

T.C.
MUŞ ALPARSLAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

NİMETULLAH AKCAN

MUŞ YÖRESİNDEKİ MASTİTİSLİ SÜTLERDEN *STAPHYLOCOCCUS*
***AUREUS* VE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* İZOLASYONU VE**
PLAZMİT İÇERİKLERİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MUŞ-2017

T.C.
MUŞ ALPARSLAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

NİMETULLAH AKCAN

MUŞ YÖRESİNDEKİ MASTİTİSLİ SÜTLERDEN *STAPHYLOCOCCUS*
***AUREUS* VE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* İZOLASYONU VE**
PLAZMİT İÇERİKLERİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Yusuf ALAN

MUŞ-2017

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Muş Alparslan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum “Muş Yöresindeki Mastitisli Sütlerden *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* İzolasyonu ve Plazmit İçeriklerinin Belirlenmesi” adlı tezin tamamen kendi çalışmam olduğunu ve her alıntıya kaynak gösterdiğimi taahhüt eder, tezimin kâğıt ve elektronik kopyalarının Muş Alparslan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü arşivlerinde aşağıda belirttiğim koşullarda saklanmasına izin verdiğimi onaylarım.

Lisansüstü Eğitim-Öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim.

Tezimin/Raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir.

Tezim/Raporum sadece Muş Alparslan Üniversitesi yerleşkelerinden erişime açılabilir.

Tezimin/Raporumun yıl süreyle erişime açılmasını istemiyorum. Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir.

42/12/2017


Nimetullah AKCAN

Bu çalışma Muş Alparslan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: MŞÜ16-EMF-G01

TEZ KABUL TUTANAĞI

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Yrd. Doç. Dr. Yusuf ALAN danışmanlığında, Nimetullah AKCAN tarafından hazırlanan “Muş Yöresindeki Mastitisli Sütlerden *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* İzolasyonu ve Plazmit İçeriklerinin Belirlenmesi” konulu bu çalışma 12/12/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Yrd. Doç. Dr. Kerem ÖZDEMİR

İmza :

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Zeynal TOPALCENGİZ

İmza :

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Yusuf ALAN

İmza :

Yukarıdaki imzalar adı geçen öğretim üyelerine aittir.

..... /...../2017

Prof. Dr. Murad Aydın ŞANDA

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin süresince büyük emeği geçen, bu süreçte sabrını ve bilgilerini esirgemeyen, tez çalışmalarında her türlü konuda destek olan deneyimlerinden çok şey kazandığım değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Yusuf ALAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Sevgisini bizden esirgemeyen ve her zaman destekçimiz olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Hüseyin ALLAHVERDİ'ye teşekkür ederim. Ayrıca tez aşamasında her türlü destek ve katkılarını esirgemeyen arkadaşım Kayhan MANĖ, Mehmet SÖNMEZ ve Aytekin Özhan DEMİR'e teşekkür ederim. Aynı zamanda çalışmam boyunca destek ve katkılarını esirgemeyen Berivan ALTINTAŐ'a ve aileme teşekkür ederim.

Nimetullah AKCAN

Aralık, 2017

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Mastitis.....	4
1.2. Mastitise Neden Olan Mikroorganizmalar	7
1.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	8
1.2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
1.3. Mastitis Etkenli Bakterilerin Plazmit Özellikleri	13
1.4. Bakterilerinin Antibiyotik Direnç Özellikleri	15
2. MATERYAL VE METOT	17
2.1. Kullanılan Cihazlar	17
2.2. Kimyasallar	17
2.3. Süt Örnekleri.....	17
2.4. Besiyeri ve Hazırlanması	18
2.5. Çözeltiler ve Hazırlanması.....	19
2.6. <i>S. aureus</i> ve <i>P. aeruginosa</i> Bakterilerinin İzolasyonu	21
2.7. <i>S. aureus</i> ve <i>P. aeruginosa</i> Bakterilerinin Ön Tanımlanması.....	21
2.7.1. Koloni morfolojisi.....	21
2.7.2. Gram boyama.....	21
2.7.3. Katalaz testi.....	21
2.8. Moleküler Biyoloji Metotları	22
2.8.1. Oligonükleotit primerler	22
2.8.2. Kromozomal DNA İzolasyonu	22
2.8.3. Polimeraz zincir reaksiyonu	22
2.8.4. Plazmit DNA İzolasyonu	23
2.8.4.1. Hazır kit kullanılarak yapılan plazmit DNA izolasyonu.....	23
2.8.4.2. Geleneksel plazmit DNA İzolasyonu.....	23

Sayfa

2.8.5. DNA'nın jel elektroforezi	24
2.9. İzolatların Stoklanması	25
2.10. İzolatların Antibiyotiklere Karşı Direnç Özelliklerinin Belirlenmesi	25
2.10.1. Disk difüzyon metodu	25
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	27
3.1. Mastitis Etkeni Bakterilerinin İzolasyonu ve Tanımlanması	27
3.1.1. İzolatların Morfolojik ve Biyokimyasal Olarak Tanımlanması	27
3.1.2. İzolatların <i>algD</i> ve <i>Nuc</i> gen bölgelerinin PCR ile çoğaltılması	32
3.2. Plazmit İzolasyonu ve Antibiyotik Direnç Özellikleri	33
3.2.1 İzolatlarından plazmit izolasyonu	34
3.2.2. İzolatların antibiyotik direnç özellikleri	35
4. SONUÇ VE ÖNERİLER	41
5. KAYNAKLAR	42
6. ÖZGEÇMİŞ	49

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MUŞ YÖRESİNDEKİ MASTİTİSLİ SÜTLERDEN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* VE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* İZOLASYONU VE PLAZMİT İÇERİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Nimetullah AKCAN

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Yusuf ALAN

2017, 49 sayfa

Bu çalışmada, Muş'un farklı bölgelerinden rastgele toplanan 88 adet süt örneklerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* izolatları biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle tanımlanması amaçlanmıştır. Moleküler tanımlama *P. aeruginosa* için *algD* ve *S. aureus* için ise *Nuc* gen dizisi kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu metodu ile yapılmış ve sonuç olarak toplam 19 adet şüpheli *S. aureus* suşu elde edilmiş olup, *P. aeruginosa* suşlarının varlığı tespit edilmemiştir. Tanımlanan izolatların plazmit DNA sayıları 1 ila 3 arasında değişiklik gösterdiği ve ortalama 2 plazmit içerdiği tespit edilmiştir. İzolatların antibiyotiklere karşı en yüksek duyarlılığı siproflaksasin'e karşı (%100) gösterirken, en düşük duyarlılık ise penisillin, seftazidim, piperasillin ve trimethoprim'e (% 0.0) karşı göstermiştir. İzolatlar en yüksek orta dereceli duyarlılığı kanamisin'e (% 52.7) karşı göstermiş olup, gentamisin'e karşı ise (% 10.5) en düşük orta dereceli duyarlılık gösterdikleri belirlenmiştir. *S. aureus* suşlar en yüksek direnci penisillin, seftazidim ve trimethoprim antibiyotiğine karşı (%100) gösterirken, en düşük direnci ise Kanamisin'e (% 21) karşı gösterdiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Mastitis, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, Moleküler Tanımlama, Plazmit, Antibiyotik Dirençlilik, Antibakteriyel Etki.

ABSTRACT

Master's thesis

ISOLATION OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* VE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* FROM MASTITIS MILK IN MUS REGION AND DETERMINATION OF PLASMID CONTENT

Nimetullah AKCAN

Supervisor: Assit. Prof. Dr. Yusuf ALAN

2017, Page: 49

In this study, it was aimed to identify *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates isolated from 88 randomly collected milk samples from different regions of Mus by biochemical and molecular methods. Molecular identification was done by polymerase chain reaction method using *ald* to *P. aeruginosa* and *Nuc* gene for *S. aureus*, resulting in a total of 19 suspected *S. aureus* strains and *P. aeruginosa* strains were not detected. The identified isolates were had plasmid DNA numbers varying from one to three and containing an average of two plasmids. While isolates showed the highest sensitivity to antibiotics (100%) against ciproflaxacin, the lowest susceptibility to penicillin, ceftazidime, piperacillin and trimethoprim (0.0%). The isolates showed the highest moderate susceptibility to kanamycin (52.7%) and the lowest moderate susceptibility to gentamicin (10.5%). *S. aureus* strains showed the highest resistance against penicillin, ceftazidime and trimethoprim antibiotics (100%) while the lowest resistance against Kanamycin (21%).

Keywords: Mastitis, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, Molecular Description, Plasmid, Antibiotic Resistance, Antibacterial Effect.

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 2.1. Muş ilinin farklı bölgelerinden toplanan süt örneklerinden izole edilen ve tanımlanan bakteri listesi	18
Çizelge 2.2. <i>algD</i> (<i>vic</i>) ve <i>Nuc</i> gen bölgesinin tanımlanması için kullanılan primer nükleotidleri	22
Çizelge 2.3. Kullanılan Antibiyotikler ve Konsantrasyonları.....	25
Çizelge 3.1. Muş ilinin farklı bölgelerden toplanan süt örneklerinden elde edilen İzolat sayıları.....	27
Çizelge 3.2. Bakterilerinin morfolojik ve biyokimyasal sonuçları	30
Çizelge 3.3. Doğal sütlerden izole edilen <i>S. aureus</i> suşlarının plazmit içerikleri.....	35
Çizelge 3.4. Doğal sütlerden izole edilen <i>S. aureus</i> suşların antibiyotik dirençlilikleri	37
Çizelge 3.5. CLSI'ya göre disk difüzyon yöntemine göre zon çaplarının değerlendirilmesi	39
Çizelge 3.6. Doğal sütlerden izole edilen <i>S. aureus</i> suşlarının direnç-duyarlılık durumlarının standart antibiyotiklerle karşılaştırması	39

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. <i>S. aureus</i> bakterilerinin genel görünümü.....	10
Şekil 1. 2. <i>P. aeruginosa</i> 'nın genel görünümü	12
Şekil 3.1. <i>S. aureus</i> suşlarının nütrient agarda koloni görüntüleri.....	28
Şekil 3.2. <i>S. aureus</i> suşlarının mannitol salt agarda gelişimi.....	28
Şekil 3.3. <i>S. aureus</i> suşlarının ışık mikroskobunda koloni görünüşleri.	29
Şekil 3. 4. <i>P. aeruginosa</i> suşlarının ışık mikroskobunda görünüşleri.	29
Şekil 3.5. <i>S. aureus</i> bakterilerinin PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: 100 bç DNA standardı. <i>S. aureus</i> ATCC 25923.	33
Şekil 3.6. <i>S. aureus</i> bakterilerinin PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: 100 bç DNA standardı.....	33
Şekil 3.7. Doğal sütlerden izole edilen <i>S. aureus</i> (1-10 nolu izolatlar) bakterilerinin plazmit DNA izolasyonu sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: 1 kbç DNA standardı.....	34
Şekil 3.8. Doğal sütlerden izole edilen <i>S. aureus</i> (11-19 nolu izolatlar) bakterilerinin plazmit DNA izolasyonu sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: 1 kbç DNA standardı.....	34
Şekil 3 9. <i>S. aureus</i> suşlarının antibiyotik direnç özelliklerinin disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesi sonucu elde edilen zon görüntüleri.....	36

SİMGELER ve KISALTMALAR

A	: Adenin
AFLP	: Çoğaltılmış parça uzunluğu polimorfizmi
Bç	: Baz çifti
C	: Sitozin
°C	: Santigrad derece
Cm	: Santimetre
CO₂	: Karbondioksit
dH₂O	: Distile su
Dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
Dntp	: Deoksi nükleotid trifosfat
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
Et-Br	: Etidium bromür
G	: Guanin
Gr	: Gram
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
I	: Orta derece duyarlı
Kb	: Kilobaz
M	: Markır
ml	: Mililitre
PFGE	: Pulsed Field Gel Electrophoresis
R	: Dirençli
RPM	: Dakikada devir
S	: Duyarlı
Sp	: Tür
Ssp	: Alt tür
µl	: Mikrolitre

1. GİRİŞ

Süt; dişi memeli hayvanların yeni doğurdukları yavrularını besleyebilmek üzere, süt bezlerinde hayvan türlerine göre farklı sürelerde salgılanan, içinde yavrunun kendi kendisini besleyecek bir duruma gelinceye kadar almak zorunda olduğu tüm besin maddelerini gerekli oranlarda bulunduran, porselen beyazı renginde kendine has tat ve kokusu olan bir sıvıdır (Metin, 2003).

Birleşmiş Milletler Halk Sağlığı Teşkilatı sütü, bir veya daha fazla sayıdaki sağlıklı ineklerin tam olarak sağılmaları sonucu elde edilen, kolostrumdan yoksun, % 8.25 den daha az yağsız kuru madde ve % 3.25 den daha az süt yağı vermeyen taze meme sekresyonu olarak tanımlamıştır.

Türk Gıda Kodeksine göre: çiğ süt; bir veya daha fazla inek, keçi, koyun veya mandanın sağılmasıyla elde edilen, 0 °C'nin üzerinde ısıtılmamış veya eşdeğer etkiye sahip herhangi işlem görmemiş kolostrum dışındaki meme bezi salgısıdır (Anonim, 2000).

Süt, memelilerin neonatal dönemle beraber büyüme ve gelişmeleri için elzemdir. Büyüme ve gelişmenin yanı sıra; yapısında bulunan ve fizyolojik olarak önemli olan immünoglobulinler, enzimler, enzim inhibitörleri, büyüme hormonları, diğer hormonlar, büyüme faktörleri, antibakteriyel ajanlar gibi protein ve peptid yapılı öğeler ile yağ asitleri, vitamin ve minerallerden dolayı yaşam döngüsü içerisinde birçok önemli özelliğe sahiptir (Fox, 2003).

Tayyar ve Şen (2007)'e göre, süt çeşitli tuzlar ve süt şekerinden oluşan kristaleoitlerin bir eriyiğidir. Bu eriyik içinde kazein ve albümin koloidal halde, yağ ise emülsiyon halinde bulunmaktadır. Sütteki su ve diğer maddelerin miktarları aynı olmakla birlikte protein ve yağ miktarları bakım ve beslenmeye, yaşa ve hayvanların türüne göre değişiklikler göstermektedir.

Genel özelliklerine bakılırsa, süt, beyaz, opak (saydam olmayan) kendine has bir lezzette, bazen sağıldığı hayvanın yediği yeme göre değişik kokuda, 6,3-6,5 pH'lı mevcut gıdaların içinde en mükemmel besleyici değere sahip bir sıvıdır. Süt denildiğinde sadece inek sütü anlaşılır. Diğer hayvan sütleri sağıldığı hayvanın türü ile adlandırılmaktadır (koyun sütü, keçi sütü, manda sütü v.b.). fakat doğumdan 15 gün önce ve 7 gün sonraya kadar sağılan sütlerin ticari sütlerin bir önemi yoktur. Kolostrum

(ağız sütü) olarak adlandırılan bu sütler yavruların beslenmesinde büyük önem taşır (Tayar ve Şen, 2007).

Süt ve süt ürünleri ile ilgili çalışmaların geçmişi insanlık tarihi kadar eskidir. Günümüzden 4500 yıl öncesine ait bir Mezopotamya mühründe, bereket tanrıcısının önünde bir keçinin sağlığı gösterilmektedir. Kutsal kitaplarda da süt sığırı ile süt, yağ, peynir ve süt ürünlerinin ekonomiye olan katkılarından söz eden 150'ye yakın genel referansa rastlanmaktadır. Süt eski Mısır ve Hindistan'da dini merasimlerde kullanılırken, bazı ülkelerde de ilaç yerine kullanılmıştır. Orta Asya'da Kırgızların, Arabistan'da bedevilerin ve Afrika'da Bantus'ların temel gıda maddelerinin süt ve süt ürünleri olduğu bilinmektedir. Sütçülüğün çok eski geçmişi olmasına rağmen, gelişmesi oldukça geç ve yavaş olmuştur. Kimya, biyoloji, fizyoloji, bakteriyoloji, zooloji, beslenme ve insan sağlığı gibi birçok bilim dallarında görülen gelişmeler, süt endüstrisinin de gelişmesine katkı sağlamıştır. (Konar, 1998). Tüketilen süt çeşidi toplumların kültürlerine göre değişiklik göstermektedir. Ancak ülkemizde süt denildiğinde akla ilk olarak inek sütü gelmesine karşın tüketilmekte olan sütler inek, koyun, keçi ve manda sütü olmak üzere 4 çeşittir (Besler ve Ünal 2006).

Dünya nüfusunun her geçen gün hızla artması, sınırlı olan besin kaynaklarının daha verimli kullanılmasını zorunlu kılmıştır. Bugün dünyada insanların doyurulması değil, aynı zamanda dengeli bir şekilde beslenmesinin de önemli olduğu anlaşılmıştır. Dengeli bir beslenme sağlanabilmesi için protein yönünden zengin hayvansal gıdaların tüketiminin artırılması gerekmektedir (Küçüköner ve Tarakçı, 1998). Ayrıca bileşimindeki çok değerli ve komple besin maddeleri nedeniyle mikroorganizmaların gelişimi için de uygun bir ortam oluşturmaktadır. Bu nedenle çabuk bozulabilen ve kolaylıkla değerini kaybedebilen bir niteliktedir (Eralp, 1974; Güven, 1993).

