bölgelerden seçilen primerler tüm bakterilerde 16S rRNA amplifikasyonunu sağlar ve bunlara üniversal

primerler denir. Çoğaltılan bölgeler aynı zamanda tür identifikasyonunu sağlayan özgün değişken bölgeleri de içerir. Bundan dolayı 16S rRNA gen sekansına dayalı analiz yöntemleri insanlarda klinik tanı laboratuvarlarında bakteriyel izolatların identifikasyonunda kullanılan önemli bir yöntem halini almıştır (Woo ve ark. 2000). Bakterilerin 16S rRNA sekansına dayalı moleküler identifikasyonu veteriner klinik sahada karşılaşılan bakterilerin tanımlanmasında da kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle veteriner rutin teşhis laboratuvarlarında *Koagulaz Negatif Stafilokoklar*'ın (KNS) tür düzeyinde identifikasyonları zor ve zaman alıcı olduğundan bu yöntem tercih edilmektedir. Günümüzde bazı KNS'ların da artık mastitise neden olan önemli patojen mikroorganizmalar oldukları bilinmektedir. Bu nedenle KNS olarak tanımlanan etkenlerde tür düzeyinde identifikasyon, yapılması gerekli bir analiz olarak ele alınmaktadır. Sekans yöntemi için bakterinin izolasyonu, bunlardan DNA ekstraksiyonu ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile 16S rRNA geninin çoğaltılarak sekanslanması gerekmektedir (Woo ve ark. 2000).

1.7.8. Lateks aglütinasyon

Bu yöntemde plazma ile kaplanmış lateks parçacıkları kullanılır. Latekse bağlı fibrinojen clumping faktörü saptar. Ayrıca parçacıklarda bulunan immunglobulin molekülleri stafilokokal hücre duvarı proteini olan protein A'yı da saptayabilir. Bu protein, IgG moleküllerinin Fc reseptörü ile bağlanabilmektedir. Bir agar plağından alınan kolonilerin test materyali ile karışması sonucu lateks-mikroorganizma süspansiyonu hızlı bir kümeleşme gösterir. Ayrıca *S. lugdunensis* ve *S. schleiferi*'nin bazı suşları da clumping faktör üretir ve bu test ile pozitif reaksiyon verebilir (Winn ve ark 2006).

1.7.9. Pasif hemaglütinasyon

Eritrositler ya da sentetik olarak hazırlanmış polistiren lateks gibi parçacıklar, çeşitli yöntemlerle çok çeşitli antijenlerle kaplanabilirler. Bu şekilde kaplanmış olduğu antijenin taşıyıcısı durumuna gelen eritrosit ya da parçacıklar, elektrolitli ortamda bu antijenlerin antikorları ile karşılaştıklarında aglütinasyon verirler. Dolaylı hemaglütinasyon denilen bu testler çok duyarlı olup, ortamda çok az antikor bulunması bile sonuç vermek için yeterlidir. *S. aureus* hücrelerinin yüzeyindeki clumping faktörü saptamak için fibrinojen ile sensitize edilmiş koyun eritrositleri bu amaçla kullanır (Winn ve ark 2006).

1.8. *S. aureus* için ek doğrulayıcı testler

1.8.1. Deoksiribonükleaz (DNase) testi

Bazı *S. aureus* suşları zayıf ya da şüpheli tüp koagulaz reaksiyonu oluşturabilirler ve nadiren gerçekten koagulaz negatif olabilirler. Bu vakalarda koagulaz ile çok iyi uyum gösteren ek testler yapmak gerekebilir. *S. aureus* endonükleolitik ve ekzonükleolitik aktiviteye sahip olan DNase ve termostabil nükleaz üretir (Gudding 1983). Bu enzimlerin her ikisi de nükleik asiti hidrolize eder. DNA'se içeren bakteriler, DNA içeren besiyerinde DNA'yı parçalayıp oligonükleotidler oluştururlar. Bu deneyde DNA'lı plak besiyerine saf kültürden çizgi ekimi yapıp 35°C'de 18-24 saat bekletildikten sonra plak yüzeyine 1 N HCl damlatılmasına dayanır. Bakteri DNase yapıyorsa ekim çizgisinin çevresinde saydam bir zon oluşur. Endikatör olarak besiyerine toluidin mavisi konulmuş ise DNA'se varlığında bakteriler ekim çizgisi çevresinde parlak pembe bir zon oluştururlar. İndikatör olarak Methyl green konmuş besiyerinde ekim çizgisi etrafında besiyerinin yeşil rengi açılır (Brakstad ve ark 1995). Besiyerine katılan toluidin mavisi DNase aktivitesini maskeleyebildiği için % 0.005'i aşmamalıdır. Bu test *S. aureus*'un identifikasyonunda ek bir test olarak yardımcı olmakla birlikte başka Stafilokoklar da pozitif DNA'se reaksiyonu verebilir (Waller ve ark 1985).

1.8.2. Termostabil endonükleaz testi

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

1.8.3 Mannitol fermentasyonu

S. epidermidis ve diğer koagulaz negatif türlerin aksine, *S. aureus* mannitolü fermente edebilir. *S. aureus*'un dışkı, çevre ve nasal taşıyıcılarda taranmasında bu özelliği

kullanılır. Kullanılan besiyeri “mannitol salt agar”dır. Bu besiyeri mannitol (% 1), NaCl (% 7.5), fenol kırmızısı ve peptonlar içerir. Bu yüksek tuz konsantrasyonu, enterekoklar dışındaki diğer mikroorganizmaların üremesini engeller ve seçici olarak Stafilocoklar ürer. İzole edilen *S. aureus* kolonileri, çevresinde mannitolden asit oluşumunu gösteren sarı bir zon varlığı ile saptanabilir. Nadiren başka stafilocok türleri de mannitolden asit üretebilir. Bu sebeple bu besiyerinde üretilen mannitol pozitif organizmalar kanlı agar besiyerine pasajlanıp koagulaz üretimi açısından test edilmelidir (Winn ve ark 2006). *S. aureus*’un identifikasyonunu sağlayan moleküler yöntemlerin çoğu PCR bazlıdır. İlk testler identifikasyonu doğrulamak için amplifikasyon ürünlerini Southern blotlamasını gerektiriyordu (Brown ve ark 2005). Fakat daha sonra, türe spesifik hedef bölgelerin amplifikasyonu için düzenlenmiş, protein genleri gibi hedef bölgeler içeren primer aralığı geliştirildi. Nükleaz (*nuc*), koagulaz (*coa*), protein A (*spA*) ve yüzey-ilişkili fibrinojen-bağlayan protein genleri gibi genler de *S. aureus*’un tanımlanmasında önemlidir. Ayrıca Stafilokokal Metisilin direncinin tespiti için *mecA* ve 16S rRNA gibi spesifik gen bölgelerini değerlendiren multipleks PCR yöntemi de mevcuttur (Grisold ve ark 2002). Ticari olarak bulunan real-time PCR ile başarı sağlanmıştır (Levi ve ark 2003). Real-time PZR, ekipmanı olmayan rutin laboratuvarlarda PCR’ye alternatif sunmak için bir kolorimetrik mikrokuyucuk formatında, *coa* geninden mRNA transkripsiyonunun izotermal sinyal aracılı amplifikasyonu kullanan yeni moleküler bir yöntem de gösterilmiştir (Levi ve ark 2003).

1.9. Epidemiyoloji

Stafilokoklar doğada çok yaygın olarak bulunan Gram pozitif bakterilerdir. Fizyolojik olmayan çevre koşullarına uzun süre dayanabilirler, yüksek tuz ve lipid içeren ortamlarda üreyebilirler (Bilgehan H. 2004). Fırsatçı patojen karaktere sahip olan bu etkenler, hayvanın stres altında kalması ve her türlü yaralanma sonucunda etkenin aktive olmasına ya da açılan portantrelerden vücuda girmesine sebep olur. İnsan ve hayvanlarda farklı klinik tablolarla seyreden hastalıklara neden olurlar. Hayvanlarda stafilocoklardan ileri gelen başlıca infeksiyonlar; mastitis, botriyomikozis, enzootik piyemi, artritis ve gıda zehirlenmeleridir (Waldvogel PA. 2000). Stafilocoklar her yerde bulunabilirler. İnsan ve hayvanların derilerinde *Koagulaz Negatif Stafilocoklar* vardır ve nemli deri kıvrımlarının *S. aureus*’la geçici kolonizasyonu yaygındır. Yeni doğanda kesilmiş göbek kordonu, deri ve perineal bölgenin *S. aureus*’la kolonizasyona sık rastlanır. *S. aureus* ve *Koagulaz Negatif Stafilocoklar*’ın orofarinks, gastrointestinal sistem (GİS) ve ürogenital sistemde de

bulunurlar. Büyük çocuk ve erişkinlerde kısa süreli veya kalıcı *S. aureus* taşıyıcılığı, ön nazofarinkste orofarinksten daha yaygındır. Normal sağlıklı erişkinlerin yaklaşık % 15'inde nazofaringial *S. aureus* taşıyıcılığı bulunmakla birlikte yatan hastalar, sağlık personeli, ekzematöz deri hastalığı olanlar ve sürekli ilaç kullananlarda daha yüksektir. Mukozal epitele bu mikroorganizmaların yapışması stafilokokal hücre yüzey adezinleri tarafından sağlanır (Murray ve ark 2005).