Sağlıklı bir hayvanın memesinde sentezlenen süt, hiçbir mikroorganizma içermez. Ancak, hayvan memesinden sağım işlemi aseptik koşullarda yapıldığında bile değişik kaynaklardan mikroorganizmalar süte bulaşır. Süt daha meme içindeyken hayvanın memesi üzerinde bulunan bakteriler süt kanalları vasıtasıyla meme bezlerine girerek süte geçerler. Bunun dışında sağım sırasında, sağımdan sonra, taşınırken, işletmelerde çeşitli ürünlere işlenirken ve nihayet dağıtım sırasında da mikroorganizmaların süt ve mamullerine bulaşma olasılığı mevcuttur. Sağım

kaplarından, taşıma donanımlarından, ahır havasından, sudan, yemden ve çevreden birçok mikroorganizma süte bulaşabilir (Metin, 2003)

Süt hayvanının derisinden, ahır koşullarına bağlı olarak daha değişik bakterilerin bulaşması mümkündür. Hayvan derisi üzerinde sıkça rastlanan bakterilere örnek olarak; *S. aureus*, *E. coli*, *K. aerogenes*, *C. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. uberis*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* verilebilir. Bu bakterilerden bazıları meme iltihaplanmasına (mastitis) neden olur ve süt teknolojisinde zararlı olduklarından istenmeyen bakterilerdir. Ahır havasından ileri gelen bakteri kontaminasyonu özellikle sağımdan önce ahırın temizlenmesi, süpürülmesi veya yem verilmesi halinde ciddi boyutlarda olabilir Mikroorganizmalar süte iki yol ile bulaşır: 1. Sağımdan önce hastalıklı hayvanın meme bezlerinden. 2. Sağımdan sonra ortamdan bulaşma (Metin, 2003).

Mikroorganizmalar süt içerisinde hızla çoğalırlar. Bir damla kesilmiş sütte 50 milyon kadar bakteri hücresi bulunur. Sütte hem yararlı hem de zararlı mikroorganizmalar bulunabilir. Bunlar; bakteriler, küfler, mayalar ve bakteriyofajlardır. Sütte en çok bulunan bakteriler, laktozu parçalayabilen ve ekşimeye neden olanlardır. Asitlik belirli bir sınırı aşarsa süt hemen kesilir. Bunların bir grubu laktozu yalnız laktik aside dönüştürdüğü için homofermentatif, diğer bir grubu ise laktik asit ile birlikte aset aldehit, alkol ve gazları meydana getirdiği için heterofermentatif olarak adlandırılırlar (Konar, 1998; Tekinşen vd., 2002).

Normalde sağlıklı bir süt hayvanının sütü sağım anında steril olmasına karşın, hijyenik olmayan sağım koşullarına bağlı olarak süt, bakteriler ile kontamine olur. Sağlıklı olmayan süt hayvanları, mastitis ve subklinik mastitis gibi lokal enfeksiyon etkenlerinin yanı sıra, sistemik enfeksiyon etkenlerinden olan *Coxiella burnetii*, *Mycobacterium bovis* ve *Brucella* spp. gibi patojen mikroorganizmaları süte bulaştırabilirler (Erol, 2007).

Süt ve mamüllerinin neden olduğu hastalıklar denildiğinde genellikle bakteriyel kaynaklı enfeksiyon ve bakteriyel zehirlenmeler (intoksikasyonlar) akla gelmektedir. Bakteriyel intoksikasyon; süt ve mamüllerinde oluşan bakteriyel toksinin neden olduğu hastalıklardır. Bakteriyel enfeksiyon ise, bakterilerle kontamine olmuş süt ve mamülleri aracılığıyla patojen bakterilerin vücuda alınması sonucunda ortaya çıkan hastalıklardır (Metin ve Öztürk, 2003)

Süt ve süt ürünleri ile ilişkili hastalıkların büyük çoğunluğu bakteriyel kökenlidir. Tifo ve kızıl hastalıkları etkeni olan *Salmonella typhi* ve *Streptococcus pyogenes* gibi patojenler, bu bakterilerin taşıyıcısı olan insanlar tarafından çiğ süte bulaştırıldığından 1940 yılından önce, tifo ve kızıl süttten kaynaklandığı en sık rapor edilen hastalıklar olmuştur. İkinci Dünya Savaşı boyunca *Brusellozis*, *Salmonellozis* ve Stafilokok kaynaklı gıda zehirlenmeleri halk sağlığını tehdit eden en önemli tehlikelerdendir. Listeriozis, çiğ sütte bulunan *Listeria monocytogenes* adlı patojen bakteri tarafından oluşturulan ve ölümcül olabilen bir hastalıktır (McSweeney ve Foxi, 2008).

1.1. Mastitis

Mastitis, Yunanca'da meme anlamına gelen "mastos" ve yangı anlamına gelen "itis" kelimelerinden köken almaktadır (Philpot ve Nickerson, 2000; Biggs, 2009). Hastalık çoğu hayvanda görülmekle birlikte, daha çok sütçü ineklerinde gerek verimin fazla olması gerekse çok aktif olan meme bezinin aşırı duyarlı olması sebebi ile daha sık ortaya çıkmaktadır (Kılıçoğlu, 1984).

Süt sığırı yetiştiriciliğinin en önemli hastalığı olan mastitis, meme bezlerinin travmatik etkilere ve meme içerisine ekzojen veya endojen olarak giren mikroorganizmalara karşı bir tepkisidir. Mastitis, klinik seyirlerine göre klinik ve subklinik mastitisler olarak sınıflandırılmaktadır. Meme dokusunda ve sütte değişikliklerin görüldüğü klinik mastitisler, memede şişme, ağrı, kızarıklık, sıcaklık ve duyarlılık gibi mahallî belirtilerin yanında ateş, halsizlik, iştah ve kilo kaybı gibi sistemik hastalık belirtileri ile karakterizedir. Mastitisin, ikinci formu olan subklinik mastitisler meme dokusunu, süt verimini ve bileşimini etkilemesi nedeniyle daha fazla önem arz etmektedir. Subklinik mastitisler klinik belirti göstermeden seyrettiği için gözden kaçmakta ve kolaylıkla yayılabilmektedir (Baştan, 2009). Süt veriminin azalması, sütün kalitesinin bozulması, tedavi süresince sütün atılması, tedavi ve veteriner hekim giderleri nedeniyle süt sığırcılığı işletmelerinde büyük ekonomik kayıplara neden olan mastitislerin % 70'ni subklinik mastitisler oluşturmaktadır (De Graves vd., 1993).

Mastitisi oluşturan sebepler çok fazladır. Memenin anatomik yapısı, yaş, ırk, hormonal durum, soğuk, ani hava ve sıcaklık değişimleri, iklim, travmalar, bakıcının hayvana yaklaşım şekli, sağım yöntemleri, sağım makinaları, düzenli olmayan sağım,

sağlıklı olmayan ahırlar, hastalığa karşı duyarlılık, beslenme durumu, doğal koruma mekanizmasının baskılanması ayrı ayrı mastitisi oluşturan veya hazırlayan sebeplerdir. Bu sebeplerin hepsinin veteriner hekim tarafından ortadan kaldırmak, dolayısıyla mastitisi yok etme imkanı olmadığı da barizdir (Öncel,1984; Alaçam, 2002; Oviedo-Boyso vd., 2007).

Mastitislerin ortaya çıkışında konağa, çevreye ve mikroorganizmalara ait determinantlar önemli rol oynamaktadır. Konağa ait determinantlar arasında ırk ve kalıtım, yaş ve laktasyon sayısı, laktasyon dönemi, memenin doğal savunma mekanizmaları ve immün sistemin gücü sayılabilir. Çevresel determinantlara ise hava koşulları, mevsim, beslenme, sağım ile ilgili faktörler ve barınak koşulları örnek verilebilir. Mastitis vakalarının büyük çoğunluğu mikroorganizmalar (bakteriler, viruslar ve mantarlar) tarafından oluşturulmaktadır (Arda, 1997). Sığırlardaki mastitis vakalarından 135'ten fazla mikroorganizma izole edilmesine rağmen enfeksiyonların çoğunluğu Stafilokoklar, Streptokoklar ve Gram negatif bakteriler tarafından oluşturulmaktadır (Tenhagen vd., 2006).

Sağlıklı süt, sağlıklı hayvanlardan elde edildiği için, hayvan sağlığını korumak ve mastitis olgularını erken teşhis etmek temel hedeftir. Süt endüstrisinde mastitis nedenli ekonomik kayıplar, süt kalitesinin ve süt veriminin azalması, buna bağlı olarak da ilaç ve veteriner hizmet kullanımının artması ve yem giderlerinin artışı sonucunda ortaya çıkmaktadır. Aynı zamanda, enfeksiyonun tedavisi için kullanılan antibiyotiklerin sütte kalıntı bırakması, bilinçsiz olarak ilaç kullanımına bağlı gelişen antibiyotik dirençli bakteriler, tedavi olanaklarının sınırlanması gibi olumsuz etkiler. Düzenli ve bilinçli kontrol programlarının uygulanması, klinik mastitis olgularının azaltılmasını ve subklinik enfeksiyonların da erken teşhis edilmesini sağlamaktadır (Blood, 1989).

Meme bezine mikroorganizmaların bulaşması genellikle sağım sırasında olmaktadır. Bulaşmada sağımı gerçekleştiren kişinin elleri, meme bezi, havlu veya kurulama kâğıtları, sağım makinası ve meme kadehlerinin rolü büyüktür. Sağım sırasında meme bezine bulaşan *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae* ve *Mycoplasma*'lar gibi çeşitli mikroorganizmalar mastitis önemli etkenleridir. Diğer bulaşmalar şekilleri ise sağımlar arasındaki dönemde olmaktadır. Bu dönemdeki muhtemel bulaşma yolları; Kontamine altlık materyali ve ya toprak, meme başlarının arka bacaklarla teması,

kuyruk hareketleri sonucu memenin kontaminasyonu, ,meme ve meme loblarının yalanması, sineklerin etkisi ve hayvanların ıslanması şeklinde sıralanmaktadır. Sağımlar arasındaki dönemde en fazla streptokok ve kolifor gibi çevresel mastitis etkenleri meme bezine bulaştığı bilinmektedir (Philpot ve Nickerson, 2000).

Mastitisin şekilenebilmesi için sadece patojenik bir mikroorganizmanın memeye girmesi yeterli olmamakla birlikte, orada yaşaması ve patojenik etki yapabilecek sayıya ulaşması gerekmektedir. Mastitise neden olan etkenlerin meme dokusuna girişi hususunda galaktojen enfeksiyonun yani meme başı deliği, meme başı kanalı ve süt kanallarının ilk planda rol aldığı bilinmektedir. Çünkü mastitis vakalarında meme loblarını tamamı aynı anda enfekte olmayıp bazen 1, bazen 2 ve nadiren 3-4 lobları birlikte enfekte olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda meme loblarındaki etkenler de genellikle farklılık göstermektedir. Meme dokusu hematojen yolla da enfekte olabilmekte ve bu yolla oluşan enfeksiyonlar genellikle tüberküloz, brusella ve şap gibi hastalıklarda şekillenmektedir (Berkin ve Milli, 1984).

Süt üretiminde azalmaya, süt kompozisyonunda ve kalitesinde bozulmaya, ekonomik kayıplara ve halk sağlığında tehlikeye neden olan mastitisin etkisi bir hayli fazladır. Bu nedenle, etkili bir kontrol programı bu sorunları çözmek bakımından oldukça önemlidir. İşletmelerde yüksek kaliteli süt üretimi için sadece sürüdeki hasta hayvanların elimine edilmesi yeterli değildir. Bununla birlikte, sağım makinalarının düzenli bakım ve dezenfeksiyonu, rasyon kalitesinin artırılması, mikrobiyal kontaminasyonun en az seviyede tutulması yüksek kaliteli süt üretimi için önemlidir. (Oviedo-Boyso vd., 2007; Haveri, 2008).

İşletme düzeyinde etkin kontrol programlarının uygulanması ile mastitis nedenli kayıpların azaltılması mümkün olabilmektedir. Mastitis kontrol programlarının uygulanması ve bu programların devamlılığının sağlanması, özellikle kapasiteleri büyük olan süt işletmelerinde, ekonomik verimliliğin en önemli göstergesidir. Ancak ülkemizde özellikle süt yönlü yetiştiricilikte işletme kapasitelerinin küçük olması ve henüz verimlilik merkezli mastitis kontrol programlarının oluşturulamaması nedeniyle, süt üretiminde büyük ekonomik kayıplar ortaya çıkmaktadır (Atasever vd., 2008).

1.2. Mastitise Neden Olan Mikroorganizmalar

Sütçü sığırlarda 140'ın üzerinde farklı etken mastitise neden olabilmektedir. Bu özelliğiyle de diğer hastalıklardan ayrılmaktadır. Mastitislerin büyük bir bölümü bakteriyel etkenlere bağlı olarak şekillenmektedir (Philpot ve Nickerson, 2000). Mastitise neden olan mikroorganizmalar; kontagiyoz, çevresel, fırsatçı ve diğer etkenler olmak üzere 4 grupta incelenmektedir:

Kontagiyoz Mikroorganizmalar: Mastitis etkeni olan mikroorganizmalar *S. aureus*, *S. agalactiae*, *Mycoplasma bovis* ve *Corynebacterium bovis*'tir. Bu grup mikroorganizmalar memede üreyerek uzun süreli subklinik mastitislere yol açmaktadırlar.

Çevresel mikroorganizmalar: çevresel streptokoklar ve koliformlar diye iki grupta incelenmektedir. Çevresel streptokok olarak *Streptococcus uberis* ve *Streptococcus dysgalactiae* bilinmektedir. Koliformlar ise *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* ve *Enterobacter aerogenes*'tir. Bu grup mikroorganizmalar sıklıkla kısa süreli klinik mastitislere, *E. coli* ve *K. pneumoniae* ise sıklıkla akut toksik mastitislere neden olmaktadır.

Fırsatçı mikroorganizmalar: Bu grupta, *S. aureus* dışında 20'nin üzerinde stafilokok türü yer almaktadır. Aynı zamanda bu etkenlere *staphylococcus* türleri veya koagulaz negatif stafilokok (KNS)'lar denmektedir. Bu etkenler her ne kadar her sürüde sıklıkla izole edilse de, bunlara bağlı şekillenen enfeksiyonlar genellikle hafif seyretmektedir. KNS'ler en çok kuru dönemde enfeksiyon şekillendirmektedir, dolayısıyla post-partum dönemde bu etken ile enfekte meme loblarının yüzdesi en yüksek düzeydedir. En çok izole edilen KNS türleri *Staphylococcus chromogenes* ve *Staphylococcus hyicus*'dur (Baştan, 2002; Foster, 2006; Schukken ve vd., 2007; Pinho ve vd., 2008; Biggs, 2009).

Diğer mikroorganizmalar: *Pseudomonas*, *Pasteurella*, *Proteus*, *Serratia* türleri, mayalar, *Nocardia* türleri, *Actinomyces pyogenes* ve Gram pozitif basiller bu grupta yer aldığı bilinmektedir. Bu etkenlerin birkaçına bağlı olarak oluşan enfeksiyonların genellikle altında yatan sebep, antibiyotiklerin meme lobuna kullanımına uygun bir biçimde verilmemesidir. *Serratia* türlerine bağlı olarak gelişen mastitisler antibiyotik tedavisine iyi cevap vermediği görülmektedir. *P. aeruginosa* kontamine su ile bağdaştırılmaktadır. Bu mikroorganizmanın sorun olduğu bir sürüde, zaman

kaybetmeden bütün su kaynakları test edilmelidir. Aynı zamanda, sağım araç gereçlerinin temizliği için kullanılan deterjanlar da *Pseudomonas*'ların üremesi için potansiyel bir kaynak olabilmektedir. Bu yüzden, temizlik ve dezenfeksiyon için kullanılan solüsyonların mutlaka doğru konsantrasyonda hazırlanıp hazırlanmadıkları kontrol etmek son derece önemlidir (Pinho vd., 2008; Biggs, 2009).

1.2.1. *Staphylococcus aureus*

Stafilokoklar ilk defa 1884 yılında Rosenbach tarafından irinli yaralardan izole edilmiştir (Schleifer, 1986). Önceki yıllarda *Micrococcaceae* familyası içinde yer alan Stafilocok cinsi, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'nin son baskısında Bacilli sınıfında Bacillales takımında yer almaktadır. Stafilocok cinsi içerisinde yer alan türler, patojenite kriteri olarak kabul edilen koagulaz enzimi sentezleme yeteneklerine göre koagulaz pozitif stafilocoklar (KPS) ve koagulaz negatif stafilocoklar (KNS) olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. KPS'lar *S. aureus*, *S. intermedius* ve *S. hyicus* türlerini içine almaktadır (Akan, 2006).

Stafilokoklar, Gram pozitif, hareketsiz, sporsuz, katalaz pozitif, oksidaz negatif ve üzüm salkımı şeklinde kümeler tarzında 0.5-1.5 µm çapında koklardan oluşmaktadır. Laboratuvarlarda rutin amaçla kullanılan besiyerlerinde kolayca ürer ve 37 °C'de 24-48 saat içinde 2-4 mm çapında düzgün koloniler oluştururlar. Stafilocoklar karotenoidlerden dolayı pigment meydana getirirler. *S. aureus* altın sarısı, *S. Epidermidis* ise beyaz renkte koloni oluşturur. Ancak anaerobik koşullarda pigment oluşturma yeteneği ortadan kalkar. Laboratuvarda 10-42 °C'de üreyebilmelerine rağmen optimum üreme ısı 37 °C'dir. Sporsuz olmasına rağmen dış etkilere ve dezenfektanlara karşı oldukça dayanıklıdır. Kültürlerde +4 °C'de 2-3 ay, -20 °C'de 3-6 ay canlılıklarını koruyabilirler. Stafilocoklar 60 °C'lik ısıya 30 dk dayanabilirler. Fenolde (% 2) 15 dakikada inaktive olurken, % 9'luk NaCl ve sakkarozaya tolerans gösterebilmektedir (Akan, 2006).