S. aureus infeksiyonlarının insanlarda doğal seyri özetlenecek olursa; pekçok yenidoğan, çocuk, yetişkinler ve hayvanlarda *S. aureus* ile kolonize olurlar ve bu mikroorganizmayı tercihen nazofarenkslerinde, bazen cilt ve giysilerinde, daha nadiren vajinalarında ya da rektum ya da perineal bölgelerinde barındırırlar. Bu bölgelerdeki *S. aureus* cilt veya müköz membranlardaki herhangi bir bölgeyi hayvandan hayvana transfer yoluyla, aerosol yolla veya direk kontakt yoluyla diğer konakları kontamine ederler. Müköz membranlar ve cilt, yerel doku invazyonuna karşı çok etkili bir mekanik bariyer oluştururlar. Bu bariyer incinme ya da cerrahi ile bozulursa, *S. aureus* alttaki dokuya girebilir ve nekrotik doku, fibrin ve çok sayıda canlı ve ölü polimorfonükleer lökositten oluşan lokal bir abse lezyonuna yol açabilir. Daha sonra çoğalan bakteriler lokal fagositik mekanizmaları aşabilir ve lenfatik kanallara ve kan dolaşımına girebilirler. Bunu izleyen stafilokokal bakteriyemi korkutucu bir komplikasyondur ve metastatik infeksiyonlara ve ölüme yol açabilir (Waldvogel PA. 2000). Metisiline dirençli *S. aureus* infeksiyonları 1970'lerin sonlarına doğru öncelikle Avrupa'da daha sonra Amerika'da endemik olarak görülmeye başlanmıştır. Daha az sıklıkta olmakla birlikte, MRSA'lar yaşlı bakım evleri, kreşler ve kronik intravenöz ilaç kullanıcıları gibi toplum kaynaklı infeksiyonlarda da etken olabilmektedir. Nazokomiyal infeksiyonların yaklaşık 2/3'ü yoğun bakım birimlerinde görülmektedir. Metisiline dirençli Stafilokokların kolonizasyon veya infeksiyon oluşturmada, uzun süreli hospitalizasyon, çeşitli antibiyotiklerle ve uzun süreli tedavi, Metisiline dirençli stafilokoklarla kolonize veya infekte hastalarla aynı kapalı ortamda bulunma hastalara ait önemli risk faktörlerini oluşturmaktadır (Durupınar 2001). Yanık vakalarındaki bireylerde bu risk oldukça yüksektir. Bu nedenle, nazokomiyal kökenli *S. aureus* infeksiyonlarının identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık paternlerinin erken ve doğru olarak tespiti son derece önemlidir (Durupınar 2001). Son yıllarda, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de hastanede yatan hastalardan izole edilen *S. aureus* suşlarında Metisilin direncinde ciddi artışlar saptanmaktadır (Derbentli 2005).

1.10. Stafilocokların antibiyotik direnci

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

Stafilokoklarda esas sorun son yıllarda giderek artan oranlarda görülen metisilin direncidir. Direnç bir bakterinin Beta-laktam grubu veya hücre duvarı sentezini inhibe eden diğer antibiyotiklerin öldürücü, çoğu zaman litik etkisine karşı ölüm oranlarının azalması olarak açıklanmıştır. Klinik materyallerden izole edilen Stafilocok suşlarının % 85-90'ı ve toplumdan izole edilenlerin yaklaşık o kadarı oluşturdukları beta laktamaz nedeniyle penisiline direnç kazanmışlardır. Bunların yanında metisilin, oksasillin, nafsillin gibi beta laktamaza dirençli penisilinlere karşıda gittikçe artan oranda direnç kazanmaktadırlar. Dünya çapında sık görülen bakterilere karşı direnç olayı hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde artmıştır (Akalin 1994).

Bakteriler tarafından üretilen beta laktamaz, Beta-laktam grubu antibiyotiklere (penisilin G ve ampisilin gibi) bağlanarak onları hidrolize eden ve bu yolla bakteriyel dirence neden olan enzimdir. Bu tür direnç beta laktam antibiyotiklerin beta laktamaz inhibitörleri ile kombine edilmesiyle ortadan kaldırılabilir (Ünal S. 2006).

Metisilin dirençli stafilocoklar metisilin duyarlı stafilocoklardan farklı olarak *mecA* genine sahiptir. Bu gen, β -laktamaz dirençli antibiyotik grubundaki metisilin, oksasillin gibi antibiyotiklere düşük ilgi gösteren penisilin bağlayan protein PBP2a'nın sentezlenmesinden sorumludur (Hartman ve Tomas 1986). MRSA izolatları PBP2a üretir. PBP2a beta laktamlara düşük afinitelidir ve bu nedenle beta laktam antibiyotiklerle karşılaştığında, beta laktam antibiyotiği bağlayamaz ve hücre duvar sentez fonksiyonunu sürdürür (Chambers 1997).

Özellikle metisilin dirençli *S. aureus* önemli bir hastane patojenidir. Bazı MRSA suşları hızla yayılabilme kapasitesine sahiptir. Bu suşlar yayılma kapasitesi olmayan diğer MRSA suşlarından ayırt edilebilmek için epidemik olarak tanımlanmaktadır. MRSA

suşlarının bir ortamdan başka ortama transferi canlı veya cansız çevre aracılığı ile olur ve genellikle temas yolu ile bulaşır (Köksal İ. 1992).

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

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

1.11. Tedavi

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

Stafilokokların neden olduğu mastitislerin tedavisinde istenilen sonuçların alınamaması stafilokoklara karşı yeni ve etkili antibiyotiklerin gerekliliğini ortaya koymuştur. Stafilokok infeksiyonlarına karşı Beta-laktam (penisilin ve sefalosporin) grubu antibiyotikler kullanılmaktadır. Ancak, stafilokoklar artık Beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı direnç kazanmakta ve antibiyotiği etkisiz hale getiren Beta-laktamaz enzimi sentezlemektedirler. Mastitisli sütlerden izole edilen stafilokoklarda Beta-laktamaz aktivitesi tespit edilmiştir. Stafilokok infeksiyonlarının tedavisinde penisilin ve sefalosporinler gibi Beta -laktam antibiyotiklere göre Beta -laktamazlara dayanıklı olan antibiyotikler (sefoksitin, metisilin, oksasilin, kloksasilin) geliştirilerek hem beşeri hem veteriner sahada kullanıma girmiştir. Fakat son otuz yılda metisiline dirençli suşların gelişmesi stafilokokal infeksiyonların tedavisinde tüm dünyada önemli sorun olmuş bu infeksiyonlarda tedavi, başarı oranını düşürmüştür (Ünal ve Akhan 1996).

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

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2. 1. GEREÇ

2. 1. 1. İzolasyon Örnekleri

Yapılan bu tez çalışmasında 2010 yılı yaz aylarında Aydın ili ve çevresinde bulunan laktasyon döneminde olan 50 adet kıl keçisi ve 50 adet Saanen keçisinin her birinden süt, deri, vaginal mukoza ve burun mukozasından olmak üzere toplamda 400 adet örnekleme yapıldı.

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

2. 1. 2. 1. Besiyerleri

2. 1. 2. 1. 1. Blood Agar (Merck 1. 10886)

Blood Agar.....	40 g
Distile su.....	1000 ml

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

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

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

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

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

2. 1. 2. 1. 3. Mueller-Hinton Agar (MHA) (Oxoid CM 129)

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

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

2. 1. 2. 1. 4. Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (% 20 Gliserinli) (Oxoid CM 0225)

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

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

2. 1. 2. 1. 5. Trypton Soya Broth (TSB) (% 7,5 Tuzlu) (Oxoid CM 129)

TSB.....	8 g
NaCl.....	75 g
Distile su.....	1000 ml

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

2. 1. 2. 1. 6. Stuart Transport Medium (Taşıma solusyonlu besiyeri) (BBL™)

Kullanılan besi yerinin içeriği aşağıda verilmiştir.

Sodium Thioglycollate	1.0 g
Sodium Glycerophosphate	10.0 g
Calcium Chloride	0.1 g
Methylene Blue	2.0 mg
Agar	3.0 g

2. 1. 2. 1. 7. DNase Test Agar (Merck 1.10449)

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

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

2. 1. 2. 2. Solusyonlar

2. 1. 2. 2. 1. TAE Elektroforez Buffer

50x konsantrasyonda stok solusyon aşağıdaki gibi hazırlandı:

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

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

2. 1. 2. 2. 2. Gel Loading Buffer (6 X)

Bromofenol mavisi.....	25 mg
Sukroz	4 g
H ₂ O	10 ml'ye

tamamlandı.