Stafilokoklar insanlarda ve hayvanlarda çeşitli hastalıklara neden olmaktadır. *S. aureus*'un insanlarda, nazokomiyal enfeksiyonlara, toksinlere bağlı enfeksiyonlara, invazyon ve/veya sistemik yayılım sonucu ortaya çıkan enfeksiyonlara, deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarına, cerrahi yara enfeksiyonlarına, santral sinir sistemi enfeksiyonlarına, solunum sistemi enfeksiyonlarına, üriner sistem enfeksiyonlarına, kardivasküler sistem enfeksiyonlarına, kas ve iskelet sistemi enfeksiyonlarına neden

olmaktadır. KNS'lar ise insanlarda endokardit, osteomyelit, oküler operasyonlara bağlı gelişen endoftalmit, üriner sistem enfeksiyonlarına, nazokomiyal ve toplumsal kökenli gelişen enfeksiyonlara, immunsuprese bireylerde bakteriyemi ve vücuda uygulanan protez implantlarını takiben gelişen enfeksiyonlara yol açmaktadır (Bilgehan, 2000).

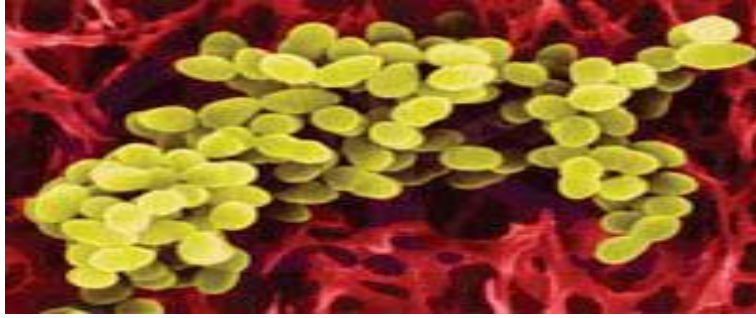
Stafilokoklar hayvanlarda farklı klinik tablolarla karakterize enfeksiyonlara neden olmaktadır. İneklerde mastitis ve meme impetigosu, koyunlarda mastitis, kuzularda enzootik kene piyemisi, periorbital ekzama, dermatit ve follikülit, keçilerde mastit ve dermatit, domuzlarda mastitis, meme bezlerinin botriyomikozisi, nekrotize stafilokokal endometritis ve meme impetigosu, atlarda mastit ve botriyomikozis, tavşanlarda ve yeni doğanlarda eksudatif dermatit, apse, konjunktivit, kanatlılarda stafilokokkal artrit, septisemi ve omfalit, kedi ve köpeklerde piyoderma, piyometra, sistit ve otitis eksternaya neden olmaktadır (Gillespe vd., 1999).

Stafilokokların sahip olduğu toksinler, enzimler, yüzey proteinleri, kapsül ve slime gibi virulans faktörleri mastitislerin patogenezisinde önemli bir yere sahiptir. Bu faktörler konak savunma mekanizmalarından etkenin korunmasına, memede enfeksiyon başlatmasına ve invazyonuna yardımcı olurlar. Akut inek mastitislerinde küçük meme kanallarının fibrin pıhtılarıyla hızlı bir şekilde tıkanması, irinli bir sekresyon, fibrin birikimi, etkilenen dokuların ödematöz şişkinliği görülür. Yangının şiddeti birkaç gün içinde azalmaya başlar ve meme kanallarının etrafında meydana gelen doku üremesine bağlı olarak meme dokusunda atrofi meydana gelir (Karahan, 2005).

S. aureus, gram-pozitif, yuvarlak, hareketsiz, genellikle kapsülsüz, sporsuz, fakultatif anaerob bir bakteri olduğu bilinmektedir. Mikroskop ile bakıldığında üzüm salkımı şeklinde görülmektedir. Etken alfa toksin, beta-toksin, delta-toksin, gama-toksin, lokosidin, ekfoliyatif toksin, enterotoksin gibi toksinler salgılamaktadır (Ali-Vehmas ve Sandholm, 1995; Leloğlu, 1997; Haveri, 2008).

S. aureus; pigmentli, koagülaz pozitif, mannitol, sükroz, maltoz ve trehalozdan asit yapabilen, alfa toksin yapan, novobiocin'e duyarlı, kapsülsüz bir bakteridir (Bilgehan, 1994). *S. aureus* suşları optimum olarak 37°C ve pH 7,4.de ürerler. Bu bakteriler fakültatif anaerob olmalarına karşın genellikle aerob üremeyi tercih ederler (Bilgehan, 1994; Brook vd., 1995). Basit besiyerleri dâhil birçok besiyerinde üreseler de kanlı besiyerlerinde daha iyi çoğalırlar ve kolonilerinin etrafında tam hemoliz meydana getirirler. Jelöz besiyerlerinde ise yuvarlak kenarlı, mat, kabarık, parlak yüzeyli S

tipinde ve 1-2 mm çapında koloniler oluştururlar. Eğer ortam uygunsuzsa bu kolonilerin çapı 6-8 mm.ye ulaşabilir (Bilgehan, 1994).



Şekil 1.1. *S. aureus* bakterilerinin genel görünümü (www.unpisi.it/images/stafilococcus)

Enfeksiyonlara yol açmadaki patojenitesi ve gıdalarda oluşturduğu zehirlenmeler nedeniyle, bu bakterinin üzerinde çok sayıda araştırma yapılmış ve yapılmaya devam etmektedir. Hayatı tehdit eden nozokomiyal enfeksiyonlardan en sık soyutlanan etkenlerin başında gelen stafilokoklar, antibiyotiklere karşı gittikçe artan dirençlilikleri sebebiyle gerek hastanelerde ve gerekse toplum kökenli enfeksiyonlarda büyük bir sağlık sorunu haline gelmiştir (Öncül vd., 2002).

S. aureus bakterisinin neden olduğu enfeksiyonlar ilk kez İskoç cerrah Alexander Ogston tarafından 100 yıldan fazla bir zaman önce karakterize edilmiştir. 1890'lı yıllarda *S. aureus*'un sığırlarda mastitise neden olduğunu söylemiştir (Haveri, 2008). Dokuları yıkılamayan toksinler üretmektedir. Etken, meme dokusuna girişinden sonra immün sistem uyarılmakta ve iltihaplı bölgelere çok sayıda lökosit göç etmektedir. Yıkım ilk etapta, meme başı kanalını döşeyen dokular ve bez sisternalarında başlamakta, daha sonra etken kanal sistemi içine doğru ilerlemekte, alveollerde derin ve küçük enfekte bölgeler oluşturabilmektedir. Enfeksiyon bölgesinde yıkımlanan dokular yerine oluşan skatriks dokusu veya apse, antibiyotiklerin bu bölgelere ulaşmasına engel olmaktadır. Alveollerdeki yıkım sonucu ortaya çıkan ölü veya yozlaşmış hücreler, lokositler ile birleşerek alveollerden sütun boşaltılmasını engellemekte ve bölgede skatriks dokusunun artmasına sebep olmaktadır. Ancak tıkalı kanallar tekrar açılırsa, etken meme dokusunun diğer bölümlerine ilerlemektedir. Bu şekilde memenin farklı bölgelerinde apseler şekillenmekte ve bu apseler bazen dışarı açılmaktadır. Bazen de, mikroapselerin kapsülleri açılarak süte bakteri saçılımı olabilmektedir (çünkü her zaman süte bakteri saçılımı olmayabiliyor). Bu nedenle, *S. aureus*'u sütte izole etmek her vakit

mümkün olmamaktadır. Sütte bu bakteriyi izole etmemek, memede *S. aureus*'un olmadığı anlamına gelmemektedir (Milli, 2001; Bastan, 2010a).

Staphylococcus aureus insanlarda birçok enfeksiyonlara neden olan bir bakteridir. Ortam Şartlarına dayanıklı olduklarından doğada çok yaygındırlar. İnsanlarda enfeksiyon yapan patojen stafilokokların kaynağı yine insanlardır (Hacıbektaşoğlu vd., 1993). İnsanların burun, boğaz ve deri gibi dışa dönük yerlerinde mevcut olan bakterilerin bir bölümü daimi, bir bölümü de geçici flora olmak üzere iki grupta toplanır. Vücudun değişik kesimlerine yerleşmiş patojenler arasında en önemli olanı stafilokoklardır (Ergün Arabacı vd., 2008).

S. aureus doğal olarak en fazla burun ve boğaz boşluğunu örten mukaza dokusunda yer alır ve buradan pek çok yere yayılır. Deride ise en çok ellerde, kollarda ve yüzde bulunur. Aynı zamanda insan ve hayvanların dışkılarında, abseli yaralarda, sivilce ve çibanlarda da yoğun olarak bulunmaktadır (Bilgehan, 1992). *S. aureus*'un bazı özel direnç mekanizmaları gıdalarda bulunmasını ve gelişmesini sağlamaktadır. Spor oluşturmadığı halde vücut dışında canlılığını uzun süre koruyabilen tek insan patojenidir (Bilgehan, 1992; Arda, 2000).

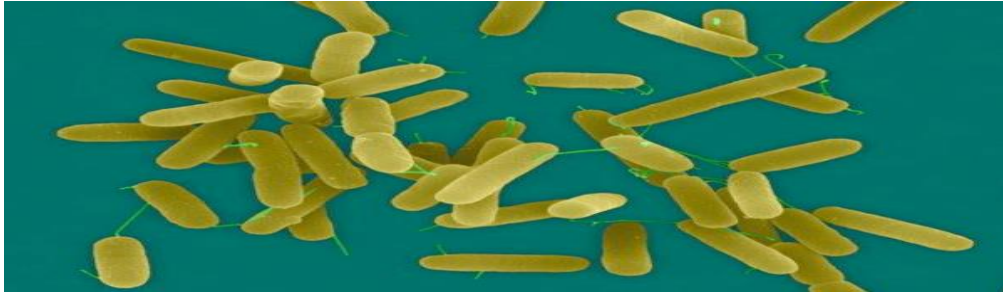
Mastitislerin tanısında *S. aureus*'a bağlı bakteriyel izolasyon önemli tanı yöntemidir. Bir çiftlikte *S. aureus*'un önemli bir sorun olup olmadığını belirlemek için, SHS uzun süre yüksek seyreden ineklerden örnek almak oldukça önemlidir. Bu yaklaşım, yararlı bir başlangıç noktası olacaktır. Bununla beraber, *S. aureus* ile enfekte ineklerde SHS'nın bazen düşük olacağı da unutulmamalıdır. Mastitisli meme loblarından alınan süt örneklerinden *S. aureus*'u izole etmek her zaman mümkün olmamaktadır. Çünkü bu bakterinin süt içinde sayısı bazen yüksek, bazen de gözlenmeyecek kadar düşük olabilmektedir. O yüzden, *S. aureus*'u izole etmek için belirli zaman aralıkları ile 2-3 süt örneğinin bakteriyolojik muayenesi yapılmalıdır. Tek bir örnekteki negatif sonuç, ineğin *S. aureus* ile enfekte olmadığına kanıt göstermemektedir (Baştan, 2010a).

S. aureus'a bağlı mastitislerde antibiyotik tedavisinin başarısız olmasına sebep faktörler; birden fazla meme lobunun enfekte olması, fazla sayıda doğum yapmış olma, enfeksiyonun beta-laktamaz üreten *S. aureus*'a bağlı gelişmesi, enfeksiyonun oluşması ile tedavi arasında geçen sürenin uzunluğu, SHS'nın yüksek olması, meme dokusunda

apse veya fibrozis şekillenmesi, meme başı lezyonlarının şiddeti ve diğer sağlık sorunlarıdır (Baştan, 2010a).

1.2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Etken aerobik, genellikle kapsülsüz ama bazen kapsül oluşumu görülebilen, taze kültürlerdeki flagellaları ile çok hızlı hareket edebilen, kültürlerde bazen ikişerli fakat çoğunlukla tek olarak görülen basillerdir (Arda vd., 1997). Gram negatif basil olan *P. aeruginosa* 0,5-0,8 mikrometre en ve 1,5-3,0 mikrometre uzunluğundadır. Hemen tüm türlerde bir polar flagella vardır. Ancak bazı türlerde 2 ya da 3 flagella görülebilmektedir (Iglewski 2002). *P. aeruginosa* genel besi yerlerinde kolaylıkla ürer. % 5 koyun kanlı agarda beta hemoliz yaparlar ve petri kutusu açıldığında üzüksü koku duyulur (Arda vd., 1997). Optimal üreme ısısı 37 °C' dir, ancak 42 °C'ye kadar yükselebilir. Bu ısı toleransı, fiziksel durumunun çeşitliliğinden kaynaklanan ve doğada fırsatçı patojen olmasının verdiği bir sonuçtur. Bununla beraber çoğalma için nemli yüzeylerin tercih edildiği görülmektedir (Iglewski, 2002; Todar, 2002). Ancak, yüksek NaCl konsantrasyonu veya düşük oksijenli ortam, *Pseudomonas* türlerinin kültürü yapılamayan canlı bakteriler grubuna geçmesinde etkili olmaktadır (Ayaz ve Erol, 2004).



Şekil 1. 2. *P. aeruginosa*'nın genel görünümü (<http://www.ehagroup.com>)

P. aeruginosa'nın hücre duvarı, sitoplazmik membran, peptidoglikan kat ve dış membran olmak üzere 3 kattan oluşmuştur (Iglewski, 2002). Dış membran fosfolipit, protein ve lipopolisakkarit'ten (LPS) meydana gelmiştir. LPS, diğer gram negatif bakterilerde olduğu gibi toksik değildir. Birçok türde LPS, heptoz, 2- keto-3- deoksiocitonik asit ve hidroksi yağ asitlerine ilaveten, içte polisakkaritleri içerir. Son zamanlarda, kistik fibrosisli hastalardan elde edilen izolatlarda, polisakkaritlerin olmadığı, ya da çok az olduğu (O antijen) kanıtlanmıştır (Iglewski, 2002).

P. aeruginosa izolatlarının üç koloni tipi vardır. Doğadan, yani toprak ve sudan izole edilenler, büyük, düzgün, parlak ve nemli, yaygın küçük rough koloni yaparken, klinik örneklerden izole edilenler genel olarak bir ya da farklı iki koloni tipi oluştururlar. Birinci formdaki koloni geniş, kenarları alçak, ortası yüksek, yumurta görümlü koloni olup, bu kolonilerin yüzeylerinde florosan görülür. Bazen bu kolonilerin ortasında çıkıntı olabilir ve bu hal koloniye yağda yumurta görüntüsü kazandırır. Bu ikinci tip koloniler genellikle mukoid koloni yapısında olup, solunum ve üriner sistem sekresyonlarından izole edilip, alginat üretirler. Doğal kaynaklardan izole edilen suşlar, küçük, düzensiz şekilli üçüncü tip kolonileri oluşturur. Koloniler 48 saatlik inkubasyondan sonra daha belirgin bir hal alırlar. Smooth ve mukoid kolonilerin, bakterinin kolonizasyon yeteneği ve virulensi üzerinde rol oynadıkları düşünülmektedir (Iglewski, 2002; Todar, 2002).

Sığırlarda *P. aeruginosa* enfeksiyonları çoğunlukla mastitise neden olmaktadır ve buna bağlı olarak sistemik enfeksiyonlar gelişmektedir. Etkin solunum sisteminde ve intestinal sistemde de enfeksiyona neden olabilmektedir (Arda vd., 1997). Buna karşın *P. aeruginosa*'nın sütçü sığırlarda hastalık yapma oranının çok yüksek olmadığı (% 1-3) bildirilmektedir (Kirk ve Mellenberger, 2002).

P. aeruginosa sığırlarda da fırsatçı patojen olup, meme dokusu ya da meme bezlerinde yaralanma olduğunda aktif hale geçmektedir. Ayrıca diğer bakterilerin ve bakım - beslenme hatalarının hayvanı zayıf düşürdüğü durumlarda hastalık kendini belli etmektedir. Bakteri plastik yüzeylere, hortumlara, çeliğe yapışabilme yeteneğindedir. Bu nedenle iyi dezenfekte edilememiş sağımların makinaları yüzeylerine kolayca lokalize olur. Bu özellik ineğin ineğe etkenin kolaylıkla bulaşmasını sağlamaktadır. Üstlerini saran koruyucu madde (biyofilm) bakteriyi metal yüzeylerin zararlı etkilerinden korurken, sanitasyon amacı ile kullanılan klorin, iyodin gibi dezenfektanlara da dirençli olmasını sağlamaktadır. Bakteri genel olarak sağlam dokularda dokuların doğal direnci nedeniyle hastalık yapmamaktadır (Wolska vd., 1999).

1.3. Mastitis Etkenli Bakterilerin Plazmit Özellikleri

Plazmit tanımı, ilk kez Joshua Lederberg tarafından 1952 yılında kromozom dışı genetik parçalar için kullanılmıştır. Ancak plazmitleri ilk defa 1976'da Chassy ve arkadaşları gözlemlemiştir. Plazmitler; kromozom DNA'dan bağımsız, sitoplazma içersinde, farklı sayılarda, bakteri kromozomal DNA'sına oranla çok daha küçük

boyutta olan halka biçiminde çift polinükleotit ipliğinden oluşmuş DNA molekülleri olarak tanımlanır. Bununla birlikte doğrusal plazmitlerin varlığına da rastlanmaktadır (Tunail, 2009; Yüksekdağ ve Beyatlı, 2009).

Bazı maya ve mantarlara, bakterilerde, özgü kromozomlardan ayrı olarak bulunan bir başka kalıtsal yapıya plazmit denilmektedir. Genel olarak plazmitler genomik DNA'dan ayrılarak oluşan döngüsel kalıtsal yapılardır. Hücre bölüneceği zaman kromozomlardaki DNA gibi plazmitler de replike olabilmektedir. Sarmal ve sirküler yapıya sahip bir plazmit bakteri kromozomunun % 0,2- 4,0'ü kadar büyüklüktedir. Son zamanlarda yapılan araştırmalarda bazı plazmitlerin lineer bir yapı gösterdiği saptanmıştır (Brown, 2000).