2. 1. 3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

2. 1. 3. 1. Kullanılan Cihazlar

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

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

25 mM MgCl₂, Taq DNA polimeraz (5U), 10X Taq Buffer (100 mM (Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl) 100mM deoksinükleotid trifosfat (dNTP) set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Fermentas®) kullanıldı.

2. 1. 3. 3. Primerler

Stafilokokal enterotoksin genlerinin tespiti için araştırmamızda kullanılan primerler Çizelge 2. 1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2. 1. Stafilokokal enterotoksin genlerinin tespiti için kullanılan primerler, dizileri, amplikon büyüklükleri (Mork ve ark. 2010)

Gene	Primer	Sequence 5'–3'	Bant genişliği
sek	sek fwd	TTA GGT GTC TCT AAT AGT GCC AGC	278 bp
	sek rev	AGC TGT GAC TCC GCC ATA TAT GTA	
sel	SEL-F158	CAC CAG AAT CAC ACC GCT TA	240 bp
	SEL-R397	CTG TTT GAT GCT TGC CAT TG	
sem	mpSEM-1	CTA TTA ATC TTT GGG TTA ATG GAG AAC	300 bp
	mpSEM-2	TTC AGT TTC GAC AGT TTT GTT GTC AT	
sen	sen fwd	GCT TAT GAG ATT GTT CTA CAT AGC TGC	448 bp
	sen rev	CAT TAA CGC CTA TAA CTT TCT CTT CAT C	
seo	seo fwd	AAG AAG TCA AGT GTA GAC CCT ATT GCT	201 bp
	seo rev	AAT CGC TGA TGA GCT AAA TTC CAC	
sep	sep fwd	ATT TAC AAA AAA AGT CTG AAT TGC AGG	201 bp
	sep rev	TGG CGG TGT CTT TTG AAC C	
seq	seq fwd	TGG AAA ATA CAC TTT ATA TTC ACA GTT TCA	201 bp
	seq rev	TTT TGC TTA CCA TTG ACC CAG AG	
ser	ser fwd	CGG TTA GAT GTG TTT GGA ATA CCC	201 bp
	ser rev	ATT TGT ACT AAT TGT AAA AGA GAA CTG TTG TTT	
seu	seu fwd	AAA ATA TGG AGT TGT TGG AAT GAA GTT	201 bp
	seu rev	TTC TCT TGG GCT TTA ATG TTT GTT T	

2. 1. 4. Elektroforez Cihazı

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

2.1. 4. 1. Agarose Jel Hazırlanışı

Agarose (Prona)	2 g
TAE (0,5x)	100 ml

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

2. 1. 4. 2. Marker

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

2. 1. 4. 3. Etidyum Bromür

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

2. 1. 4. 4. Standart Suşlar

Tüm testlerde kalite kontrol suşları olan *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 kontrol olarak kullanıldı.

2. 2. Yöntem

2. 2. 1. Örneklerin alınması

2. 2. 1. 1. Sütler: Her süt örneği alınırken, meme başları su ve sünger yardımı ile temizlenip kurulandı ve % 70'lik alkol ile silindi. Eller sabunla yıkandıktan sonra eldiven giyilip meme başındaki saprofit bakterileri uzaklaştırmak için ilk birkaç ml süt atıldı. Steril enjektörler içine 5 ml miktarda alındı.

2. 2. 1. 2. Burun svap: Sürüntüler her iki taraf burun konkasının 1/3'lük ön kısmından serum fizyolojikle ıslatılmış steril pamuk eküvyonlarla sağa ve sola birkaç kez çevirmek suretiyle alınarak Stuart Transport Medium'a konuldu.

2. 2. 1. 3. Deri svap: Sürüntüler gluteal bölgeden serum fizyolojikle ıslatılmış steril pamuk eküvyonlarla sağa ve sola birkaç kez çevirmek suretiyle alınarak Stuart Transport Medium'a konuldu.

2. 2. 1. 4. Vajina svap: Sürüntüler her vajinal mukozanın orta 1/3'lük kısmından serum fizyolojikle ıslatılmış steril pamuk eküvyonlarla sağa ve sola birkaç kez çevirmek suretiyle alınarak Stuart Transport Medium'a konuldu.

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

2. 2. 2. *S. aureus* izolasyonu

Laboratuvara getirilen örneklerden stafilocokların saf olarak elde edilmesi amaçlandı. Bunun için, burun, deri ve vajina sıvap örnekleri önce % 7,5 tuzlu TSB'a ekilip, 37°C'de 24 saat inkube edildi, buradan MSA'a geçildi. Süt örnekleri ise doğrudan MSA'a ekildi. MSA'da 24-48 saatlik inkübasyon sonunda üreyen stafilocok suşları, fenotipik özelliklerinin incelenebilmesi için kanlı agara pasajlandı. Stafilocok suşlarının morfolojik ve biyokimyasal özellikleri standart laboratuvar işlemleri uygulanarak gerçekleştirildi (Murray ve Patrick 2003).

2. 2. 2. 1. Fenotipik İdentifikasyon

İzolatların fenotipik identifikasyonlarında kullanılan katalaz, basitrasın duyarlılık, tüp koagulaz testleri aşağıdaki anlatıldığı şekilde yapılarak gerçekleştirildi.

2. 2. 2. 1. 1. Katalaz Testi: Bu test için besiyerinde üreyen kolonilerden steril öze ile alınıp temiz bir lam üzerine aktarıldıktan sonra üzerine 1–2 damla % 3'lük hidrojen peroksit damlatıldı. Katalaz enzimi oluşturan bakteriler hidrojen peroksiti su ve oksijene

ayrıştırdığı için ortamdaki oksijen çıkışı kabarcık oluşumu ile belirlendi. Bu nedenle test sonucu kabarcıklar meydana geldiğinde katalaz pozitif, kabarcıklar oluşmadığında ise katalaz negatif olarak değerlendirildi. *Streptococcus* spp. katalaz negatif, *Micrococcaceae* familyasındaki *Micrococcus* spp. ve *Staphylococcus* spp. ise pozitifdir (Murray ve Patrick 2003).

2. 2. 2. 1. 2. Basitrasin Duyarlılık Testi: Katalaz pozitif mikroskopik olarak Gram pozitif kok görünümündeki mikroorganizmalar *Micrococcaceae* grubunda kabul edildi. Bu suşlardan tek bir koloni TSB'da üretildikten sonra MHA'a ekim yapılmış ve ekim bölgesinin üzerine basitrasin diski yerleştirildi. 37°C'de 18–24 saat inkübe edildikten sonra basitrasine dirençli suşlar *Staphylococcus* spp. olarak ayrıldı (Koneman ve ark 1997).

2. 2. 2. 1. 3. Koagulaz Testi: Çalışmada, kullanılan bakterilerin koagulaz testleri tüpte gerçekleştirildi. Bunun için incelenecek koloni, içerisinde 0,8 ml serum fizyolojik ve 0,2 ml EDTA'lı tavşan plazması (Bactident Coagulase, 1.13306.0001 Merck) bulunan bir tüpe ekildi. 37°C'deki benmaride bırakılarak 1, 2, 4, 8 ve 24. saatlerde pıhtının oluşması gözlemlendi. Koagulaz enzimine sahip türlerin kan plazmasını koagüle etmesi sonucunda test tüpünde katılaşma meydana gelirse, test sonucu pozitif, katılaşma meydana gelmiyorsa negatif olarak değerlendirildi. Elde edilen tüm koagulaz pozitif suşlar daha sonra kullanılmak üzere, % 20 gliserinli BHIB içerisinde -80°C'de saklandı.

2. 2. 2. 1. 4. Mannitol Fermentasyonu: Katalaz ve koagulaz testi pozitif olan suşlar bakterilerin mannitol salt agara ekimleri yapıldı. 37 ° C'de 24 saatlik inkubasyondan sonra izole edilen *S. aureus* kolonileri, çevresinde mannitolden asit oluşumunu gösteren sarı bir zon varlığı ile saptandı.

2. 2. 2. 1. 5. Glukoz Fermentasyonu: Yarıkatı glukoz besiyerine *S. aureus* kolonilerinden ekimler yapıldı. 37 ° C'de 24 saatlik inkubasyondan sonra besiyerinin sarı renge dönüşmesi ile *S. aureus* identifikasyonu doğrulandı.

2. 2. 2. 1. 6. DNase Testi: DNA'lı besiyerine *S. aureus* kültüründen çizgi ekimi yapıp 35°C'de 24 saat bekletildi, daha sonra agar yüzeyine 1 N HCl damlatıldı. Ekim çizgisinin çevresinde saydam bir zon oluşması ile *S. aureus* identifikasyonu doğrulandı.