Plazmitlerde, DNA replikasyonuna izin veren, bağımsız ve yarı-bağımsız olarak isimlendirilen replikasyon orijini özel bölgeler bulunur. Hücre ikiye bölüneceği zaman plazmit replikasyonunda, kromozomal DNA replikasyonu ile aynı anda gerçekleşmektedir. Ayrıca plazmit orjinli replikasyon enzimlerini de içerisinde bulundurmaktadır, bu nedenle plazmitler de kendi replikasyonlarını yapabildikleri açıklanmıştır. Başka bir kopyasını oluşturan plazmitler, kromozomal DNA'da olduğu gibi iki yavru hücreye aktarabilmektedir. Hücrenin büyümesi, gelişmesi ve üremesi için plazmitler yaşamsal öneme sahip moleküllerin kodlandığı kalıtsal yapılar değildir, çünkü plazmiti çıkarılan bakteri mutantlarının hiçbir sıkıntı yaşamadan aynı ortam koşullarında ve besi ortamında çok iyi bir biçimde üredikleri gözlenmiştir (Tunail, 2009; Yüksekdağ ve Beyatlı, 2009). Plazmitler sitoplazmada dağılmış halde değil de kromozomlar üzerinde bulunursa epizom olarak tanımlanır. Genellikle plazmitlerin taşıdıkları kalıtsal bilgi bakteriler için büyük bir önem arzetmemektedir. Başka bir ifade de bu plazmitler bakteriden atılsa bile, hücre yaşamını devam ettirir. ancak; plazmitlerin genelinde genetik bilgi, bakterilerin kötü koşullara karşı direnç kazanmasını sağlar. Bakteri plazmitinde bulunan bazı gen ürünleriyle naftalin, civa, toluen toksik maddeleri zararsız hale getirilebilir (Dilsiz, 1998).

Plazmitleri farklı bir bakteriye kendini aktarabilmesine göre de sınıflandırılırlar. Tra-genleri konjüгатif plazmitleri taşırlar, bunlar bir plazmitin başka bir mikroorganizmaya transferi olan konjüгasyonun oluşmasını sağlarlar. Nonkonjüгатif plazmitler konjüгasyonu başlatıcı etkiye sahip olmamaktadır. Yalnızca konjüгатif plazmitlerin yardımıyla, aktarılabilirler. Bu kalıtsal bilgiyi aktarmak için

gereken genlere sahip olduğu için konjüгатif plazmitlerin paraziti gibi görünürler, yalnız; onların bulunduğu ortamda yüksek frekansta transfer edilebilirler (Lederbeg, 1998).

1.4. Bakterilerinin Antibiyotik Direnç Özellikleri

Antibiyotiklerin tıp, veterinerlik, su ürünleri teknolojisi gibi geniş bir kullanım alanına sahip olması, bazı bakterilerinde direnç kazanmasına sebep olmuştur. Direnç geninin varlığı antibiyotiğe dirençli bakterilerin gelişmesinde ve seçici antibiyotiklerin kullanılması önemli bir yeri vardır (Mathur ve Singh, 2005).

Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç kullanıma girmesinden kısa bir süre sonra kazanılmıştır. Antibiyotikler geliştikçe bakterilerde yeni direnç mekanizmaları geliştirmiştir. Ayrıca; kullanılan her bilinçsiz antibiyotiğın dirençli bakteri suşlarının hızlı bir şekilde yayılmasını sağlayan en önemli etkendir (Alan, 2014).

Bakterilerin antibiyotiklere gösterdiği direnç problemini çözmek için geliştirilmesinin önemli ölçüde ekonomik kaynak gerektirmesi bu durumun ne denli önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Yapılan son çalışmalarda çocukluk çağı enfeksiyonlarının etkeni olan *Streptococcus pneumoniae* bakterisinin direnç geliştirmesi büyük sorunlara zemin hazırladığı görülmüştür. Bununla birlikte stafilokoklar ve enterokoklar gibi bazı bakterilerin etkeni olduğu enfeksiyonları bu günün koşullarında hiçbir antibiyotiğın tedavi etmede yeterli olmaması potansiyel bir tehlikedir (Favret ve Yousten, 1989).

Stafilokoklar insan ve hayvanlarda çok sayıda hastalığa neden olabilmektedirler. İnek, koyun ve keçilerde görülen mastitislerin en önemli patojenlerinden biridir (Akan, 2006). *S. aureus* mastitislerinin tedavisinde meme içi veya parenteral yolla farklı antibiyotik uygulamalarından yararlanılmaktadır. Akut mastitis olgularında hızlı tedaviye başlamak esas olduğundan, kültür sonuçları beklenmeden geniş spektrumlu bir antibiyotik ile yüksek dozlarda tedaviye başlanır. İlacın 24 saat aralıklarla üç kez tekrar uygulanması tedavi şansını artırır. Ancak, laktasyon dönemindeki mastitis olguları antibiyotik uygulaması ile tümüyle sağaltılamaması nedeniyle kuru döneme geçildikten sonra da sağaltıma devam edilmesi tavsiye edilmektedir. Perakut mastitis olgularında öncelikle memenin tamamen boşaltılması esastır. Parenteral ve meme içi antibiyotik uygulaması ile infekte meme bölümü ve hayvan kurtarılabilir. Antibiyotik tedavisine

paralel olarak toksemiye karşı antihistaminik ve elektrolit tedavisi de uygulanır. Mastitislerin kontrolünde en etkin yöntem uygun ve hijyenik sağım prosedürleri ve meme sağlığı kontrol programlarının uygulanmasıdır (Hutton vd., 1990).

Penisilinin keşfinden sonra *S. aureus* enfeksiyonlarının tedavisi kolaylaşmış ancak daha sonraları penisiline direnç gelişmesi sonucu tedavide güçlükler yaşanmıştır. Metisilin, oksasilin, nafsilin gibi penisilinaza dirençli penisilinlerin 1950'lerde keşfi ile bu sorun kısa sürede çözülmüş ise de 1961 yılında metisiline dirençli suşların tespit edildiği bildirilmiş ve methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) olarak tanımlanmıştır (Bozkurt vd., 2007). Metisiline dirençli stafilokoklar, bütün beta-laktam antibiyotiklere, sefalosporinlere ve beta-laktamaz inhibitör kombinasyonlarına invitro duyarlı görünseler bile dirençli kabul edilmektedirler (Clinical Laboratory Standards Institute, 2002).

P. aeruginosa bulunduğu her nemli ortamda kolaylıkla üreyebilen, antibiyotiklere ve antiseptiklere oldukça direnç gösteren bir mikroorganizmadır. Bu çoğul dirençten sorumlu en önemli mekanizma antibiyotiğe karşı bakteriyel dış membranda geçirgenlik azalması ve aktif pompa sistemi ile antibiyotiğin dışarı atılmasıdır. *P. aeruginosa*'da indüklenebilir kromozomal AmpC tipi beta laktamaz mevcuttur. Bu beta laktamazlar penisilin ve sefalosporinlere dirençte önemli rol oynarlar (Baştürk, 2005). Ayrıca *P. aeruginosa* tarafından kodlanan porin proteinleri çevre koşullarına göre kanalların daralmasına neden olur. Bu durum antibiyotiklerin geçişini sınırlar ve antibiyotiklere karşı direnci artırmada yardımcı olur (Arda, 2006).

Pseudomonas'lar, özellikle de *P. aeruginosa* yaygın olarak kullanılan antimikrobiyel etkenlerin büyük çoğunluğuna dirençlidir. Antibiyotiklere, kimyasal ve fiziksel ajanlara direnç; plazmitler aracılığı ile olur. Örneğin karbenisilin, kloramfenikol, tetrasiklin, sülfonamid, aminoglikozit gibi antibiyotiklere borat, kromat, civa iyonları, tellürit ve UV ışınlarına direnç böyledir (Koçoğlu, 1994; Baştürk, 2005).

2. MATERYAL ve METOT

2.1.Kullanılan Cihazlar

Tez çalışmamız Muş Alparslan Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarları Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratvarında yapılmıştır. Kullanılan alet ve cihazlar; Otoklav (Nüve, OT 40L, TÜRKİYE), Etüv (Nüve NB 20, BELÇİKA), Mikroskop (OLYMPUS, Cx21, ALMANYA), Su banyosu (Nüve NB 20, BELÇİKA), PCR cihazı (NYX Teknik, USA), Jel Görüntüleme Cihazı (Micro DOC, Cleaver Scientific Ltd. UK), Elektroforez Güç Kaynağı (NYX Teknik, USA), jel elektroforez tankı (Cleaver Scientific Ltd. UK) ve santrifüj (Centurion Scientific, UK)

2.2. Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Sigma ve Merck (Almanya), antimikrobiyal testler için kullanılan antibiyotik diskleri Oxoid (Almanya)' dan elde edilmiştir. Moleküler biyoloji malzemeleri Favorgen (Tayvan), Fermentas, Thermo Scientific'den (USA), *algD* (Vic) ve *Nuc* gen varlığını tespit etmek amacıyla kullanılan primerler ise sentagen'den (Türkiye) temin edilmiştir.

2.3. Süt Örnekleri

Bu çalışmada Muş ili merkez/ilçe çevre köylerindeki küçük ve büyükbaş hayvanlardan süt örnekleri toplanmıştır. Mastitis şüphesi nedeniyle toplanan süt örnekleri Muş Alparslan Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarları Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratvarına getirilip materyal olarak kullanılmıştır. Toplam 41 hayvanın 88 meme lobundan alınan süt örnekleri incelendi. Süt örnekleri, meme başları temizlenip % 70'lik alkol ile silindikten sonra bir miktar boşa sağılmasının ardından en az 5 ml olacak miktarda steril tüpler içine sağılarak alındı. Toplanan süt örnekleri steril tüplere alınmış, mümkün olan en kısa sürede ve soğuk şartlarda laboratvara getirilip aynı anda izolasyonu yapılmıştır. Bakteri izolasyonu ve moleküler tanımlamadan sonra süt örneklerinin nereden temin edildiği ve izolasyon numaraları içerecek biçimde isimlendirilmiş ve -20 °C'ye alınmıştır. Toplanan örneklerin ayrıntılı bilgileri Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2. 1. Muş ilinin farklı bölgelerinden toplanan süt örneklerinden izole edilen ve tanımlanan bakteri listesi

Örnek No	Örnek Alınan Canlı	Örnek Alınan Yeri	
NAG1, NAG2 * NAG3, NAG 4*	İnek	Güzeltepe Köyü	
NAG 5, NAG 6, NAG 7, NAG 8	İnek		
NAG 9, NAG 10, NAG 11, NAG 12	Manda		
NAG 13, NAG 14	İnek		
NAG15, NAG16	Keçi		
NAG 17, NAG 18	Koyun		
NAG 19, NAG 20	Keçi		
NAT 1, NAT 2*	İnek		Tekyol Köyü
NAT 3, NAT 4	İnek		
NAT 5, NAT 6, NAT 7, NAT 8	İnek		
NAT 9	Koyun		
NAT 10, NAT 11	Keçi		
NAÇ 1, NAÇ 2, NAÇ 3, NAÇ 4	İnek	Çögürlü /Arınç Köyü	
NAÇ 5 *, NAÇ 6, NAÇ 7 *	İnek		
NAÇ 8, NAÇ 9	Keçi		
NAÇ 10, NAÇ 11, NAÇ 12, NAÇ 13	İnek		
NAÇ 14, NAÇ 15, NAÇ 16, NAÇ 17	İnek		
NAB1 *	İnek		
NAB 2, NAB 3, NAB 4	İnek		Bağlar Köyü
NAB 5, NAB 6, NAB 7, NAB 8	İnek		
NAB 9, NAB 10*	İnek		
NAB 11*, NAB 12	Manda		
NAS 1, NAS 2, NAS 3, NAS 4 *	İnek	Sayan Köyü	
NAS 5, NAS 6 *NAS 7, NAS 8	İnek		
NAKO 1 *NAKO 2, NAKO 3, NAKO 4	İnek	Korkut/Oğul Köyü	
NAKO 5 *, NAKO 6, NAKO 7, NAKO 8 *	İnek		
NAKO 9, NAKO 10	Keçi		
NAMT 1, NAMT 2 *, NAMT 3, NAMT4	İnek	Merkez/Tandoğan Köyü	
NAMT 5, NAMT 6, NAMT 7, NAMT 8	İnek		
NAVO 1*, NAVO 2	İnek	Varto/ Oğlalcık Köyü	
NAVO 3, NAVO *	İnek		
NAMK 1, NAMK 2, NAMK 3 *, NAMK 4	İnek	Muş/ Karaağaç Beldesi	
NAMK 5, NAMK 6, NAMK 7 *, NAMK 8	İnek		
NAMK 9 *	Manda		

* *S. aureus* pozitif izolatlar.

2.4. Besiyeri ve Hazırlanması

Nutrient Agar	Kimyasal Miktarı (gr/l)
Pepton	6.0 gr
Yeast extract	2.0 gr
Beef extract	1.0 gr
Agar	14.0 gr

Distile su ile karıştırılarak 1000 ml'ye tamamlandı, tamamen çözünene kadar mikrodalga fırında kaynatıldı. Otoklavda 121 °C'de 1.2 atm basıncında 15 dakika steril edildi. Su banyosunda 50-55 °C'ye kadar soğutuldu ve 4 mm kalınlıkta olacak şekilde steril petrilere döküldü.

Mannitol salt fenol-red agar

Mannitol Salt Phenol Red Agar 108g/L olacak şekilde distile su içinde ısıtılarak eritilir ve otoklavda 121°C'de 1.2 atm basıncında 15 dakika süre ile sterilize edilir ve petri kaplarına dökülür. Standart yayma yöntemi ile ekim yapılır ve 35-37 °C'de 3 güne kadar inkübe edilir. İnkübasyon süresi sonunda etrafı sarı zon ile çevrili büyük sarı-opak koloniler *S. aureus* olarak sayılır. Mannitol *S. aureus*'un gelişimini desteklerken, aynı zamanda koloni etrafında fenol kırmızısı ile belirlenen sarı zon oluşumunu sağlar (Arda, 2000).

2.5. Çözeltiler ve Hazırlanması

%3 NaCl ile doyurulmuş fenol çözeltisinin hazırlanması: 20 ml distile su içerisine 3 g NaCl ve 100 g fenol eklenerek 45 °C'deki su banyosunda çözdürüp oda sıcaklığında bırakılmıştı.

RNaz A çözeltisi: 0.05 M sodyum asetat 5 ml distile su içerisinde karıştırılıp üzerine 5 mg RNaz A eklenmiştir. Kaynayan suda 5 dak. bekletme işleminden sonra - 20 derecede saklanmıştır.

Kristal Violet stok solüsyonu

Kristal violet	:1.0 gr
Etanol	:% 95
dH2O	:100ml

Bazik Fuksin stok solüsyonu

Bazik fuksin	:3.0 gr
Etanol	:%95
dH2O	:100 ml

Lügol

İyot	:1.0 gr
Potasyum iyodür	:2.0 gr
Sodyum karbonat	:%5 60.0 ml
dH2O	:140.0 ml

Metilen Mavisi

Metilen mavisi	: 0.3 gr
Etil alkol	: 30.0 ml
dH2O	: 100 ml'ye tamamlanır.

Sakkaroz çözeltisi

Tris	: 0.7 g
EDTA	: 0.05 g
Sakkaroz	: 6.5 g
Destile su	: 100 ml
pH 8.0± 0.02	

SDS çözeltisi

Tris	: 0.6 g
EDTA	: 0.8 g
SDS	: 20 g
Destile su	: 100 ml
pH 8.0± 0.02	

Lizozim çözeltisi

Tris	: 0.3 g
Lizozim	: 0.1 g
Destile su	: 10 ml
pH 8.0± 0.02	

Tris-EDTA-1

Tris	: 0.6 g
EDTA	: 9.5 g
Destile su	: 100 ml
pH 8.0± 0.02	

Tris-EDTA-2

Tris	: 0.15 g
EDTA	: 0.4 g
Destile su pH 7.5± 0.02	: 100 ml

Tris-HCl

Tris-HCl	: 31 g
Destile su pH 7.0± 0.02	: 100 ml

2.6. *S. aureus* ve *P. aeruginosa* Bakterilerinin İzolasyonu

Laboratuvara getirilen süt örnekleri 5'er ml tartılıp 5 ml fizyolojik su içerisinde 3500 devir/dak. 2 dak. santrifüj edilmiştir. 1 ml alınan süpernatant kısmından 10000 devir/dak. 30 sn santrifüj edilerek oluşan süpernatant kısmından 1 ml alınmış ve 10000 devir/dak. 15 dak. santrifüjlenmiştir. Süre sonunda tüp içerisinde kalan çökelti 1 ml fizyolojik su ile çözülerek 10^{-5} 'e kadar seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan dilüsyonlardan mastitis kökeni bakterilerin izolasyonu için nütrient agar ve kanlı agara ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petriyerler 42 °C ve 37 °C'de inkübasyon edilmiştir. Bu işlemin sonunda oluşan ve mastitis etkeni kolonisi olduğu düşünülen koloniler alınıp stoklanmak üzere besi ortamında aktif hale getirilmiştir (Mandel vd., 1970).

2.7. *S. aureus* ve *P. aeruginosa* Bakterilerinin Ön Tanımlanması

Mastitis etkeni bakterilerin süt örneklerinden tanımlanmasında izolatların morfolojik (kok, çubuk gibi), katalaz ve kültürel özelliklerine (koloni morfolojisi, gram boyama) bakılarak ön tanımlama yapılmıştır.