2. 2. 2. 2. Genotipik İdentifikasyon

Fenotipik olarak *S. aureus* olduğu belirlenen tüm izolatların genotipik identifikasyonları *stafilokokal enterotoksin* genleri varlığının spesifik primerler kullanılarak PCR ile incelenmesi sonucunda yapıldı. PCR için öncelikle izolatlardan kromozomal DNA ekstraksiyonu yapıldı.

DNA Ekstraksiyonu

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

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

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

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

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

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

2. 2. 2. 2. 1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu PCR

Genotipik olarak *S. aureus* olduğu belirlenen tüm suşlarda enterotoksin genlerinin varlığı incelendi.

Tüm PCR reaksiyonlarında bir örnek için PCR amplifikasyonu 50 µl toplam hacimde, son konsantrasyon 10X Taq enzimi tampon çözeltisi 1X, magnesium klorür (MgCl₂) 4 mM, dNTP 0,2 mM, primer (her biri için) 0,4 pmol, Taq DNA polymerase 1,5 U, Template DNA (her bir örnek için) 300 nM olacak şekilde gerçekleştirildi. Kullanılan malzemeler ve volümleri Çizelge 2. 2.’de belirtilmiştir.

Çizelge 2. 2. Mastermiksin hazırlanma oranları

Malzeme (Ticari)	İstenen Son Konsantrasyon	1 örnek (µl)
Tag Buffer (10X)	1 X	5
MgCl ₂ (25mM)	4 mM	8
dNTP (10mM)	0,2 mM	2
Primer - F (100 pmol)*	0,4 pmol	1,35
Primer - R (100 pmol)*	0,4 pmol	1,35
Taq Polimeraz (5U)	1.5 U	0,4
ddH ₂ O	Son Volüme Tamamlanır	26,9
Template DNA	300 nM	5
TOPLAM		50

* Her bir forward ve reverse primer çifti için

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

Çizelge 2. 3. Multipleks PCR işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Başlangıç Denatürasyon	1	95°C	10 dk
Denatürasyon	35	95°C	20 sn
Bağlanma		55°C	20 sn
Uzama		72°C	20 sn
Son Uzama	1	72°C	10 dk
Bekletme	1	4°C	∞ dk

2. 2. 2. 2. 2. Amplikonların elektroforez tankına yüklenmesi

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

2. 2. 2. 2. 3. Amplikonların elektroforez tankında yürütülmesi

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

2. 2. 2. 2. 4. Görüntüleme ve Değerlendirme

Süre sonunda yürütülen jel, bilgisayara bağlı durumdaki transilluminatör cihazındaki (UVP Bioimaging System, EC3 Chemi HR410, Almanya) odacığa yerleştirilerek, UV ışığı altında fotoğraflanıp, değerlendirildi.

Değerlendirmede *sek* primerleri için 278 bp, *sel* primerleri için 240 bp, *sem* primerleri için 300 bp, *sen* primerleri için 448 bp, *seo* primerleri için 201 bp, *sep* primerleri için 201 bp, *seq* primerleri için 201 bp, *ser* primerleri için 201 bp, *seu* primerleri için 201 bp uzunluğunda bant arandı (Mørk ve ark 2010).

3. BULGULAR

Bu çalışmada 2010 yılı yaz aylarında Aydın ili ve çevresinde bulunan laktasyon döneminde olan 50 adet kıl keçisi ve 50 adet Saanen keçisinin her birinden süt, deri vaginal mukoza, ve burun mukozasından olmak üzere 400 adet örnekleme yapılarak Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda *S. aureus* yönünden incelendi. İzole edilen etkenlerin tür düzeyinde identifikasyonları fenotipik ve moleküler özellikleri incelenerek gerçekleştirildi.

3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

İncelenen 400 örneğin toplam 48'inde (% 12) *S. aureus* izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Saanen ve kıl keçisi ırkları olmak üzere 100 adet hayvandan elde edilen süt kökenli *S. aureus* izolatlarının 8 (% 16,0)'i Saanen ırkı keçilerden, 19 (% 38,0)'u adedi ise kıl keçilerinden izole edilmiştir. Deri izolatlarının ise 3 (% 6,0)'ü Saanen ırkı keçilerden, 4 (% 8,0)'ü ise kıl keçilerinden izole edilmiştir. Burun izolatlarının ise 1 (% 2,0)'i Saanen ırkı keçilerden, 6 (% 12,0)'sı kıl keçilerinden izole edilmiştir. Vajina izolatlarının ise 2 (% 4,0)'si Saanen ırkı keçilerden, 5 (% 10,0)'i kıl keçilerinden izole edilmiştir. Süt, burun, deri ve vajina kökenli *S. aureus* suşların kıl keçilerinden daha fazla izole ve identifiye edildiği saptanmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. İzole ve identifiye edilen *S. aureus* suşlarının dağılımı

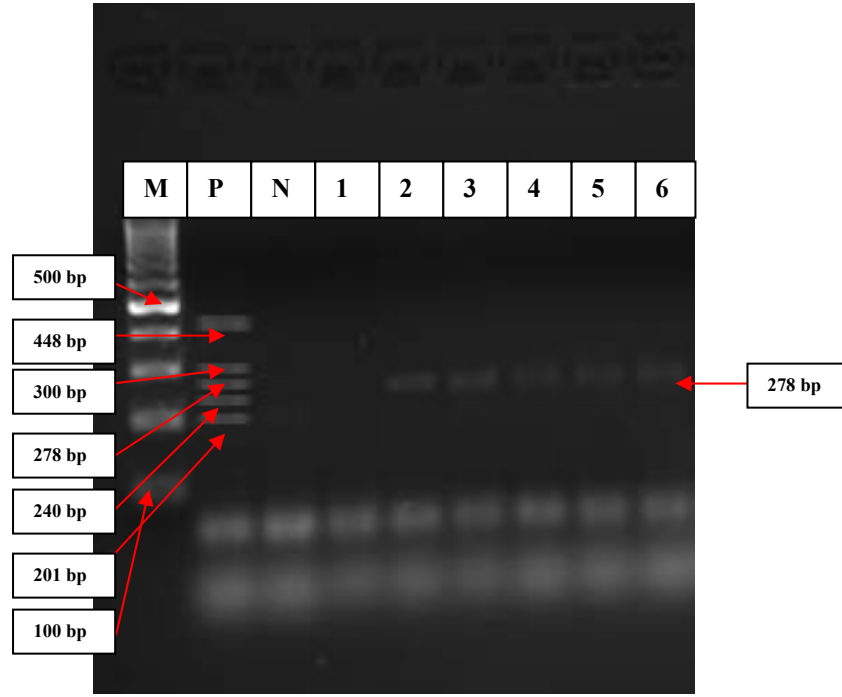
Örnekleme yapılan yer	Örnekleme sayıları		İzole ve identifiye edilen <i>S. aureus</i> sayısı		İzolasyon yüzdesi (%)	
	Saanen	Kıl	Saanen	Kıl	Saanen	Kıl
Süt	50	50	8	19	16,0	38,0
Deri	50	50	3	4	6,0	8,0
Burun	50	50	1	6	2,0	12,0
Vajina	50	50	2	5	4,0	10,0
Toplam	200	200	14	34	7,0	17,0
Genel Toplam	400		48		12,0	

3.2. PCR Bulguları

Polimeraz zincir reaksiyonu ile aynı örnekler incelendiğinde toplam 48 adet izolatın 13'ünde (% 27.0) yaklaşık 278 bp fragment aralığında *sek* stafilokokal enterotoksin geni tespit edilmiştir (Resim 3.1). Saptanan enterotoksin genlerinden 10 (% 66,7) adedi süt izolatlarından, 2 (% 22,2) adedi burun izolatlarından, 1 (% 11,1) adedi ise deri izolatlarından saptanmıştır. Saptanan genlerin, 8 (% 42.1)'i kıl keçilerinin süt kaynaklı *S. aureus* izolatından, 2 (% 25)'i Saanen keçilerinin süt kaynaklı *S. aureus* izolatından, 1 (% 5,2)'i kıl keçilerinin deri kaynaklı *S. aureus* izolatından, 2 (% 10,5)'i adet kıl keçilerinin burun kaynaklı *S. aureus* izolatından elde edilmiştir (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.2. Saptanan enterotoksin genlerinin dağılımı

<i>S. aureus</i> izole edilen örnekleme yeri	İzolasyon sayıları		Enterotoksin geni saptanan PCR pozitif suş sayısı		İzolasyon yüzdesi (%)	
	Saenen	Kıl	Saenen	Kıl	Saenen	Kıl
Süt	8	19	2	8	25,0	42,1
Deri	3	4	-	1	-	5,2
Burun	1	6	-	2	-	10,5
Vajina	2	5	-	-	-	-
TOPLAM	48		13		27,0	



Resim 3.1. Keçi kökenli *S. aureus* izolatlarında SE enterotoksin geni varlığı - M: 100 bp işaretleyici; P: *S. aureus* ATCC 25923 pozitif kontrol; N: Negatif kontrol; 1: Negatif örnek; 2-6: SE enterotoksin geni pozitif örnekler

4. TARTIŞMA

Staphylococcus aureus izolatlarının en önemli habitatı hayvanlarda deridir. Ayrıca hayvanlarda mastitis, artritis, otitis, epidermitis ve üriner sistem enfeksiyonları gibi enfeksiyonlara neden olur.