2.7.1. Koloni morfolojisi

İnkübasyon işleminden sonra petriyerlerdeki koloniler görünüşlerine, kokularına, renklerine ve şekillerine bakılarak değerlendirme yapılmıştır.

2.7.2. Gram boyama

İzolatlara ve kontrol suşu olarak kullanılan *S. aureus* ATCC 25923 bakterilerinin 24 saatlik kültürlerine gram boyama işlemi uygulanmıştır. Gram – pozitif çubuk ve kok şeklinli bakterilere biyokimyasal testler uygulanmıştır. Gram – negatif izolatlar ise çalışma kapsamında çıkarılmıştır.

2.7.3. Katalaz testi

İzolatların Nütrient agar'da geliştirilerek 1 ml % 3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) aktarılmıştır. Gaz kabarcıklarının görülmesi pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir. (Hammes ve Vogel, 1995). Testte pozitif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 25923 kültürü kullanılmıştır.

2.8. Moleküler Biyoloji Metotları

S. aureus ve *P. aeruginosa*'ların moleküler olarak tanımlanması, için kullanılacak primerlerin belirlenmesi kromozomal (Genomik) DNA izolasyonu, polimeraz reaksiyonu (PCR) işlemi, ve plazmit DNA izolasyonunu kapsamaktadır.

2.8.1. Oligonükleotit primerler

İzole edilen şüpheli *S. aureus*'lar için *Nuc* geni ve *P. aeruginosa*'lar için ise *algD* (*vic*) genlerinin primer dizilimleri (5'→3') ve bant uzunlukları Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2. 2. *algD* (*vic*) ve *Nuc* gen bölgesinin tanımlanması için kullanılan primer nükleotidleri (Wilson vd., 1999; da Silvo vd., 1999)

Gen	Primer Adı	Dizilim (5'→3')	Uzunluk (bp)
<i>algD</i> (<i>Vic</i>)	Forward	TTCCCTCGCAGAGAAAACATC	520
	Reverse	CCTGGTTGATCAGGTCGATCT	
<i>Nuc</i>	Forward	GCGATTGATGGTGATAACGGTT	267
	Reverse	AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	

2.8.2. Kromozomal DNA İzolasyonu

Çalışma boyunca kullanılan 99 mastitis etkeni şüpheli suşları ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 standart suşu nütrient broth besiyerinde 37 °C'de 48 saat aktifleştirilmiştir. Daha sonra ependorf tüplerine her örnekten 1.5 ml alınmıştır ve 5 dak. 13.000 rpm'de santrifüj işlemi yapıp süpernatant kısmı başka bir yere aktarılmıştır. Elde edilen pelletlerin genomik DNA izolasyonlarını Vivantis Genomik DNA İzolasyon Kiti ile yapılmıştır. İzolasyonu yapılan DNA daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

2.8.3. Polimeraz zincir reaksiyonu

PCR (*algD* ve *Nuc* gen)

PCR işlemi toplam 25 µl içerisinde yapılmıştır. 10 µl dH₂O, 1'şer µl ileri ve geri primerlerden, 5 µl PCR buffer (10X), 2.5 µl dNTP (10 mM), 0.5 µl MgCl₂ (25 mM), 0.5 µl TaqDNA polimeraz (5 U/ml) ve 4.5 µl DNA karıştırılarak hazırlanmıştır. dH₂O'da çözdürülen koloniden 3 µl alınarak kullanılmıştır.

Çalışmamızda kullandığımız primerler ticari firmalardan temin edilmiştir (Sentagen, İstanbul). PCR işlemi 94 °C'de 3 dak. İlk ayrıştırma ile başlatılmış daha

sonra 37 döngü olmak üzere 94 °C'de 1 dak. denatürasyon, primerler için uygun yapışma sıcaklığı 55 °C'de 30 sn. ve 72 °C'de 1.5 dk. Uygun sentez zamanı boyunca gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri % 1'lik jel hazırlanarak, elektroforeze yüklenmiş PCR ile çoğaltılan bölgeler UV ışığı altında gözlenmiş ve fotoğrafları alınmıştır

2.8.4. Plazmit DNA İzolasyonu

Çalışmada toplanan süt örneklerinden izolasyonu yapılan, kimyasal ve moleküler yöntemlerle tanımlanan suşların plazmit DNA izolasyonları yapılmıştır. Bu amaçla, manuel plazmit DNA izolasyon ve hazır kit ile izolasyonu metotları farklı ve ayrı zamanlarda uygulanmıştır.

2.8.4.1. Hazır kit kullanılarak yapılan plazmit DNA izolasyonu

Plazmit DNA İzolasyonu; Favorgen Plasmid DNA Extraction Mini Kiti kullanarak firmanın (FAVORGEN) verdiği prosedüre lizozim eklenerek modifiye edilmiş ve gerçekleştirilmiştir. Bunun için nütrient besi ortamında bir gece inkübasyona bırakılmış bakteri kültürü kullanılmıştır. Gelişmiş olan bakteri kültüründen 1 ml tüplere alınarak, 3500 devir/dak. 15 dak. Santrifüj edilmiş ve bakteri hücreleri çöktürülüp süpernatant dökülür, pelette 1ml steril distile su eklenip vortekslenerek 2 dk da 10000 rpm'de santrifüjlenir ve üstte kalan sıvı kısmı birbirinden ayrılmıştır, bu işlem 2 kez tekrarlanır. Elde edilen peletin üzerine 200 µl lizozim (8 mg/ml) konsantrasyonu ilave edilerek karıştırılır ve 37 °C 30 dak. su banyosunda lizozim inkübasyonu sağlanmıştır. Daha sonraki işlemler ise üretici firmanın protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Elde edilen potansiyel plazmit DNA' ları jelde görüntülenir, fazla kalan kısımda sonraki çalışmalarda kullanılmak için -20 °C'de muhafaza edilir.

2.8.4.2. Geleneksel plazmit DNA İzolasyonu

Mastitis etkeni bakterilerin suş kültürleri nütrient broth besi ortamında 37 °C'de 24 saat geliştirilip, 5 ml'lik nütrient broth ortamlarına birer ml inokülasyonlar yapılmış ve alınan tüpler 30 °C'de 3 saat inkübe edilmiştir. Bakteriler kültürleri sonra santrifüj tüplerine alınıp, 8000 devirde 10 dak. santrifüj işlemi yapılmıştır. Tüplerdeki hücre çökeltisi kurutulduktan sonra 380 µl sükröz tamponunda çözülmüştür. 37 °C'ye kadar ısıtılan bu ortama 100 µl lizozim ilave edilmiş ve su banyosunda 37 °C'de 5 dak. bekletilmiştir. 50 µl Tris-EDTA-1 uygulaması yapıldıktan sonra, tüplere 30 µl % 20 SDS çözeltisinden ilave edilerek karıştırılmıştır. Son aşamada santrifüj tüpleri 37 °C su

banyosunda 10 dak. süre ile bırakılmış lizinin tamamlanması sağlanmıştır. Oluşan kültürlerle yeni hazırlanmış 30 µl 3 N NaOH çözeltisinden ilave edilmiş ve düz bir zemin üzerinde tüpler 10 dak. Süre ile yavaşça çevrilerek kromozomal DNA'nın alkali denatürasyon koşulları sağlanmıştır. Denatürasyon aşamasının sonunda santrifüj tüplerine 50 µl Tris-HCl çözeltisi eklenerek, 3 dak. süre ile yine düz bir zeminde hafifçe karıştırılmıştır. Tüplere, %3 NaCl ile doyurulmuş fenol çözeltisinden 0.8 ml ve 4 °C'de tutulan 5 M NaCl çözeltisinden 70 µl aktarılarak, 4 °C'de 10 dak. 13000 devirde santrifüj işlemi yapılmıştır. Mikropipetlerle tüplerde oluşan üst faz alınıp yeni tüplere aktarılmış ve 0.8 ml kloroform/izoamilalkol (24:1) çözeltisi ilave edilmiştir. Elde edilen bu karışıma 4°C'de 20000 rpm'de 10 dak. santrifüj işlemi uygulanmış, tekrar elde edilen üst faz yeni tüplere alınmış ve aynı hacimde soğuk etanol eklenmiştir. Etanol aktarılan tüpler -20 °C'de bir gece bırakıldıktan sonra, 10 dak. 20000 rpm'de santrifüjlenerek plazmit DNA çöktürülmüş ve sıvı faz uzaklaştırılarak çökeltiler kurutulmuştur. Kurutulan çökeltiler 20 µl Tris-EDTA-2 içerisinde çözülmüş ve RNaz A stok çözeltisinden 2 µl ilave edilerek su banyosunda 37 °C'de 45-50 dak. inkübasyonu sağlanmıştır (Anderson ve McKay, 1983).

2.8.5. DNA'nın jel elektroforezi

PCR ürünleri için agaroz jel hazırlamak üzere; %1 oranında agaroz, 1X TBE tamponu içerisinde homojen olarak karıştırılıp eritilmiş ve elektroforez tabağına dökülmüştür. Analiz edilecek örnekler uygun dilüsyonlarından genellikle 4 µl alınarak, 1 µl yükleme tamponu (%0.25 bromfenol mavisi; %40 sukroz; 100 mM EDTA; pH 8.0) ile karıştırılmıştır. Bu şekilde örnekler jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir. DNA kontrolü olarak uygun boyutlardaki DNA referansı; λ DNA 1000 baz çiftlik veya 100 baz çiftlik DNA markörleri (Favorgen) kullanılmıştır. Elektroforez tankında 500 mA ve jel 80 V altında koşturulmuştur. DNA örnekleri UV ışığı (312 nm) altında görüntülenmiş ve fotoğrafları alınmıştır.

Plazmit DNA ürünleri için agaroz jel hazırlamak üzere; % 1 oranında agaroz, 1X TBE tamponu içerisinde eritilmiş ve elektroforez tabağına aktarılmıştır. Örneklerin analiz için uygun dülüsyonlarından genellikle 4 µl alınarak, 1 µl yükleme tamponu ile karıştırılmıştır. Bu şekilde örnekler jele yüklenmiştir. DNA kontrolü olarak uygun boyutlardaki DNA referansı; λ DNA 1000 baz çiftlik DNA markörleri (Favorgen)

kullanılmıştır. Elektroforez tankında, jel 25-50 V ve 500 mA altında koşturulmuştur. DNA örnekleri UV ışığı (312 nm) altında görüntülenmiş ve fotoğraflanmıştır.

2.9. İzolatların Stoklanması

Bakteri suşları kısa süreli stoklar için %15'lik gliserol çözeltisi içerisine alınarak – 20 °C'de muhafaza edilmiştir. Daha uzun süreli saklama için ise, besiyerinde 16 saat geliştirilen bakterilerden 200 µl alınarak 3 dak. 12.000 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant kısmının uzaklaştırılması ve peletlerin %30 gliserol içeren nütrient broth besi ortamında çözdürüp, şok soğutma ile -80 °C'de gerçekleştirilmiştir.

2.10. İzolatların Antibiyotiklere Karşı Direnç Özelliklerinin Belirlenmesi

Çalışmada kullandığımız antibiyotikler Oxoid'den alınmıştır. Kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları Çizelge 2.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 2. 3. Kullanılan Antibiyotikler ve Konsantrasyonları

Antibiyotik	Konsantrasyon (µg)
Eritromisin	15
Siproflaksasin	5
Penisilin	10
Gentamisin	10
Seftazidim	30
Kloramfenikol	30
Piperasilin	100
Trimetoprim	5
Kanamisin	30

2.10.1. Disk difüzyon metodu

Çalışmada toplanan süt örneklerinden izolasyonu yapılan, kimyasal ve moleküler yöntemlerle tanımlanan *S. aureus* suşları ve standart (*S. aureus* ATCC 25923) suşun antibiyotik direnç özellikleri disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Bu amaçla eritromisin, kanamisin, penisillin, kloramfenikol, gentamisin, piperasilin, seftazidimi siproflaksasin ve trimetoprim antibiyotiklerine karşı direnç veya duyarlılık özellikleri araştırılmıştır. Bu çalışmada kullanılan ve 4 °C'de muhafaza edilen *S. aureus* suşları sıvı nütrient besiyerine aşılansak 37 °C de 24 saat süre ile aktifleştirmek için inkübasyona bırakılmıştır. Deney tüplerinde sterilize edilen ve 45 °C-50 °C ye kadar soğutulan nütrient agarda aktivleştirilmiş izolatlarla hazırlanan 24 saatlik (0.1 ml de 10⁸ adet/ml) kültür ile yapılmıştır (Anonymous, 1999). Deney tüplerine ekim sağlandıktan

sonra iyi bir biçimde karıştırılıp 9.0 cm çapındaki steril petrilere 15'er ml aktarılmış ve besiyerinin eşit bir şekilde petri kutusu içinde dağılması sağlanmıştır (Collins vd., 1989). Katılaşılan besiyerleri üzerine antibiyotik diskler uygun mesafelerle yerleştirilmiştir. Ekimi yapılan plaklar ön inkübasyon için 4 °C'de 2 saat bekletilmiştir. Daha sonra 37 °C'de 24 saat süre ile inkübasyonu sağlanmıştır. Son aşamada ise oluşan inhibisyon zonları mm cinsinde ölçümleri sağlanmıştır.

3. BULGULAR ve TARTIŞMA

3.1. Mastitis Etkeni Bakterilerinin İzolasyonu ve Tanımlanması

Mastitis hayvan sağlığında olduğu kadar insan sağlığında da önemli sorunlara yol açabilmektedir. Hayvan sağlığında fonksiyonel meme lobundaki kayıplar, süt veriminde azalma ve ölümlere neden olmaktadır. İnsan sağlığını ise düşük kalitede süt/süt ürünleri ve sütte antibiyotik kalıntılarıyla olumsuz olarak etkilemektedir. Bu mikrobiyal faktörler içerisinde çevresel mastitis etkeni olan *S. aureus* ve diğer mastitis etkeni olan *P. aeruginosa* ise gerek çok fazla araştırılmaması gerekse de antibiyotiklere oluşturduğu direnç açısından önemli bir yer tutmaktadır.

Çalışmanın bu kısmında Muş'un farklı köylerinden geleneksel yöntemlerle elde edilen 88 süt örneğinden 99 bakteri izolasyonu yapılmış ve daha sonraki yapılacak olan çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır. Süt örneklerinin toplandığı yerler ve izole edilen suşlar ile ilgili bilgiler Çizelge 3.1 'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Muş ilinin farklı bölgelerden toplanan süt örneklerinden elde edilen İzolat sayıları

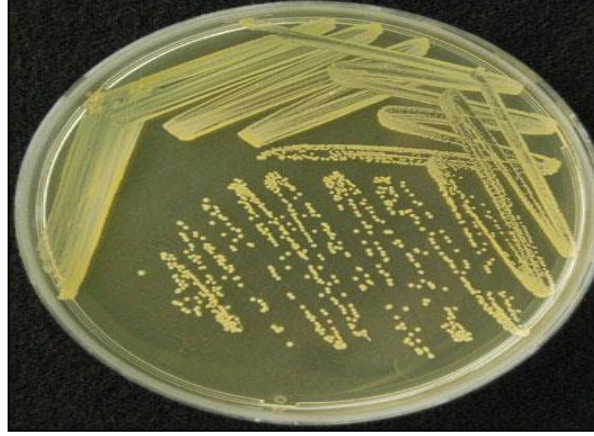
Alındığı yer	Süt	İzolat	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Güzeltepe Köyü	18	20	2	-
Tekyol Köyü	10	11	1	-
Çöğürlü Köyü	15	17	2	-
Bağlar Köyü	10	12	3	-
Sayan Köyü	8	8	2	-
Korkut/ Oğul Köyü	9	10	3	-
Merkez/ Tandoğan Köyü	6	8	1	-
Varto/ Oğlalcık Köyü	4	4	2	-
Muş/Karaağaçlı Beldesi	8	9	3	-
Toplam	88	99	19	-

Aynı süt örneğinden birden fazla mikroorganizma elde edilmiş. Bunlardan sadece bir koloni alınarak stoklanmıştır.

3.1.1. İzolatların Morfolojik ve Biyokimyasal Olarak Tanımlanması

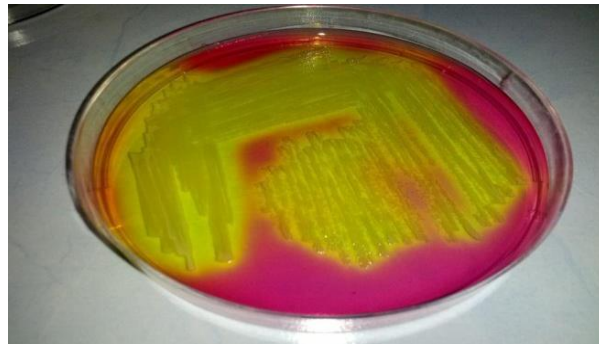
Saf kültür olarak elde edilen mastitis etkeni bakteri izolatlarının, biyokimyasal metodlarla tanımlanmasında, gram boyama reaksiyonu, mikroskopik morfoloji ve katalaz aktivitesini gözlenmiştir. *P. aeruginosa* bakterilerinin Gram negatif, katalaz pozitif ve mikroskopik görüntülerine bakıldığında çubuuk şeklinde oldukları görülmüştür. *S. aureus* suşlarının ise Gram pozitif, katalaz pozitif ve mikroskop ile bakıldığında üzüm salkımı şeklinde olduğu belirlenmiştir. Bakterilerinin izolasyonu

yapıldıktan sonra, petrilerde koloni görünüşleri İnoküle edilen nütrient agar petrilerine ve 48 saat inkübe edildikten sonra elde edilen koloni görüntüleri şekil 3.1’de gösterilmiştir.



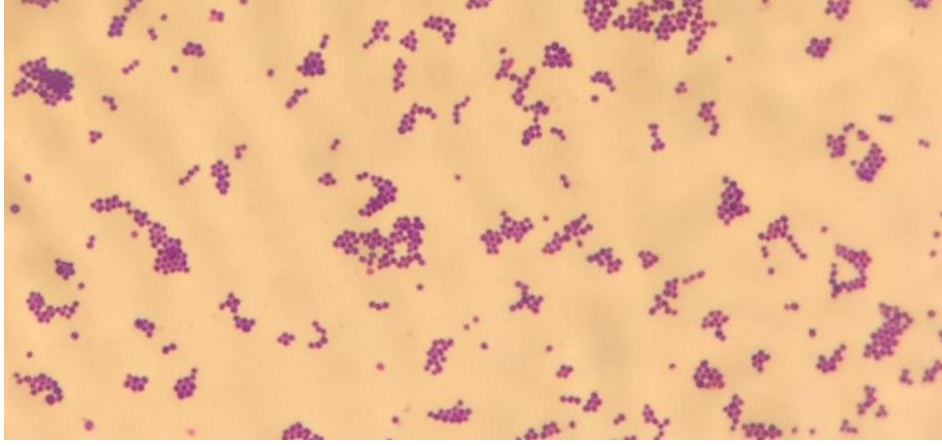
Şekil 3.1. *S. aureus* suşlarının nütrient agarda koloni görüntüleri

Mannitol salt agar yapılan standart mikrobiyolojik analizlerde *S. aureus* belirlenmesi ve sayımı için selektif katı besiyeri olarak kullanılmıştır. Besiyeri bileşimindeki yüksek tuz konsantrasyonu refakatçi floranın gelişimini baskılar. Mannitol *S. aureus* 'un gelişimini desteklerken, aynı zamanda koloni etrafında fenol red ile belirlenen sarı zon oluşumunu sağlar. Standart yayma yöntemi ile ekim ve 35-37 °C'de 3 güne kadar yapılan inkübasyon sonunda parlak kırmızı besiyerinde gelişen ve etrafı sarı zon ile çevrili büyük parlak sarı-opak koloniler *S. aureus* olarak sayılır. *S. aureus* suşlarının mannitol salt agar gelişimi şekil 3.2’de gösterilmiştir.



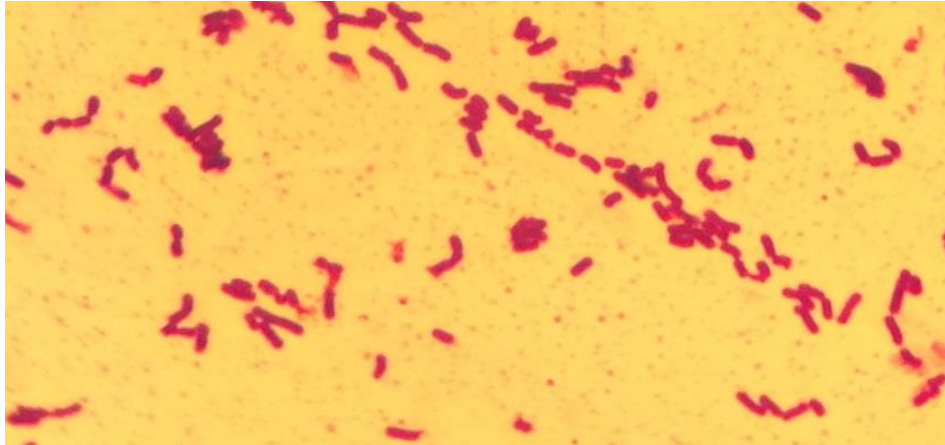
Şekil 3.2. *S. aureus* suşlarının mannitol salt agarda gelişimi

Süt örneklerinden İzole edilen bakterilerin gram boyama sonucunda şüpheli *S. aureus* suşlarının gram pozitif olduğu belirlenmiştir. İzolasyonu yapılan *S. aureus* suşlardan gram boyama da elde edilen mikroskopik görüntüsü şekil 3.3’de verilmiştir.



Şekil 3.3. *S. aureus* suşlarının ışık mikroskopunda koloni görünüşleri.

Mastitis kökenli *S. aureus* ve *P. aeruginosa* bakterilerinin oksidatif stres sonucu oluşan oksijen türevlerinden hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşturmakta, hidrojen peroksiti oksijen ve H_2O 'yu parçalayabilmekte Mastitis kökenli *S. aureus* ve *P. aeruginosa* bakterilerinin tanımlanmasında basit bir yöntem olan katalaz özelliği kullanılmaktadır. Çalışmada kullanılan izolatların morfolojik incelenmesiden sonra katalaz testi yapılmıştır ve 62 izolatın katalaz pozitif geriye kalan 37 suşun ise katalaz reaksiyonlarının negatif olduğu gözlenmiştir. İzolasyonu yapılan *P. aeruginosa* suşlardan gram boyama da elde edilen mikroskobik görüntüsü şekil 3.4'de verilmiştir.



Şekil 3. 4. *P. aeruginosa* suşlarının ışık mikroskopunda görünüşleri.

Mastitis kökenli *S. aureus* ve *P. aeruginosa* bakterilerinin tanımlanmasında geleneksel sınıflandırmanın temeli, morfolojik, fizyolojik ve farklı sıcaklıklarda, pH değerlerinde, arjinin degradasyonu ve karbonhidrat katabolizması gibi

metabolik/biyokimyasal özellikleri tuz yoğunluklarında araştırılmasını içeren fenotipik metodlara dayanmaktadır (Gobbetti vd., 2005).

Bu çalışmada, suşların mikroskobik özelliklerine bakıldığında, 33 bakterinin basil diğer 66 suşunda kok şeklinde olduğu gözlenmiştir. Suşların biyokimyasal özellikleri incelendiğinde mastitis etkeni olan Stafilokoklara ait özellikleri gösteren 27 suşun Gram pozitif, katalaz pozitif ve kok şeklinde olduğu gözlemlenmiştir. *Pseudomonas* ait özellikleri gösteren 22 bakterinin de Gram negatif, katalaz pozitif ve çubuk şeklinde olduğu belirlenmiştir. Suşların biyokimyasal özellikleri araştırıldığında, elde edilen sonuçlar Çizelge 3.2.de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Bakterilerinin morfolojik ve biyokimyasal sonuçları

İzolatlar	Gram Reaksiyonu	Katalaz Testi	Mikroskobik Fenotip	
			Basil	Kok
NAG1	-	+		+
NAG 2	+	+		+
NAG 3	-	+	+	
NAG 4	+	+		+
NAG 5	-	+		+
NAG 6	-	+		+
NAG 7	-	+	+	
NAG 8	+	-		+
NAG 9	-	+	+	
NAG 10	+	-		+
NAG 11	-	+		+
NAG 12	-	+	+	
NAG 13	-	+	+	
NAG 14	+	+		+
NAG 15	+	-		+
NAG 16	+	+	+	
NAG 17	-	+		+
NAG 18	-	+	+	
NAG 19	+	+		+
NAG 20	+	-		+
NAT1	+	-		+
NAT 2	+	+		+
NAT 3	-	+	+	
NAT 4	-	+		+
NAT5	+	-		+
NAT6	+	+		+
NAT7	+	-	+	
NAT8	+	-	+	
NAT9	+	-		+
NAT10	+	+		+
NAT11	-	+	+	
NAÇ1	+	-		+
NAÇ2	+	+		+

Çizelge 3.2'in devamı

İzolatlar	Gram Reaksiyonu	Katalaz Testi	Mikroskopik Fenotip	
			Basil	Kok
NAÇ3	+	+	+	
NAÇ4	-	+	+	
NAÇ5	+	+		+
NAÇ6	+	-		+
NAÇ7	+	+		+
NAÇ8	+	-	+	
NAÇ9	-	+	+	
NAÇ10	+	+		+
NAÇ11	+	-		+
NAÇ12	+	+		+
NAÇ13	+	-		+
NAÇ14	+	-		+
NAÇ15	+	+		+
NAÇ16	+	+	+	
NAÇ17	-	+	+	
NAB1	+	+		+
NAB2	+	-		+
NAB3	+	-		+
NAB4	+	+	+	
NAB5	-	+	+	
NAB6	+	+		+
NAB7	+	-		+
NAB8	+	-	+	
NAB9	-	+	+	
NAB10	+	+		+
NAB11	+	-		+
NAB12	+	-		+
NAS1	+	+		+
NAS2	-	+	+	
NAS3	+	+	+	
NAS4	+	+		+
NAS5	+	-		+
NAS6	+	+		+
NAS7	+	-		+
NAS8	-	+	+	
NAKO1	+	+		+
NAKO2	-	+	+	
NAKO3	+	+	+	
NAKO4	+	-		+
NAKO5	+	+		+
NAKO6	+	-		+
NAKO7	-	+	+	
NAKO8	+	+		+
NAKO9	+	-		+
NAKO10	-	+	+	
NAMT 1	+	-		+
NAMT2	+	+		+
NAMT3	+	-		+

Çizelge 3.2'in devamı

İzolatlar	Gram Reaksiyonu	Katalaz Testi	Mikroskopik Fenotip	
			Basil	Kok
NAMT4	-	+	+	
NAMT5	+	-		+
NAMT6	-	+	+	
NAMT7	+	-		+
NAMT8	+	-		+
NAVO1	+	+		+
NAVO2	-	+	+	
NAVO3	+	-		+
NAVO4	+	+		+
NAMK1	+	-		+
NAMK2	+	-		+
NAMK3	+	+		+
NAMK4	+	-		+
NAMK5	-	+	+	
NAMK6	+	-	+	
NAMK7	+	+		+
NAMK8	+	-		+
NAMK9	+	+		+

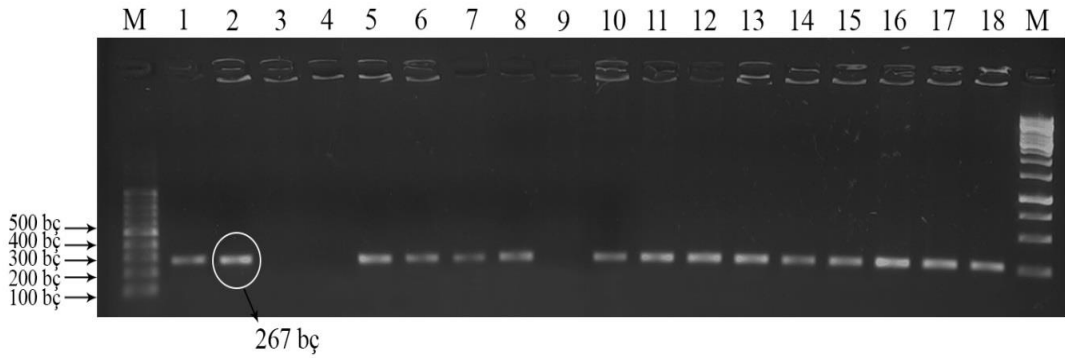
3.1.2. İzolatların *algD* ve *Nuc* gen bölgelerinin PCR ile çoğaltılması

Mastitis kökenli *S. aureus* ve *P. aeruginosa* bakterilerinin tanımlanması ve karakterizasyonu bilimsel ve endüstriyel açıdan önem taşımaktadır. Mastitis kökenli bakterilerin tanımlanabilmesi için bunların morfolojik ve biyokimyasal özellikleri ile faj tiplerinin ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesini ve serolojik olarak tiplendirilmelerini ile yapılabilmektedir. Klasik metodlarla birlikte son yıllarda önem kazanan PCR, DNA dizilim analizi, Pulsed Field Jel Elektrofrezisi, Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi, Çoğaltılmış rDNA 'nın Restriksiyon Analizi, Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi gibi moleküler biyoloji tekniklerinden de faydalandığı bildirilmiştir (Busch ve Nitschko, 1999).

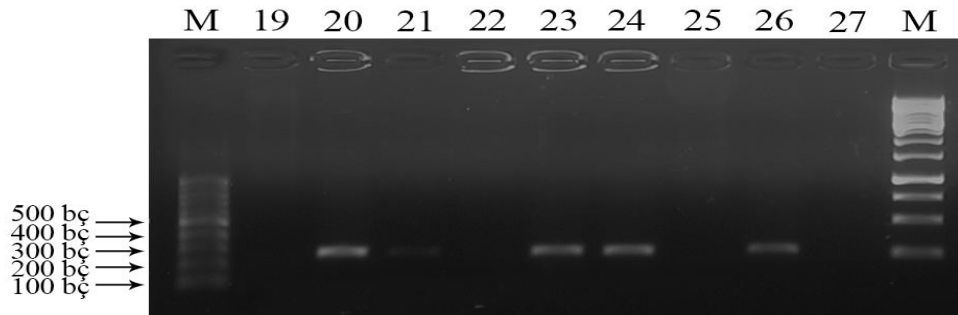
Çalışmada izolatların; morfolojilerine, gram boyama reaksiyon özellikleri ve katalaz testleri yapılan ve *Staphylococcus* ve *Pseudomonas* olduğu tespit edilen şüpheli 31 izolatın nütrient agar petrilere ekimi yapılmıştır. Moleküler yöntemlerle tanımlama yapılması için petrilere alınan tek *Staphylococcus* kolonilerinin *Nuc* geninin varlığını tespit etmek amacıyla *NucF-NucR* primerleri ve *VicF-VicR* primerleri ise *Pseudomonas* kolonilerinde *algD* gen varlığını tespit etmek amacıyla kullanılmıştır. Kullanılan primerler Çizelge 2.2'de verilmiştir.

S. aureus için *Nuc* gen bölgesi PCR ile çoğaltacak şekilde Primer çiftleri (*NucF* - *NucR*) sentezletirilmiştir. *S. aureus* türlerinde PCR reaksiyonunda 267 bç uzunluğundaki bölgenin çoğaltılması hedeflenmiştir. PCR çalışma şartlarında çoğaltılan PCR ürünleri %1 lik agaroz jelde görüntülenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 27 şüpheli izolattan 19 tanesinin 267 bç bölgesinde bant verdiği tespit edilmiştir.

P. aeruginosa için *algD* gen bölgesi PCR ile çoğaltacak şekilde Primer çiftleri (*Vic1F*-*Vic1R*) sentezletirilmiştir. *P. aeruginosa* türlerinde PCR reaksiyonunda 520 bç uzunluğundaki bölgenin çoğaltılması hedeflenmiştir. PCR çalışma şartlarında çoğaltılan PCR ürünleri %1 lik agaroz jelde yürütüldüğünde istenilen bölgede hiçbir bant varlığı tespit edilmemiştir. Bu doğrultuda biyokimyasal ve morfolojik olarak *Pseudomonas* olduğu düşünülen şüpheli suşların *algD* gen bölgeleri ile ilgili çalışma sonucunda *P. aeruginosa*'ya ait gen bölgesi varlığı tespit edilmemiştir.



Şekil 3.5. *S. aureus* bakterilerinin PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: 100 bç DNA standardı. 1; *S. aureus* ATCC 25923



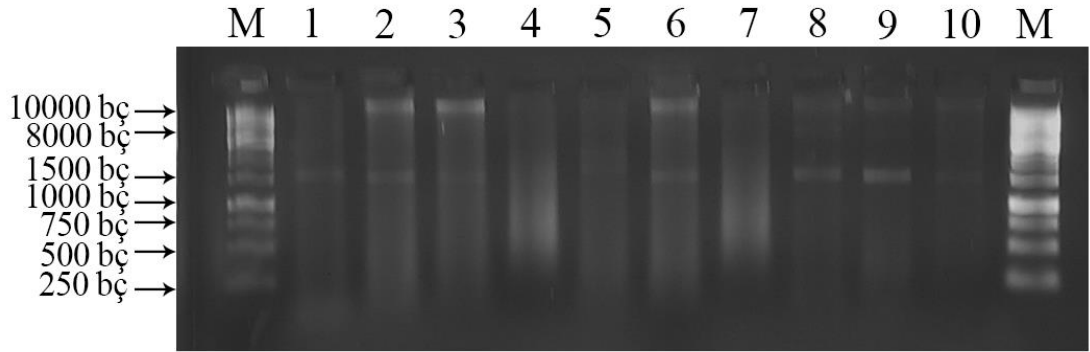
Şekil 3. 6. *S. aureus* bakterilerinin PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: 100 bç DNA standardı

3.2. Plazmit İzolasyonu ve Antibiyotik Direnç Özellikleri

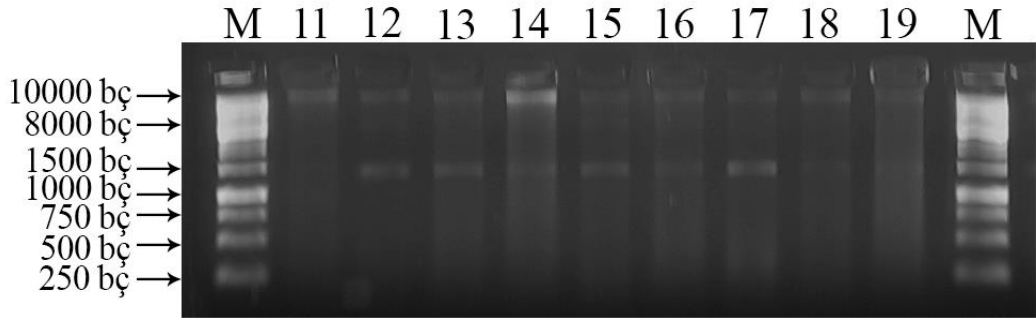
3.2.1 İzolatlarından plazmit izolasyonu

Plazmitler, çoğu bakteri türünde bulunan ama her suşta bulunmayan halkasal ve ya süper sarmallı DNA molekülleridir. Birçok bakteride plazmit hücreler arası gen transferinden sorumludur. Plazmitler glikoliz, amino asit metabolizması, yağ asidi sentezi, disakkaritlerin yıkılması, bakteriyosin sentezi gibi görevlerde bulunabilmektedir. Plazmitler farklı (3-60 kbç) büyüklükte olabilmekte ve büyüklüğüne bağlı olarak birkaç proteinden yüzlerce proteine kadar değişen sayıda proteini kodlayabilmektedirler (Aslım ve Beyatlı, 2004).