S. aureus'un çok sayıda suşu vardır. Epidemiyolojik araştırmalarla etkenlerin alt tiplendirmeleri yapılmakta ve bir patojenin doğadaki yayılma yolları ve kaynakları tam olarak belirlenerek etkili kontrol ve eradikasyon stratejileri geliştirilebilmektedir (Derbentli 1996). Tiplendirme, mikroorganizmaların karakteristik özelliklerini tespit etmeye dayanan fenotipik metotlar ile mikroorganizmaların kromozomal ve ektrakromozomal genetik elementlerinin analizine dayanan genotipik metotlarla yapılmaktadır. Fenotipik metotlar, biyotiplendirme, antimikrobiyal direnç testleri, serotiplendirme, faj tipi ya da bakteriyosin tipi, elektroforetik protein tiplendirme olarak sıralanabilir (Arbeit 1999).

Genotipik tiplendirme metotları, plazmid profil analizleri, kromozomal DNA'nın restriksiyon endonükleaz analizi, Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RFLP-PCR), Polimorfik DNA'nın Rasgele Amplifikasyonu (RAPD-PCR) ve Stimule Alan Jel Elektroforezi (PFGE) olarak sıralanabilir. Bu tekniklerin her birinin ayırım gücü, tekrarlanabilirlik ve tiplendirilebilirliklerine göre avantajları ve dezavantajları vardır (Aslantaş ve ark. 2006).

Günümüzde süt ürünlerindeki *S. aureus* türlerini tanımlamada standart bir metod koagülaz testidir. Fakat alınan örneklerden güvenilir sonuçlar alınması için gece boyu inkübe edilmesi gerekli ve bu sonuçları gösterebilmek içinde büyük bir sorun olarak geniş tanı ekipmanlarının bulunması gerekmektedir (Stephan ve ark., 2001). Ayrıca, stafilokoklardan kaynaklı gıda zehirlenmelerinde en iyi tanımlama *S. aureus* SE genlerini gıda materyallerinde göstermektir. Bu durumda yani SEs profilinin (geninin) hızlı bir şekilde belirlenmesi araştırılan şüphelenilmiş gıda ürünlerinde, sonucu belirleyen çok önemli bir adımdır (Cremonesi ve ark., 2005).

Bu çalışmada, Aydın ili çevresinde bulunan laktasyon döneminde olan 100 adet keçinin her birinden süt, deri, vaginal mukoza, burun mukozasından toplam 400 adet

örnekleme yapılmıştır. Örneklerin % 12 sinin *S. aureus* pozitif olduğu tespit edildi. Daha önceki çalışmalarda da keçilerde % 3 ün altında bir oranda *S. aureus* türlerinin izole edildiği bildirilmiştir (Menzie ve Ramanoon, 2001).

Meme dokusundan başka *S. aureus* türlerinin çok sıklıkla kolonize olduğu bir diğer bir vücut organı da burundur. Burundan alınan swapların yetişkin keçi örneklerinde hemen hemen % 70 ve oğlakların hemen hemen % 61'inde *S. aureus* pozitif olduğu tespit edilmiştir. Bu bilgiler gösteriyor ki burun *S. aureus* türlerinin keçi ve oğlakların doğum süresince veya sonrasında kolonize olabileceği çok önemli bir vücut bölümüdür. Daha önceki çalışmalar göstermektedir ki sütçü koyunların burun boşluklarında bulunma oranı % 30 (Vautor ve ark.,2005) ve sütçü keçilerin de % 6 (Valle ve ark., 1991), sütçü düvelerin de % 9'unda ağız ve burun bölgesinde (burun) *S. aureus*'ların kolonize olduğu belirlenmiştir. (Roberson ve ark., 1994). Diğer taraftan, Norveç (Jorgensen ve ark., 2005) ve İngiltere'de (Smyth ve ark., 2005) yapılan iki çalışmada sütçü ineklerin burun swaplarında *S. aureus* bulunamamıştır fakat bu iki sürüde de yüksek oranda *S. aureus* IMI olduğu tespit edilmiştir.

Doğum yapan ineklerin vajinadaki *S. aureus* kolonizasyonu oranı (% 45) doğum yapmadan önceki durumunun oranlarıyla (% 19) kıyaslandığında daha yüksek olduğu görüldü. Bu durumda doğumdan önce uterusun involü olmasıyla ve sekresyonların daha az olmasından dolayı daha az bir kolonizasyon meydana geldiği şeklinde açıklanabilir. Muhtemeldir ki, vajinadaki mukoz membran ve vajinal sekresyonlarda bulunan *S. aureus*'lar keçilerden oğlaklara bulaşmada katkı sağlamaktadır. Bu çalışmada örneklenen yavrular doğumlarından sonra annelerinden hızlı bir şekilde (hemen) uzaklaştırıldılar ve bir kere de kolostrum verildi. Emme ve ağız-burunlarını yalama sırasında *S. aureus*'lar taşınması durumundan dolayı bu durum çok muhtemel yani olası bir durum değildir (Mork ve ark., 2005).

Günümüzde keçilerde *S. aureus* enfeksiyonları ile ilgili çalışmalar genellikle keçi mastitisleri ile ilgili olarak çalışılmıştır. Keçi mastitisleri keçi yetiştiriciliğinin en önemli sorunlarında biridir (Bergonier ve ark., 2003).

Stafilokoklar içinde en patojen tür olan *S. aureus*, diğer evcil memelilerde olduğu gibi keçilerde de akut, subakut, kronik ve gangrenöz mastitislere neden olmaktadır. Diğer yandan bu etkenin meme içi antibiyotik uygulamalarına slime faktör, biyofilm oluşturma

ve intrasellüler özelliği nedeniyle sıklıkla direnç gösterdiği ve böylece sütle atılarak, sürüdeki diğer hayvanlar için önemli risk oluşturduğu bildirilmektedir. *S. aureus*'un mastitisli keçi sütlerindeki izolasyon oranı ortalama % 4.1-14.7 arasında değişmektedir. Bu çalışmada, kültür pozitif örneklerin % 15.9'undan *S. aureus*'un izole edilmiş olması diğer çalışmalarla benzerlik göstermekte olup bu veriler, *S. aureus*'un keçi mastitislerindeki önemini göstermektedir (İlhan ve ark., 2011). Yaptığımız çalışma göztermiştir ki patojen *S. aureus*'ların sadece mastitisli hayvanlardan değil sağlıklı hayvanlardan da izole edilebileceğini göstermiştir.

İnsan ve gıda örneklerinden izole ettikleri *S. aureus* izolatlarının A, B, C, D enterotoksinlerinden hangi toksinleri üretilip üretmediklerini SET-RPLA ve PCR yöntemleriyle belirleyerek sonuçları karşılaştırmışlardır. SET-RPLA testi ile elde ettikleri sonuçlara göre izolatların % 44'ünün sadece SEC enterotoksinini, % 32'sinin sadece SEA enterotoksinini, % 16'sının SED-J enterotoksinini ürettiklerini geri kalan izolatların ise birden fazla enterotoksini birlikte ürettiklerini belirlemişlerdir. SEC enterotoksininin taşıyıcı kişilerle gıdalara taşındıklarını savunmuşlardır (Fueyo ve ark., 2001).

Mork ve arkadaşları (2010), süt keçilerinde *S. aureus* incelenmesi amacıyla bakteriyolojik analiz için 7 farklı sürüden örnek toplamışlardır. Bu örneklerden 5671 süt örneğinin 353'ünde 535 meme başı derisi svabının 53'ünde 569 nasal svabın 392'sinde 569 vajinal svabın 180'ninde *S. aureus* rastlanmıştır. Alınan *S. aureus* izolatları PFGE yöntemiyle karşılaştırılmıştır ve seçilen izolatlar mPCR metodu ile enterotoksin varlığı araştırılmıştır. Bu test sonucunda 110 örnekte *S. aureus* enterotoksin geni bulunmuştur. Bu örneklerden çoğunlukla *sec*, *sell* ve *tst* genleri tespit edilmiştir. Çalışmamızda saanen ve kıl keçilerinden *S. aureus* incelenmesi amacıyla bakteriyolojik analiz için 2 farklı sürüden örnek toplamışlardır. Bu örneklerden 100 süt örneğinin 27'sinde, 100 deri örneğinin 7'sinde, 100 burun svabı örneğinin 7'sinde, 100 vajinal svabın 7'sinde *S. aureus*'a rastlanmıştır. Seçilen örnekler mPCR metodu ile enterotoksin varlığı araştırılmıştır. Bu test sonucunda 13 örnekte *sec* geni tespit edilmiştir. Elde edilen izolatların enterotoksin geni içerdiği ve izolatların patojenitesinin yüksek olduğu belirlenmiştir.