Çalışmanın bu bölümünde izole edilen 19 adet *S. aureus*'dan izole edilen plazmitler sayı, büyüklük ve direnç özellikleri açısından incelenmiştir. Plazmit DNA izolasyonu materyal ve metot bölümünde belirtildiği gibi hazır kit ve manuel geleneksel yöntemleri kullanılarak yapılmıştır. İzolatların içerdikleri plazmitler sayısal olarak değerlendirildiğinde 1-3 arasında plazmit içerdiği tespit edilmiştir.



Şekil 3.7. Doğal sütlerden izole edilen *S. aureus* (1-10 nolu izolatlar) bakterilerinin plazmit DNA izolasyonu sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: 1 kbç DNA standardı



Şekil 3.8. Doğal sütlerden izole edilen *S. aureus* (11-19 nolu izolatlar) bakterilerinin plazmit DNA izolasyonu sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: 1 kbç DNA standardı

Çizelge 3.3. Doğal sütlerden izole edilen *S. aureus* suşlarının plazmit içerikleri

İzolatlar	Plazmit Sayısı	Plazmit Büyüklüğü (bç)
1	1	1500
2	2	≥10000, 1500
3	2	≥10000, 1500
4	0	-
5	0	-
6	2	≥10000, 1500
7	0	-
8	3	≥10000, 8000, 1500
9	2	≥10000, 1500
10	2	≥10000, 1500
11	1	≥10000
12	2	≥10000, 1500
13	2	≥10000, 1500
14	2	≥10000, 1500
15	3	≥10000, 8000, 1500
16	2	≥10000, 1500
17	2	≥10000, 1500
18	2	≥10000, 1500
19	1	≥10000

S. aureus suşlarından izole edilen plazmit sayıları 1 ila 3 arasında değişmektedir. Plazmitler büyüklükleri yönünden değerlendirildiğinde, en büyük plazmitin yaklaşık 10000 bç'nin üzerinde olduğu belirlenmiştir. *S. aureus* izolatlarında toplam 3 (1,11 ve 19) tanesinde tek plazmit var iken 4, 5, ve 7 nolu izolatlarda ise hiçbir plazmit varlığı tespit edilmemiştir. *S. aureus* 8 ve 15 nolu izolatında ≥10000, 8000 ve 1500 bç büyüklüğünde 3 adet plazmit içerdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.3).

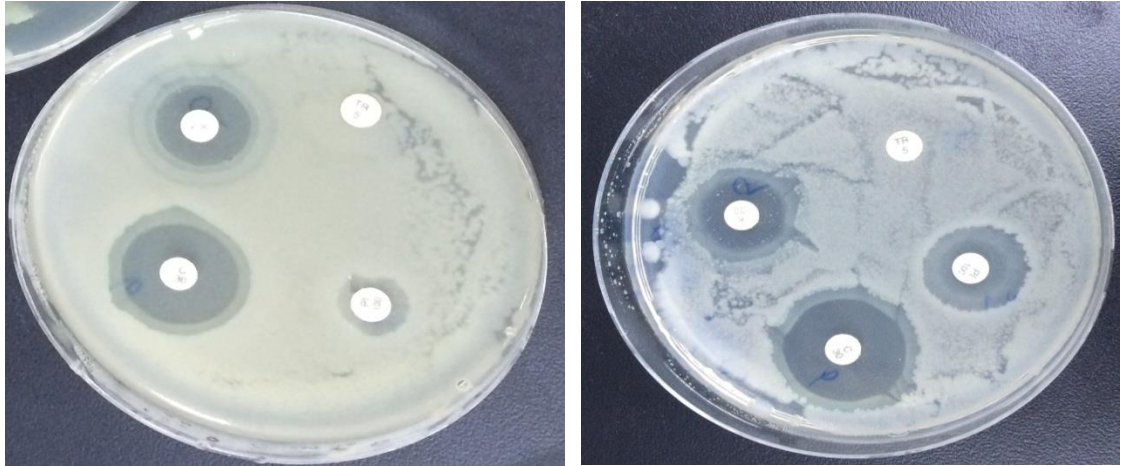
S. aureus izolatlarından 3 suşun tek plazmit içermesi ve 3 tanesinin hiç plazmit içermemesi, bu izolatların doğal koşullarda değişik plazmitlerini kaybetmiş olması veya doğal kültürlerden plazmit almış ticari kültürler olması ile açıklanabilir. Sahip olduğu plazmiti kaybetmiş olan izolatlar bu plazmitleri tekrar geri kazanması zordur (Leewatcharamas vd., 1997). Dolayısıyla tek plazmit içeren izolatların yalnızca ticari kültürlerden oluşamayacağı görüşünü desteklemektedir. Ayrıca plazmitlerin taşıdıkları transpozonlar diğer plazmitlerin geçişini sınırlayabilir (Romero ve Klaenhammer, 1990).

3.2.2. İzolatların antibiyotik direnç özellikleri

Süt hayvanlarında sıklıkla subklinik mastitise neden olan *S. aureus* süt ve süt ürünlerinde kontaminasyonlara neden olmaktadır. Gıda kaynaklı hastalıklar arasında bu durum dünyada üçüncü sırada rapor edilmiştir (Rudholm, 2002). *S. aureus* hastane

kaynaklı enfeksiyonların en önemli etkenlerindendir. Etken hızla çoklu antibiyotik direnci kazanarak toplumsal enfeksiyonlara neden olur. Bu özelliği nedeniyle *S. aureus* halk sağlığı açısından önemli rol oynamaktadır (Eyraud vd., 2014). Bu çalışmada, *S. aureus* suşlarının antibiyotiklere karşı direnç oranları araştırılmıştır.

Çalışmanın bu kısmında izole edilen bakterilerin Eritromisin (15µg), Siproflaksasin (5 µg), Penisillin (10µg), Gentamisin (10µg), Seftazidim (30µg), Kloramfenikol (30µg), Piperasillin (100µg), Trimetoprim (5µg) ve Kanamisin (30µg), gibi 9 farklı antibiyotiğe karşı göstermiş olduğu direnç-duyarlılık sonuçları belirlenmiştir. Antibiyotiğe karşı direnç özelliği her bir izolat için 2.9.1’de anlatıldığı gibi belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar çizelge 3.3’de verilmiştir.



Şekil 3 9. *S. aureus* suşlarının antibiyotik direnç özelliklerinin disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesi sonucu elde edilen zon görüntüleri

Çizelge 3. 4. Doğal sütlerden izole edilen *S. aureus* suşların antibiyotik dirençlilikleri

İzolatlar	Eritromisin	Siproflaksasin	Penisillin	Gentamisin	Seftazidim	Kloramfenikol	Piperasillin	Trimetoprim	Kanamisin
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	32*	26	R	14	R	30	14	R	18
<i>S. aureus</i> 1	30	28	R	18	R	28	20	R	14
<i>S. aureus</i> 2	22	26	R	12	R	30	14	R	16
<i>S. aureus</i> 3	20	26	R	20	R	26	16	R	20
<i>S. aureus</i> 4	30	30	R	20	R	30	18	R	18
<i>S. aureus</i> 5	20	26	R	16	R	20	14	R	16
<i>S. aureus</i> 6	30	34	R	16	R	32	14	R	16
<i>S. aureus</i> 7	18	26	R	14	R	14	18	R	10
<i>S. aureus</i> 8	24	30	R	12	R	26	10	R	16
<i>S. aureus</i> 9	24	32	R	20	R	14	10	R	12
<i>S. aureus</i> 10	26	24	R	16	R	22	12	R	18
<i>S. aureus</i> 11	24	24	R	22	R	26	10	R	20
<i>S. aureus</i> 12	20	30	R	16	R	14	12	R	12
<i>S. aureus</i> 13	18	24	R	16	R	30	10	R	16
<i>S. aureus</i> 14	28	32	R	10	R	28	16	R	16
<i>S. aureus</i> 15	20	28	R	16	R	18	20	R	12
<i>S. aureus</i> 16	30	28	R	24	R	30	14	R	20
<i>S. aureus</i> 17	20	30	R	18	R	24	16	R	14
<i>S. aureus</i> 18	20	26	R	12	R	32	12	R	14
<i>S. aureus</i> 19	24	30	R	14	R	26	12	R	16

(*): İnhibisyon zonu, mm; (R): Dirençli

Eritromisin'e karşı en duyarlı olan 1, 4, 6 ve 16 nolu izolatlar 30 mm çapında inhibisyon zonu oluşturduğu tespit edilmiş olup, en az duyarlılığı ise 7 ve 13 nolu izolatlar 18 mm çapında inhibisyon zonu oluşturduğu saptanmıştır. Eritromisin'e karşı oluşan inhibisyon zon çapları 30 mm ile 18 mm arasında değişkenlik göstermektedir. Standart *S. aureus* izolatlarımızdan daha iyi oranda eritromisin'e karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

Mastitis etkeni sütlerden izole edilen *S. aureus* 6 nolu suş en fazla duyarlılığı siproflaksasin antibiyotiğine karşı 34 mm çapında inhibisyon zonu oluştururken, en az duyarlılığı ise 10, 11 ve 13 nolu izolatlar 24 mm çapında inhibisyon zonu oluşturduğu gözlemlenmiştir. Siproflaksasin antibiyotiğine karşı *S. aureus* suşlarının %100 duyarlılık gösterdiği tespit edilmiştir.

Gentamisin antibiyotiğine karşı 4 izolat (%21.5) direnç gösterirken, 15 izolat (%78.5) duyarlı olduğu belirlenmiştir. Gentamisin'e karşı en çok 16 nolu izolat 24 mm çapında inhibisyon zonu oluştururken en az duyarlı 14 nolu izolat 10 mm çapında inhibisyon zonu oluşturduğu tespit edilmiştir. Gentamisin'e karşı oluşan inhibisyon zonları 24 mm ve 10 mm arasında değişiklik gösterdiği görülmüştür.

S. aureus suşları kloramfenikol'e karşı 14-32 mm aralığında inhibisyon zonu oluşturmuştur. Bu izolatlardan 6 nolu suş en duyarlı olup 32 mm çapında inhibisyon oluşturduğu ve en az duyarlılığı ise 7, 9 ve 12 nolu izolatlar 14 mm çapında inhibisyon zonu oluşturduğu gözlemlenmiştir.

Piperasilin antibiyotiğine karşı en fazla direnci 8, 9, 11 ve 13 nolu izolatlar gösterirken, en fazla duyarlılığı ise 1 ve 15 nolu izolatların gösterdiği belirlenmiştir Piperasillin'e karşı oluşan inhibisyon zon çapları 10 mm ile 20 mm arasında değişkenlik göstermektedir. Piperasillin antibiyotiğine karşı izolatların % 63.'i (12/19) direnç gösterirken % 36,9'unun (7/19) ise duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

İzolatlardan 3,11 ve 16 nolu suşlar Kanamisin 'e karşı en fazla duyarlılığı 20 mm çapında inhibisyon zonu oluşturduğu tespit edilmiş olup, en az duyarlılığı ise 7 nolu izolat 10 mm çapında inhibisyon zonu oluşturduğu belirlenmiştir. Kanamisin 'e karşı oluşan inhibisyon zon çapları 20 mm ile 10 mm arasında değişim göstermektedir.

Bu çalışmamızda *S. aureus* suşlarının tamamı ve standart suş olarak kullandığımız *S. aureus* ATCC 25923 bakterileri Penisillin, Seftazidim ve Trimethoprim antibiyotiğine karşı dirençli oldukları belirlenmiştir. *S. aureus* suşlarında en fazla duyarlılığı 6 nolu izolat siproflaksasin antibiyotiğine karşı 34 mm çapında inhibisyon zonu oluştururken, en az duyarlılığı 8, 9, 11,14 nolu izolatlar piperasilin'e ve 7 nolu izolat kanamisin antibiyotiğine karşı 10 mm çapında inhibisyon zonu oluşturduğu tespit edilmiştir.

İzolatların antibiyotiklere karşı göstermiş oldukları dirençlilik, orta derece dirençlilik ve duyarlık aralıkları Çizelge 3.4' de verilmiştir.

Çizelge 3. 5. CLSI'ya göre disk difüzyon yöntemine göre zon çaplarının değerlendirilmesi

ANTİBİYOTİK	Disk İçeriği	Zon Çapı, mm		
		Dirençli (R)	Orta Derecede Duyarlı (I)	Duyarlı (S)
Eritromisin	15 µg	≤13	14-22	≥23
Siproflaksasin	5 µg	≤15	16-20	≥21
Penisillin	10 µg	≤28	-	≥29
Gentamisin	10 µg	≤12	13-14	≥15
Seftazidim	30 µg	≤14	15-17	≥18
Kloramfenikol	30 µg	≤12	13-17	≥18
Piperasillin	100 µg	≤14	15-20	≥21
Trimethoprim	5 µg	≤10	11-15	≥16
Kanamisin	30 µg	≤13	14-17	≥18

Kullanılan antibiyotiklere karşı *S. aureus* izolatlarının göstermiş olduğu 3 (dirençlilik, orta derece dirençlilik ve duyarlılığı) parametrenin yüzde (%) hesaplamaları Çizelge 3.5' te verilmiştir.

Çizelge 3. 6. Doğal sütlerden izole edilen *S. aureus* suşlarının direnç-duyarlılık durumlarının standart antibiyotiklerle karşılaştırması (%) n=19

Antibiyotikler	Duyarlı (%)	Orta derecede duyarlı (%)	Dirençli (%)
Eritromisin	52.6	47.4	0.0
Siproflaksasin	100	0.0	0.0
Penisillin	0.0	0.0	100
Gentamisin	68	10.5	21.5
Seftazidim	0.0	0.0	100
Kloramfenikol	84.2	15.8	0.0
Piperasillin	0.0	36.9	63.1
Trimethoprim	0.0	0.0	100
Kanamisin	26.3	52.7	21

Çizelgede görüldüğü gibi *S. aureus* suşları en yüksek duyarlılığı siproflaksasin'e karşı (%100) gösterirken, en düşük duyarlılık ise penisillin, seftazidim, piperasillin ve trimethoprim'e (% 0.0) karşı gösterdiği tespit edilmiştir. İzolatlar en yüksek orta dereceli duyarlılığı kanamisin'e (% 52.7) karşı göstermiş olup, gentamisin'e karşı ise (% 10.5) en düşük orta dereceli duyarlılık gösterdikleri belirlenmiştir. Suşlar en yüksek direnci penisillin, seftazidim ve trimethoprim antibiyotiğine karşı (%100) gösterirken, en düşük direnci ise Kanamisin'e (% 21) karşı gösterdiği tespit edilmiştir.

Stafilokoklarda antibiyotiklere dirençle ilgili yapılan çalışmalarda, her antibiyotik grubundan farklı antibiyotikler seçildiğinden elde edilen sonuçların bu derlemede karşılaştırılmaları zor olmuştur. Türkiye'de mastitisli inek ve koyunlardan izole edilen stafilokokların çeşitli antibiyotiklere direnç durumları son yıllarda yapılan

çalışmalarda *S. aureus* izolatlarının penisiline %19.0-90.7, eritromisine %3.3-21.5, gentamisine %0-56.3, trimetoprim %1.8-45.6 oranlarında dirençli oldukları belirlenmiştir. Mastitislerin en yaygın etkenlerinden olan *S. aureus* izolatlarına karşı Türkiye’de belirlenen direnç oranları incelenecek olursa en yüksek direnç penisilin (%19.0-90.7) gibi β -laktam grubu antibiyotiklere karşı tespit edilmiştir (Ünal, 2012). Ayrıca penisilin grubu kombinasyonlarına karşı direnç ise %6.8-18.5 arasında rapor edilmiştir (Tel, 2011). Penisiline karşı belirlenen en yüksek direnci oksitetrasiklin (%5.8- 61.2) takip etmektedir. Üçüncü sırada ise gentamisin (%0-56.3), 4. sırada trimetoprim (%1.8-45.6), 5. sırada %3.3-26.1’lik değerlerle tetrasiklin, 6. sırada %3.3-21.5 ile bunları eritromisin takip ederken, enrofloksasin direnci ise %13 olarak bildirilmiştir (Çelik, 2010; Macun, 2011).

Türkiye’de yapılan bir çalışmada, sığır karkaslarından alınan örneklerden elde edilen toplam 22 *S. aureus* izolatın % 40.9’u eritromisine ve % 22.7’sinin de trimetoprim’e yüksek oranda dirençli olduğu saptanmıştır. Bu antibiyotikleri kloramfenikol ve gentamisin izlemiştir. Ayrıca izolatların tamamı seftazidim’e duyarlı bulunmuştur. Buna ek olarak 16 izolat en az iki, 9 izolat en az üç, 6 izolat da en az dört farklı antibiyotige dirençli ya da orta düzeyde dirençli olarak saptanmıştır (Keyvan, 2014).

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, hayvanlarda mastitise neden olan bakteriler Muş ilinin farklı bölgelerinden toplanan süt örneklerinden izole edilmiştir. İzole edilen 99 adet mastitis etkeni bakterilerin morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal tanımlanması yapılarak stoklara alınmıştır.

Ön tanımlanması (koloni morfolojisi, katalaz, gram boyama) yapılan şüpheli *P. aeruginosa* suşları için *algD* (VicF-VicR) geni ve *S. aureus* suşları için *Nuc* gen dizisi kullanılarak PCR ile tanımlanması yapılmıştır. PCR sonucu olarak 520 bç bölgesinde bant varlığı gözlemlenmediğinden *P. aeruginosa* varlığı tespit edilmemiştir. *S. aureus* için 267 bç bölgesinde 19 şüpheli suşun bant varlığı gözlemlenmiştir.

Nuc gen varlığı ile tespit edilen 19 şüpheli *S. aureus* suşlarının plazmit DNA izolasyonu sonucunda plazmit sayıları 1 ila 3 arasında değişmektedir. Plazmitler büyüklükleri yönünden değerlendirildiğinde, en büyük plazmitin yaklaşık 10000 bç'nin üzerinde olduğu belirlenmiştir. *S. aureus* izolatlarında toplam 3 (1,11 ve 19) tanesinde tek plazmit var iken 4, 5, ve 7 nolu izolatlarda ise hiçbir plazmit varlığı tespit edilmemiştir. İzolatlar plazmit içerikleri bakımından değerlendirildiğinde; *S. aureus* izolatlarının ortalama 2 plazmit içerdiği tespit edilmiştir.

İzolatların antibiyotiklere karşı en yüksek duyarlılığı siproflaksasin'e karşı (%100) gösterirken, en düşük duyarlılık ise penisillin, seftazidim, piperasillin ve trimethoprim'e (% 0.0) karşı gösterdiği tespit edilmiştir. İzolatlar en yüksek orta dereceli duyarlılığı kanamisin'e (% 52.7) karşı göstermiş olup, gentamisin'e karşı ise (% 10.5) en düşük orta dereceli duyarlılık gösterdikleri belirlenmiştir. *S. aureus* suşlar en yüksek direnci penisillin, seftazidim ve trimethoprim antibiyotiğine karşı (%100) gösterirken, en düşük direnci ise Kanamisin'e (% 21) karşı gösterdiği tespit edilmiştir.

Hayvanlarda mastitis etkeni olan *S. aureus* suşlarının moleküler düzeyde tanımlanması daha sağlıklı olacağı kanısındayız. Bu gibi izolatların antibiyotik dirençlilik değerleri göz önünde bulundurarak en uygun antibiyotiğin seçilmeside ve yapılacak benzer çalışmalar katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

5. KAYNAKLAR

- Akan, M., 2006. Staphylococcus enfeksiyonları. Aydın N, Paracıklioğlu J. eds. In: Veteriner Mikrobiyoloji Bakteriyel Hastalıklar. Ankara: İlke Emek yayınları, pp. 5-13.
- Alan, Y., 2014. Doğal *Lactobacillus plantarum* izolatlarının gıda güvenliği ve aromatik özelliklerinin araştırılması. Doktora Tezi, Sütçü İmam Üniversitesi, Kahramanmaraş, Türkiye
- Ali-Vehmas, T., Sandholm, M., 1995. The Balance Between Bacteria and Host-The Bacteria's Point of View. In: *The Bovine Udder and Mastitis*, Ed.: M. Sandholm, T. Honkanen-Buzalski, L. Kaartinen, S. Pyorala, Gummerus Kirjapaino Oy, Finland, p.: 49-58.
- Anderson, D.G., Mckay, L.L., 1983. Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from *lactic streptococci*. *Applied and Environmental Microbiology*, 46 (3), 549- 552.
- Anonim, 2000. Çiğ süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği. 14.02.2000-23964 nolu Resmi Gazete. 2000/6 Nolu Tebliğ.
- Arda M., 2000. Temel Mikrobiyoloji Genişletilmiş İkinci Baskı, Ankara: Medisan Yayın Serisi no 46, 294-314.
- Arda, H., Minbay, A., Leloğlu, N., Aydın, N., Kahraman, M., Akay, Ö., Ilgaz, A., İzgür, M., Diker, K.S., 1997. Özel Mikrobiyoloji 4.Baskı, Ankara: Medisan Yayın Serisi No:26 s. 31-44, Ankara.
- Arda, M., 2006. Mikrobiyel Üremenin Kontrolü. Bakterilerin Anatomik Yapıları. Web sitesi. <http://www.mikrobiyoloji.org>. Erişim tarihi: 17.02.2006.
- Arda, M., Aydın, N., Ilgaz, A., Minbay, A., Kahraman, M., İzgür, M., Leloğlu, N., Akay, Ö., Diker, KS., 1997. Özel Mikrobiyoloji, 4.Baskı, Medisan Yayınevi. p: 91-96
- Aslım, B., Beyatlı, Y., 2004. Antibiotic resistance and plasmid DNA contents of *Streptococcus thermophilus* Strains Isolated from Turkish Yogurts. *Turkish Journal of Veterinary Animal Science*, 28 (2), 257-263.

- Atasever, S., Erdem, H., 2008. Süt sığırlarında mastitis ile sütün elektriksel iletkenliği arasındaki ilişkiler, OMÜ Zir. Fak. Dergisi, 23(2): 131-136.
- Ayaz, D., Erol, İ., 2004. Canlı Fakat Kültürü yapılamayan Bakteriler ve Gıda Güvenliği Yönünden Önemi. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 15 (1-2), 66.
- Baştan, A., 2010a. Öneklerde Meme Sağlığı ve Sorunları. Kardelen Ofset, Ankara.
- Baştan, A., 2009. Mastitisten Korunmada Temel İlkeler. In: İneklerde Meme Hastalıkları. Hatipoğlu Basım ve Yayımlar Tic. Ltd. Şti. s:84-105.
- Baştürk, S., 2005. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* Suşlarında Çeşitli Kinolon Grubu Antibiyotiklerin Duyarlılıklarının Araştırılması. T.C. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği Uzmanlık Tezi, İstanbul, Türkiye.
- Besler, H., Ünal, S., 2006. Ankara'da Satılan Sokak Sütlerinin Bazı Vitaminler Açısından değerlendirilmesi ve Ev Koşullarında Uygulanan Kaynatmanın Süreye Bağlı Olarak Vitaminlere Olan Etkisi. IV Uluslararası Beslenme ve Diyetetik Kongresi Bildiri Kitabı.
- Biggs, A., 2009. Mastitis in Cattle. 1st Ed., Times Offset, Malaysia.
- Bilgehan, H., 1992. Klinik Mikrobiyolojik Tanı, 488-458.
- Bilgehan, H., 1994. Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakterioloji ve Bakteri İnfeksiyonları, 188-210.
- Bilgehan, H., 2000. Klinik Mikrobiyoloji. Özel. Bakterioloji ve Bakteri İnfeksiyonları. 8. Basım, Fakülteler Kitabevi, İzmir, Eylül; s.186-210
- Blood, DC., ve Radostis, OM., 1989. Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs and horses. Bailliere Tindall, London.
- Brown, T.A., 2000. Essential Molecular Biology, 2 nd Edn., Vol. 1., A Practical Approach. Oxford Univ. Press, Oxford. UK.
- Busch, U., Nitschko, H., 1999. Methods for differentiation of microorganisms. Journal of Chromatography, 722 (1-2), 263- 278.

- Clinical Laboratory Standards Institute / CLSI, 2002 Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard-Second Ed. M31-A2 and M37-A2. Pennsylvania, USA.
- Çelik, A., Solmaz, H., 2010. Investigation of antibiotic susceptibility and presence of plasmids in staphylococci isolated from cow milk with subclinical mastitis. *YYU Vet Fak Derg*, 5 (21), 141.
- Da Silvo Filho, L., V. F., J. E., Levi, C. N. O. Bento, S. R. T. Da Silvo Ramos, and. Rozov, T., 1999. PCR identification of *Pseudomonas aeruginosa* and direct detection in clinical samples from cystic fibrosis patients. *J. Med. Microbiol*, 48, 357–361.
- De Graves, FJ., 2014. Fetrow J. Economics of Mastitis Control. *Vet. Clin. North Am: Food*
- Dilsiz, N., 1998. Nuclear transfer and biotechnology. *Sendrom*, 10, 99 105.
- Eralp, M., 1974. Peynir Teknolojisi. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 533, 331 s., Ankara.
- Ergün, Y., Arabacı, F., Oldacay, M., 2008. *Sağlık Çalışanlarının Burun Kültürlerinden İzole Edilen Stafilokoklarda Metisilin Direnci ve Slime Yapımı Pozitifliği*. *İnfeksiyon Dergisi*, 22 (3): 165-168.
- Erol, İ., 2007. Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü.
- Eyraud, A., Tattevin, P., Chabelskaya, S., Felden, B. 2014. A small RNA controls a protein regulator involved in antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acid Research*. 1- 14
- Favret, M.E., Yousten, A.A., 1989. Thuricin: the bacteriocin by a *Bacillus thuringiensis*. *Journal of In vertebrate Pathology*, 53 (2), 206-216.
- Fox P.F., McWeeney P.L.H. 2003. Advanced Dairy Chemistry. Volume 1. In Chapter 1: Milk Proteins: General and Historical Aspects. Third Edition. Part A. New York, Springer Verlag Publish.

- Gillespie, BE., Owens, WE., Nickerson, SC., Oliver, S., 1999. Deoxyribonucleic acid fingerprinting of *Staphylococcus aureus* from heifer mammary secretions and from horn flies. J Dairy Sci, 82, 1581-1585.
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Corsetti, A., Di Cagno, R., 2005. Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. Trends in Food Science and Technology, 16 (1), 57-69.
- Hacıbektaşoğlu, A., Eyigün, C., P., Özsoy, M. F. 1993. *Gıda Elleyicilerinde Burun ve Boğaz Portörlüğü*. Mikrobiyoloji Bülteni 27: 62-70.
- Hammes, W.P., Vogel, R.F., 1995. The genus *Lactobacillus*. in the genera of lactic acid bacteria. Wood BJB and Holzapfel WH (Eds), Chapman & Hall, London. 19-54.
- Haveri, M., 2008. *Staphylococcus aureus* in bovine intramammary infection: molecular, clinical and epidemiological characteristics. Academic Dissertation, Helsinki.
- Hutton vd., 1990. Hutton, CT., Fox LK, Hancock, DD., 1990 Mastitis control practices: Differences between herds with high and low milk somatic cell counts. J Dairy Sci, 73(4), 1135-1143
- Iglewski, BH., 2002. Pseudomonas. Medmicro Chapter 27. (<http://gsbs.utmb.edu/microbook>) Erişim Tarihi: 05. 2014.
- Karahan, M., 2005. Mastitisli inek sütlerinden izole edilen Streptokok ve Stafilokok etkenlerinde genetik polimorfizmin araştırılması. Doktora Tezi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Keyvan, E., 2014. Sığır karkaslarında *Staphylococcus aureus*'un varlığı, karakterizasyonu ve antimikrobiyal dirençliliğin belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Ankara, Türkiye.
- Kılıçoğlu, C., 1984. Mastitiste Klinik Tanı. Alınmıştır: *I. Mastitis Semineri*, Ed.: M.
- Kirk J., R., Mellenberger, 2002. Pseudomonas Mastitis İn Dairy Cows. (Erişim Tarihi: 2013)
- Koçoğlu, F., 1994. Sivas Yöresinde Çeşitli Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas* Türleri ve Bunların Bazı Antimikrobiyellere İn-Vitro Duyarlılıkları. Cumhuriyet

Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı
Uzmanlık Tezi, Sivas, Türkiye.

- Konar, A., 1998. Süt Teknolojisi. Çukurova Üniv. Ziraat Fak. Ofset Atölyesi. Adana.
- Küçüköner, E., Tarakçı, Z., 1998. Van ve Yöresinde Üretilen Cacığın (Otlı Çökelek) Bazı Özelliklerinin Araştırılması. V. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu, Geleneksel Süt Ürünleri, Milli Prodüktivite Yayınları: 621, 175-184 s., Ankara.
- Lederberg, J., 1998. Personal Perspective, Plasmid (1952–1997). Plasmid, 39, 1–9.
- Mandel, M., Higa, A., 1970. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. J. Mol. Biol, 53 (1), 159-162
- Mathur, S., Singh, R., 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria. Int. J. Of Food Microbiology. 105 (3), 281- 295.
- McSweeney, P. L. H. and Fox, P. F., 2008. Advanced Dairy Chemistry: Volume 3- Lactose, Water, Salts and Minor Components, 3rd. Edition, Springer Publishers, New York (in preparation).
- Metin, M., 2003. “Süt teknolojisi: sütün Bileşimi ve İşlenmesi”, E.U. Muh.Fak.Yay. No:33, *Ege Üniversitesi Basımevi*, Bornova, İzmir.
- Metin, M., Öztürk F.G., 2003 “Süt İşletmelerinde Sanitasyon”, E.U. Mes.Yük.OkuluYay. No:17, *Ege Üniversitesi Basımevi*, Bornova, İzmir.
- Milli, U. H., 2001. Stafilokokal Mastitis. Alınmıştır: *Veteriner Patoloji*, Ed.: R. Hazıroğlu, U. H. Milli, 2. Baskı. Medipres, Malatya, s.: 545-547.
- Oviedo-Boyso, J., Valdez-Alarcon, J. J., Cajero-Juarez, M., Ochoazarzosa, A., Lopez Meza, J. E., Bravo-Patino, A., Baizabalaguirre, V. M. 2007. Innate immun response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *Journal of Infection*, 54: 399-409.
- Öncel, G., 1984. Mastitis Mücadelesinin Yasal Durumu ve Bu Konuda Uygulanan Projeler. Alınmıştır: *I. Mastitis Semineri*, Ed.: M. Arda, N. Aydın, E. Alacam, O. Akay, H. Özgür, S. Diker. Lalahan Veteriner Zootekni Araştırma Enstitüsü Yetiştirme ve Deneme Çiftliği Müdürlüğü Ofset Tesisleri, Ankara, s.: 5-8.

- Öncül, O., Erdemoğlu, A., Özsoy, M. F., Altunay, H., Ertem, Z. ve Çavuşoğlu, Ş., 2002. *Hastane Personelinde Nazal Staphylococcus aureus Taşıyıcılığı*. Klinik Dergisi 15(3): 74-77.
- Philpot, W. N., Nickerson, S. C., 2000. *Winning The Fight Against Mastitis*. Westfalia, Naperville.
- Philpot, W. N., Nickerson, S., C., 1991. Erişim: <http://www.classes.aces.uiucc.edu/AnSci308/mastitisa.htm>. Erişim Tarihi: 07/09/2009.
- Pinho, L., Ferreira, J., Cabral, C., Lameira, R., Meireles, P., Vaz, F., Carvalheira, J., Thompson, G. 2008. Prevalence of mastitis pathogens in milk samples from Portuguese dairy cattle. In: *Mastitis Control From Science to Practice*, Ed.: T. J. G. M. Lam, 1st Ed., Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, p.: 47-53.
- Rudholm, N., 2002. Economic implications of antibiotic resistance in a global economy. *Journal of Health Economics*, 21: 1071- 1083.
- Schleifer, KH., 1986. Gram Positive Cocci. "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 1". Ed. PHA Sneath, NS Mair, ME Sharpe, JG Holt. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Tayar, M., Şen, M.K.C., 2007. *Hayvansal Ürünler Teknolojisi*. Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Yayınları, 60-67 s, Eskişehir.
- Tel, OY., Keskin, O., 2011. Subklinik Mastitisli İneklerden izole edilen stafilocok suşlarının bazı virulens faktörleri ve antibiyotik direnci. *YYU Vet Fak Derg*, 22: 17-21.
- Tenhagen, BA., Köster, G., Wallmann, J., Heuwieser, W., 2006. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J. Dairy Sci*, 89, 2542-2541.
- Tunail, N., 2009. *Gıda Biyoteknolojisi*. Nobel yayınları. 1. Baskı. ISBN978-605- 395-299-2.
- Ünal, N., Askar, Ş., Macun, HC., Sakarya, F., Altun, B., Yıldırım, M., 2012. Panton-Valentine leukocidin and some exotoxins of *Staphylococcus aureus* and

antimicrobial susceptibility profiles of staphylococci isolated from milks of small ruminants. *Trop Anim Health Prod*, 44: 573-9.

Wilson, V. L., B. C. Tatford, X. Yin, S. C. Rajki, M. M. Walsh, and P. LaRock. 1999. Species-specific detection of hydrocarbon-utilizing bacteria. *J. Microbiol. Methods* 39:59–78.

Wolska, K., Bukowski, K., Anusz, Z., Jakubczak, A., 1999. Bacterisidal Activity of Human, Swine and Cattle Serum Against *P. aeruginosa* Strains. *Med. Dosw. Microbiology*, 51 (3-4), 399-45

www.unpisi.it/images/stafilococcus, 05.10.2017

Romero, D. A. & Klaenhammer, T. R., 1990. Characterization of Gram-positive insertion sequence IS946, an iso-ISS1 element, isolated from the conjugative lactococcal plasmid pTR2030. *Journal of Bacteriology* 172, 4151-4160.

Berkin, S., Milli, U. H., 1984. Mastitislerin Patolojisi. Alınmıştır: *I. Mastitis Semineri*, Ed.: M. Arda, N. Aydın, E. Alacam, O. Akay, H. Özgür, S. Diker. Lalahan Veteriner Zootekni Araştırma Enstitüsü Yetiştirme ve Deneme Çiftliği Mudurluğu Ofset Tesisleri, Ankara, s.: 9-16.

6. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Nimetullah AKCAN

Doğum Yeri : Tatvan

Doğum Tarihi : 05.10.1989

Medeni Durumu : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim durumu (kurum ve yılı)

Lise : Tatvan Atatürk Lisesi 2006-2010

Lisans : Muş Alparslan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü 2010-2014

Yüksek Lisans : Muş Alparslan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı 2014-2017