Brezilyada yapılan bir çalışmada enterotoksin kodlamakla görevli genlerin dağılımını belirlemek amacıyla 36 tane keçi mastitisli 64 tane sığır mastitisli hayvandan *S. aureus* konvensiyonel metodlar ile izole edilmiş ve mPCR ile analizi yapılmıştır. Çalışılan

tüm türlerden 37 (% 37) sinin bazı SEs genine sahip olduğu tespit edilmiştir (Silva ve ark., 2005).

Scherrer ve arkadaşları (2004), İsviçrede yaptıkları bir çalışmada 127 keçi ve koyun sütü toplama tankından 293 adet *S. aureus* izolatu elde etmişlerdir. Bu izolatların 123 tanesinde SEC geni, 31 SEG geni, 28 SEA geni, 26 SEJ geni, 24 SEI geni, 4 SEB geni ve 4 SED geni tespit edilmiştir (Scherrer ve ark. 2004). Bu durumun insan sağlığı için ciddi bir tehlike arz ettiği ortaya konulmuştur.

Cremonesi'nin (2005) İtalyada yaptığı bir çalışmada multipleks PCR yöntemi, *S. aureus* 23S rRNA, koagulaz enzimi ve termonükleazlarla birlikte enterotoksinlerden olan *sea*, *sec*, *sed*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sel* genlerini eş zamanlı tespit etmek için geliştirildi. Bu metod süt ve mandıra ürünlerinde bulunan ve izole edilen 93 enterotoksijenik tip *S. aureus* türün tespiti için kullanıldı. Bilgiler mPCR ile toplanmıştır ve sonuçlar immunoassay metodla elde edilen sonuçlarla karşılaştırılabilmektedir. Bunlara ek olarak, mPCR bazı SE genleri de ayrıca çoğalttı ve bu toksinler immunoserolojik yöntemlerle ile tespit edilemeyeceği kanısına varıldı. Multipleks çoğaltma işlemiyle başlangıç olarak 1 pg DNA ile elde edilebileceği ve bu durumda testin mükemmel bir özellikte ve yüksek hassasiyetli bir test olduğunu gösterdi.

Sığır (n = 220) ve süt keçilerden alınan (n = 213) çiğ süt ürünleri (n = 82) örnekleri *S. aureus* yönünden analiz edilmiştir. İzolatlar passive latex agglutination ile stafilokoksal enterotoksin (SE) üretimi (SEA-SED) test edilmiş ve SE genleri de (*sea-see*, *seg-sej*) çoklu PCR ile test edilmiştir. *S. aureus*, sığır sütü toplulukları örneklerinin 165 (% 75) inde, keçi sütü toplulukları örneklerinin 205 (% 96.2) inde ve çiğ süt ürünlerinin örneklerinin 31 (% 37.8) inde rastlanmıştır. Enterotoksin üretimi (ya da çoğaltımı) *S. aureus* izolatlarının % 22,1 lik sığır ve % 57.3 lük keçi sütü toplulukları içinde gözlenirken, sırasıyla, % 52.5 lik izolat sığır sütü kütlelerinde, % 55.8 izolat keçi sütü kütlelerinde de SE geni bulunduğu gözlemlenmiştir. SEC ve *sec* en çok tesbit edilen olmuştur. Sığır-keçi izolatlarında SE genlerinin üstel çeşitliliği gözlemlenmiştir (Jorgensen ve ark., 2005).

Marketlerde satılan keçi teleme peynirlerinin kalite kontrolu sırasında 14 örnekte *S. aureus* pozitif bulunmuştur. Bulunan bu örneklerden 64 tane *S. aureus* izole edilmiştir. Bu çalışmada Stafilokokal enterotoksin genlerini tespit etmek için Real-time PCR, toksinleri

tespit etmek için enzim immunoassay (EIA) yöntemleri kullanılmıştır. Bu testler sonucunda 1 örnekte SEA toksini bulunmuştur. RT-PCR metodu ile 4 teleme örneğinden elde edilen 14 izolatta *seg*, *sei*, *selm*, *seln*, ve *selo* genleri tespit edilmiştir (Akineden ve ark. 2008). Çalışmamızda da, süt örneklerinden izole edilen *S. aureus* etkenlerinin bölgemizdeki keçilerden üretilen süt ve süt ürünlerinde insan sağlığı açısından tehlike oluşturabileceği kanısına varılmıştır.

2001 yılında Omoe ve arkadaşlarının Japonya’da yaptığı bir çalışmada *S. aureus*’dan elde edilen stafilokokal enterotoksin a ve 1 genlerinin yayılımı incelenmiştir. Bu çalışma için insanlardan da alınan 146 isolat kullanıldı. Bu isolatlar gıda zehirlenmeleri sağlıklı insanlar mastitisli inekler ve sığır çiğ sütlerinden elde edilerek multipleks PCR ile analiz edildi. 113 tane *S. aureus* izolatında bir veya birçok enterotoksin geni pozitif olarak bulunmuştur. Bu enterotoksin genleri 14 genotipte sınıflandırılmıştır. *Seg* ve *sei* genleri *S. aureus* türlerinde bir arada bulunmuşlardır. Yeni geliştirilen sandviç ELISA yöntemi göstermektedir ki *seh* genlerini barındıran *S. aureus* izolatlarında önemli, miktarda SEH üretimi olabilmektedir. Bununla birlikte birçok *S.aureus*’un *seg* genini kapsayan ve *sei* genini kapsayan izolatların % 60’ında SEG ve SEI toksinlerinin üretimi tespit edilememiştir. Ancak *seg* ve *sei* genini barındıran *S. aureus* izolatlarından reverztranskriptaz PCR ile SEG ve SEI toksinlerinin üretiminde görevli olan mRNA’lar kopyalanarak varlığı kanıtlanmıştır.

Bugüne kadar, SEG, SEH, SEI veya SEJ için ticari bir test üretilmemiştir. İlgili geni taşıyan *S. aureus* izolatları potansiyel SE üreticileri olarak göz önüne alınmalıdır. Mevcut sonuçlar, hem sığır hem de keçi sütü topluluklarının % 50-60 arasında alınan izolatların potansiyel SE üreticileri olabileceğini işaret eder. Ne var ki, SE genlerinin yaygınlığı bu çalışmada küçümsenmiş olabilir, ancak bazı SE genlerinin (*sec-ser* ve *seu*) varlığı daha önce test edilmemiştir. Şimdilik, Türkiye’de bulunan keçilerden izole edilen çoğu *S. aureus*’ların çoğu potansiyel olarak SE üreticisi olduğunu düşünülmektedir. Bu durum insan sağlığını ciddi şekilde tehdit etmektedir. Çalışmamızda ülkemizde daha önce tespit edilmemiş bu genlerin keçi metaryellerinde tespitini yapılmıştır.

Önceleri spesifik enterotoksin genlerinin tespiti için oligonükleotid primerlerle her bir örnek için sonucun doğru olabilmesi açısından en az iki mPCR reaksiyonun kurulmasına gereksinim duyuluyordu (Cremonesi ve ark., 2005). Süt ürünlerinde var olan

S. aureus ve bu bakteriye ait 8 enterotoksinin eş zamanlı olarak tespit edebilen kolay ve hızlı bir metod olan multiplex PCR tekniği bu çalışmada kullanıldı, bu metodla *seg*, *seh*, *sei*, *sej* ve *sel* genleride tespit edilmeye çalışıldı. Ancak, *seg*, *sei*, *seh*, *sej* ya da *sel* toksinlerinin hayvanlarda ve insanlarda zehirlenme meydana getirmesi için gıda maddesinde *S. aureus*'un ne kadar miktarlarda bu toksinleri üretmelisi gerektiği tam bilinmemektedir. Daha önceki çalışmalarda, *sel* geninin varlığının tespiti daha önceleri PCR tekniği uygulanarak rapor edilmemiştir, bunun nedeni de büyük bir ihtimalle bu genin son zamanlarda tanımlanması ve sekanslanması olarak düşünülmektedir.

Çalışmamızda 400 örnekten 48'inde *S. aureus* izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu 48 izolat saanen keçisinin süt örneğinden 8, deri svabından 3, burun svabından 1 ve vajina svabından 2 adet, kıl keçisinin süt örneğinden 19, deri svabından 4, burun svabından 6 ve vajinal svabdan 5 adet izole edilmiştir. Bu isolatlar mPCR metodu ile analizleri yapılmıştır. Bu analiz sonucunda; Saanen keçilerinin süt örneklerinden 2, kıl keçilerinin süt örneklerinden 8, deri svabından 1 ve burun svabından 2 örnekte enterotoksin geni saptanmıştır. Bunun sonucunda *sek* enterotoksin geni tespit edilmiştir. Bu gen varlığı açısından elde ettiğimiz sonuçlar bölgesel sonuçlardır. Kıl keçilerinin daha çok ekstansif yetiştiriciliğinin yapılmasından dolayı ortam kontaminantı da olabilen *S. aureus* ile daha fazla temas halinde olduğu için dağılımının Saanen ırkı keçilerden daha yüksek bulunduğu ortaya konulmuştur. Bu nedenden dolayı, yetiştiriciliği yapılan kıl keçileri sürülerinde bakım-besleme ve hijyen koşullarına daha fazla önem verilmesi gerektiği ortaya çıkmıştır. Ayrıca, Stafilokokal enterotoksin genlerinin hızlı ve duyarlı bir şekilde moleküler yöntemlerle ortaya konulabildiği görülmüştür.

5. SONUÇ

Keçilerden alınan materyallerde *S. aureus* izolasyonu, identifikasyonu ve moleküler tiplendirmesi amacıyla yapılan bu tez çalışmasında aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır. İncelenen örneklerin % 12'sinde *S. aureus* izole edilmiştir.

Bu çalışmada konvensiyonel metodlarla incelenen 400 örnekten 48'inde (% 12) *S. aureus* izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Polimeraz Zincir Reaksiyonu örnekler incelendiğinde 48 örnekten 13'ünde (% 27,0) stafilokokal enterotoksin geni tespit edilmiştir. Bu toksinlerin elde edildiği örneklerin 10'u süt 2'si burun 1'i deriden alınmıştır. Elde edilen sonuçlara göre sağlıklı keçilerden alınan vücut örneklerinden elde edilen *S. aureus*'ların patojen olabileceği ve bu patojenitenin belirlenmesinde moleküler yöntemlerin oldukça yararlı olduğu ortaya konulmuştur.

ÖZET

Bu çalışmada 2010 yılı yaz aylarında Aydın ili ve çevresinde bulunan laktasyon döneminde olan 50 adet kıl keçisi ve 50 adet saanen keçisinin her birinden süt, deri vaginal mukoza, ve burun mukozasından olmak üzere 400 adet örnekleme yapılarak Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’da *Staphylococcus aureus* yönünden incelenmiştir. Çalışmamızda incelenen 400 örneğin toplam 48’inde (% 12) *S. aureus* izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen süt kökenli *S. aureus* izolatlarının 8 (% 16,0)’i Saanen ırkı keçilerden, 19 (% 38,0)’u adedi ise kıl keçilerinden izole edilmiştir. Deri izolatlarının ise 3 (% 6,0)’ü Saanen ırkı keçilerden, 4 (% 8,0)’ü ise kıl keçilerinden izole edilmiştir. Burun izolatlarının ise 1 (% 2,0)’i Saanen ırkı keçilerden, 6 (% 12,0)’sı kıl keçilerinden izole edilmiştir. Vajina izolatlarının ise 2 (% 4,0)’si Saanen ırkı keçilerden, 5 (% 10,0)’i kıl keçilerinden izole edilmiştir. Süt, burun, deri ve vajina kökenli *S. aureus* suşların kıl keçilerinden daha fazla izole ve identifiye edildiği saptanmıştır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile aynı örnekler incelendiğinde toplam 48 adet izolatın 13’ünde (% 27,0) yaklaşık 278 bp fragment aralığında *sek* stafilokokal enterotoksin geni tespit edilmiştir. Saptanan enterotoksin genlerinden 10 (% 66,7) adedi süt izolatlarından, 2 (% 22,2) adedi burun izolatlarından, 1 (% 11,1) adedi ise deri izolatlarından saptanmıştır. Saptanan genlerin, 8 (% 42,1)’i kıl keçilerinin süt kaynaklı *S. aureus* izolatından, 2 (% 25,0)’i Saanen keçilerinin süt kaynaklı *S. aureus* izolatından, 1 (% 5,2)’i kıl keçilerinin deri kaynaklı *S. aureus* izolatından, 2 (% 10,5)’i adet kıl keçilerinin burun kaynaklı *S. aureus* izolatından elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Staphylococcus aureus*, keçi, süt, PCR, enterotoksin geni

SUMMARY

In this study, a total of 400 sampling was made from 50 hair goat and 50 Saanen goat in lactation period from Aydin Province region in summer time of year 2010, then samples were brought to Adnan Menderes University Faculty of Veterinary Medicine Department of Microbiology. A total of 48 (12,0 %) *Staphylococcus aureus* isolates were obtained out of 400 samples.

8 (16,0 %) of the milk-borne *S. aureus* isolates were obtained from Saanen goats, 19 (38,0 %) of the milk-borne *S. aureus* isolates were obtained from hair goats. 3 (6,0 %) of the skin-borne *S. aureus* isolates were obtained from Saanen goats, 4 (8,0 %) of the skin-borne *S. aureus* isolates were obtained from hair goats. 1 (2,0 %) of the nasal-borne *S. aureus* isolates were obtained from Saanen goats, 6 (12,0 %) of the nasal-borne *S. aureus* isolates were obtained from hair goats. 2 (4,0 %) of the vaginal-borne *S. aureus* isolates were obtained from Saanen goats, 5 (10,0 %) of the vaginal-borne *S. aureus* isolates were obtained from hair goats. Milk, nasal, skin, and vagina borne *S. aureus* isolates were detected higher from hair goats.

As the same samples were detected by polymerase chain reaction, out of 48 isolates, sek staphylococcal enterotoxin gene was detected between 278 bp fragment from 13 (27,0 %) samples. Detected enterotoxin genes were obtained from milk isolates in the number of 10 (66,7 %), 2 (22) of the genes were obtained from nasal isolates, 1 (11,1 %) of the genes were obtained from skin isolates. 8 (42,1 %) of the genes were detected from milk-borne *S. aureus* isolates in hair goats, 2 (25,0 %) of the genes were detected from milk-borne *S. aureus* isolates in Saanen goats, 1 (5,2 %) of the genes were detected from skin-borne *S. aureus* isolates in hair goats, 2 (10,5 %) of the genes were detected from nasal-borne *S. aureus* isolates in hair goats.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, goat, milk, PCR, enterotoxin gene

KAYNAKLAR

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

Akan M. Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar) sf:6 ilke emek yayınları Ankara 2006.

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

Arbeit RD. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. 116-137. In: Manual of Clinical Microbiology PR Murray, EJ Baron, MA Pfaller, FC Tenover and RH Tenover (Ed), 7rd ed, ASM press, Washington USA. 1999

Aslantaş Ö, Öztürk F, Çelebi A, Açık L, Ergün Y. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from subclinic bovine mastitis by protein patterns, antibiotic resistance and plasmid profile Ankara Üniv Vet Fak Derg, 53, 47–51. 2006

Berger-Bachi B, Rohrer S. Factors influencing methicillin resistance in *Staphylococci*. Arch Microbiol;178:165-71. 2002

Bergonier D, de Cremoux R, Rupp R, Lagriffoul G. Berthelot X Mastitis of dairy small ruminants. Vet. Res. 34, 689–716. 2003

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

Bilgehan H. Gram Olumlu Koklar. Bilgehan H, Klinik Mikrobiyolojik Tanı, 4. Basım, İzmir, Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları, 2004; 31 : 507-509

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

Brown DF, Edwards DI, Hawkey PM, Morrison D, Ridgway GL, Towner KJ, Wren MW; Joint Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy; Hospital Infection Society; Infection Control Nurses Association. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). J Antimicrob Chemother. 2005; 56(6):1000-18.

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

Cengiz AT. Staphylococcus. Ustacelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Kitabından. Guneş Kitabevi, Ankara;: 339-346. 1999

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

Cottagnoud P. Cellular and molecular aspects of drugs of the future: meropenem. Cell Mol Life Sci.;59(11):1928-33 2002

Cremonesia Paola, Massimo Luzzanaa, Milena Brascab, Stefano Morandib, Roberta Lodib, Chiara Vimercatic, Dario Agnellinia, Giancarlo Caramentid, Paolo Moronic, Bianca Castiglioni. Development of a multiplex PCR assay for the identification of Staphylococcus aureus enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products Molecular and Cellular Probes 19 299–305 2005

Çetinkaya Y Ünal S. Metisilin dirençli Staphylococcus aureus infeksiyonları: epidemiyoloji ve kontrol. Flora;1;3 (ek):3-16. 1996

Derbentli Ş. Stafilokok ve enterokoklarda antibiyotik duyarlılık deneylerinin özellikleri. Ankem Derg, 10, 211–219 1996.

Derbentli Ş. Stafilokoklarda antibiyotik direnci. ANKEM Derg.;19(Ek-2):54-60. 2005

Dinges MM., Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of Staphylococcus aureus. Clin. Microbiol. Rev. 13, 16–34. 2000

DM Sievert. CDSC.Staphylococcus aureus resistant to vancomycin-United States.MMWR 2002;51 (26): 565-7. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5126a1.htm> Erişim: 10 Ocak 2011.

Durupınar B. Antibiyotiklere dirençte yeni eğilimler. Klinik Dergisi;14(2):47-56. 2001

Erol İ., İşeri Ö. Stafilokokal Enterotoksinler Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Ankara Ankara Üniv Vet Fak Derg, 51, 239-245 2004

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

Ferens WA., Davis WC, Hamilton MJ, Park YH, Deobald CF, Fox L, Bohach G. Activation of bovine lymphocyte subpopulations by staphylococcal enterotoxin C. Infect. Immun. 66, 573–580. 1998.

Foster, TJ. Immune evasion by staphylococci. Nat. Rev. Microbiol. 3, 948–958. 2005.

Fueyo, J.M., Martin, M.C., Gonzales-Hevia, M.A. ve Mendoza, MC. Enterotoxin Production and DNA Fingerprinting in Staphylococcus aureus Isolated from Human and Food Samples. Relation Between Genetic Types and Enterotoxins, International Journal of Food Microbiology, 67, 139-145, 2001

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

Gudding R. Differentiation of staphylococci on the basis of nuclease properties. *J Clin Microbiol.*;18(5):1098-101 1983.

Headrick, M.L. Korangy, S., Bean, N.H., Angulo, F.J., Altekruze, S.F., Potter, M.E., Klontz, KC. The epidemiology of raw milk-associated foodborne disease outbreaks reported in the United States, 1973 through 1992. *Am. J. Public Health* 88, 1219–1221. 1998

Hartman BJ, Tomasz A. Expression of methicillin resistance in heterogeneous strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1986;29(1):85-92.

Haveri M, Hovinen M. Molecular types and genetic profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine 140 intramammary infections and extramammary sites. *J. Clin. Microbiol.* 46, 3728–3735. 2008

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

İlhan Ziya, Taşal İbrahim, Sağcan Süleyman, Solmaz Hasan; Subklinik Mastitisli Keçi Sütlerinden Aerobik Bakterilerin İzolasyonu YYU Veteriner Fakültesi Dergisi, , 22 (2), 89–91 2011

Jevons MP. ‘Celbenin’-Resistant staphylococci 1961. *Br Med J*, 1: 124–5.

Jørgensen, H.J. Mørk, T., Rørvik, LM. The occurrence of *Staphylococcus aureus* on a farm with small-scale production of raw milk cheese. *J. Dairy Sci.* 88, 3810–3817. 2005

Kaatz G, Seo SM, Dorman NJ, Lerner SA. Emergence of teicoplanin resistance during therapy of *Staphylococcus aureus* endocarditis. *J Infect Dis* 1990; 162:103-8.

Kapuağası A, Ağalar C, Apaydın N, Türkyılmaz R. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen stafilokok suşlarının antibiyotik direnç oranlarının değerlendirilmesi. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*;50(2):105-08. 1997

Katsuhiko Omoe, Machiko Ishikawa, Yu Shimoda, Dong-Liang Hu, Shigeko Ueda, Kunihiro Shinagawa. Detection of seg, seh, and sei genes in *Staphylococcus aureus* Isolates and Determination of the Enterotoxin Productivities of *S.Aureus* Isolates Harboring seg, seh, or sei Genes *journal of clinical microbiology*, mar., p. 857–862 2002

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Gram-positive cocci: Part–1: Staphylococci and related organisms. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Fifth Edition. New York: The Lippincott; 1997. p. 539–76.

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

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

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

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

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

Martins A, Cunha M de LRS. methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects. *Microbiol. Immunol* 2007;51(9):787-795.

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

Mendiratta DK, Deotale V , Raut U, Narang Narang P. Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples Department of Microbiology, Mahatma Gandhi Institute of Medical Sciences, Sevagram. Dist Wardha, M.S. - 442 102, India 2009

Menzies, I.P., Ramanoon, Z.S., Mastitis of sheep and goats. *Vet. Clin. N. Am.: Food Anim. Pract.* 17, 333–358 2001

Mørk, T., Tollersrud, T., Kvitle, B., Jørgensen, H.J., Waage, S., Comparison of *Staphylococcus aureus* genotypes recovered from cases of bovine, ovine, and caprine mastitis. *J. Clin. Microbiol.* 43, 3979–3984 2005.

Mørk T., Kvitle B., Mathisen T., Jørgensen H.J. Bacteriological and molecular investigations of *Staphylococcus aureus* in dairy goats *Veterinary Microbiology* 141 134–141 2010

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

Murray PR, Patrick R. *Manuel of clinical microbiology*, 8th ed. Clinic Microbiology, Bölüm 1. Washington DC: ASM Pres; 2003., p.3.

Ömer Akineden, Abdulwahed Ahmed Hassan, Elisabeth Schneider, Ewald Usleber. Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese *International Journal of Food Microbiology* 124 (2008) 211-216

Park YH., Lee SU, Ferens WA, Samuels S, Davis WC, Fox LK, Ahn JS, Seo KS, Chang BS, Hwang SY, Bohach GA. Unique features of bovine lymphocytes exposed to a staphylococcal enterotoxin. *J. Vet. Sci.* 7, 233–239. 2006

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

Roberson, J.R., Fox, L.K., Hancock, D.D., Gay, J.M., Besser, T.E., Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. *J. Dairy Sci.* 77, 3354–3364 1994.

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

Scherrer D., Corti S., Muehlherr J.E, Zweifel C., Stephan R. Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep *Veterinary Microbiology* 101 (2004) 101–10 2004.

Silva Elizabete Rodrigues, Luiz Simeão do Carmo, Nivaldo da Silva, Detection of the enterotoxins A, B, and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds *Veterinary Microbiology* 106 103–107 2005

Smyth, D.S., Hartigan, P.J., Meaney, W.J., Fitzgerald, J.R., Deobald, C.F., Bohach, G.A., Smyth, C.J., Superantigen genes encoded by the *egc* cluster and *SaPIbov* are predominant among *Staphylococcus aureus* isolates from cows, goats, sheep, rabbits and poultry. *J. Med. Microbiol.* 54, 401–411 2005.

Stephan R, Annemuller C, Hassan AA, Lammler C. Characterisation of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. *Vet Microbiol*;38:373–82 2001

Tünger A. *Staphylococcus aureus*: Mikrobiyoloji, Patogenez ve Epidemiyoloji. Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. Gram-Pozitif Bakteri Enfeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara:9-68. 2004.

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

Valle J, Piriz S, Vadillo S. *Staphylococci* isolated from healthy goats. *Zentralbl. Veterinarmed. B* 38, 81–89. 1991

Vautor E, Abadie G, Guibert JM, Chevalier N, Pepin M. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in dairy sheep. *Vet. Microbiol.* 106, 235–239. 2005

Waldvogel FA. *Staphylococcus aureus* (Including *Staphylococcal Toxic Shock*). In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Mandell, Douglas and Bennet's Principles and Practice of Infectious Diseases*. New York: Churchill Livingstone;2069-2092. 2000

Waller JR, Hodel SL, Nuti RN. Improvement of two toluidine blue O-mediated techniques for DNase detection. *J Clin Microbiol.*;21(2):195-9. 1985

Wilke Tally FP. *Staphylococci: Abscesses and Other Diseases*, Schaechter, M., Medoff, G., Einstein Bl. eds. *Mechanisms of Microbiol Disease*, Williams and Wiskins, Maryland, USA. p: 187. 1993

Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6th ed. Baltimore: Lipincott Williams & Wilkins.:623-71. 2006

Witte W. Antibiotic resistance in Gram-positive bacteria: epidemiological aspects. J Antimicrob Chemother 1999;44:1-9.

White E. The prevalence of mastitis in small ruminants and the effect of mastitis on small ruminant production. In: Proceedings of the NMC 46th Annual Meeting. National Mastitis Council, Madison, WI, pp. 119–127 2007.

Woo JH, Mi-Na K, Pai CH, Ryu JS, Hiramatsu K. Vancomycin intermediate Staphylococcus aureus in Korea. J Clin Microbiol 2000; 38: 3879-81.

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

ÖZGEÇMİŞ

Deha Ali DENİZ, 1984 yılında Balıkesir’de doğdu. 2003 yılında Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesini kazandı.2004 yılında yatay geçiş ile Adnan Menderes Üniversitesi veteriner fakültesine geçti ve buradan 2009 yılında mezun oldu. Eylül 2009’dan bu yana, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans eğitimi sürdürmektedir. Mart 2011’den beri GAP Tarımsal Araştırma Enstitüsünde hekimlik mesleğini sürdürmektedir. Bekardır ve yabancı dil olarak “İngilizce” bilmektedir.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda ilgi, yardım ve hoşgörüsünü eksik etmeyen ve araştırmanın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen danışmanım Doç. Dr. Şükrü KIRKAN'a, ADÜ Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Osman KAYA'ya, Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Doç. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ'a, Yrd. Doç. Dr. Serap SAVAŞAN'a, Araştırma Görevlisi Uğur PARIN'a ve bugünlere ulaşmamda emekleri olan sevgili anneme, babama ve çok değerli kardeşime destek ve anlayışlarından dolayı sonsuz teşekkür ederim.