

İnsan ve sığır kökenli *Staphylococcus aureus* izolatlarının fenotipik ve genotipik özelliklerinin araştırılması*

Nilgün ÜNAL, Ersin İSTANBULLUOĞLU

Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale.

Özet: Bu çalışma, *Staphylococcus aureus* izolatlarının (46 mastitisli inek sütü, 35 inek meme başı derisi, 3 inek burun, 3 bakıcı el ve 9 bakıcı burun sürüntü örneğinden) E-test metoduyla çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılık profilleri ile plazmid ve Pulsed Field Gel Elektroferez (PFGE) analizleriyle genotipik özelliklerini belirlemek amacıyla yapıldı. E-test sonuçlarına göre, *S. aureus* izolatlarının penisilin G, tetrasiklin, eritromisin, oksasilin ve enrofloksasin dirençleri sırasıyla %85.4 (82), %39.6 (38), %5.2 (5), %3.1 (3) ve %1.0 (1) olarak belirlendi. Plazmid analizleri ile 9 farklı tipte plazmid profili belirlendi. Analizleri yapılan izolatların 87 (%90.6) tanesinde 1.8-19 kb arasında değişen büyüklükte on farklı plazmid belirlendi ve izolatların 9 tanesinde (%9.4) plazmid saptanamadı. PFGE tiplendirme verilerine göre *S. aureus* izolatları genetik yakınlık bakımından 42 farklı paterne ve 13 ana gruba (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M) ayrıldı. İzolatların % 58.3'ü (56 adet) A pulsotipinde gruplandırıldı. Sonuç olarak plazmid analizleri ve PFGE verilerine göre, Kırıkkale ve çevresindeki süt sığırcılığı işletmelerinde mastitislerden sorumlu yaygın bir *S. aureus* klonunun var olduğu görüldü.

Anahtar sözcükler: Antibiyotik direnci, MİK, PFGE, plazmid analizi, *Staphylococcus aureus*

Phenotypic and genotypic features of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cattle and humans

Summary: The aim of this study was to determine susceptibility patterns of *S. aureus* strains (46 were isolated from bovine milk samples with mastitis, 35 from bovine teat skins, 3 from bovine noses, 3 from caretaker hands and 3 from caretaker noses) to various antibiotics by E-tests and was to define genotypic characteristics of these isolates by plasmid and Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) analyses. According to E-test results, the percentages of *S. aureus* isolates resistant to penicillin G, tetracycline, erythromycin, oxacillin and enrofloxacin were found to be 85.4% (82), 39.6% (38), 5.2% (5), 3.1% (3) and 1.0% (1), respectively. Nine different types were determined in the plasmid analyses of the isolates. In 87 (90.6%) of the isolates, 10 different types of plasmids with the sizes between 1.8 -19 kb were determined while no plasmid was detected from the 9 (9.4%) of the isolates. Genetic relationships among *S. aureus* isolates were performed using PFGE method and 42 distinct PFGE patterns were identified. Strains were assigned as 13 major lineage groups (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M) with respect to the genetic relationships. 58.3% (56 samples) of strains were clustered as pulsotype A. In conclusion, according to plasmid analysis and PFGE data, a clone of *S. aureus* was broadly detected in dairy farms in Kırıkkale province.

Key words: Antibiotic resistance, MIC, PFGE, plasmid analyses, *Staphylococcus aureus*.

Giriş

Staphylococcus aureus izolatlarının en önemli habitatı insanlarda burun mukozası ve hayvanlarda deridir. *S. aureus* hayvanlarda mastitis, artrit, otitis, epidermitis ve üriner sistem enfeksiyonları gibi enfeksiyonlara neden olurken insanlarda hastane enfeksiyonları, gıda zehirlenmeleri, osteomyelitis, poliartrit, endokarditis, toksik şok sendromu, folikülitis, konjunktivit, idrar yolları enfeksiyonları, pnömoni, haşlanmış deri sendromu (scalded skin syndrome, SSS) gibi çok sayıda enfeksiyona neden olmaktadır (16, 19, 23).

Stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde stafilocok türleri arasındaki direnç yaygınlığı önemli bir sorundur. Yeni antibiyotiklerin klinik kullanıma girmesinden kısa

bir süre sonra mikroorganizmanın direnç kazandığı iyi bilinmektedir. *S. aureus* suşları arasında metisilin direnci son birkaç yılda hızla artmıştır (12).

Staphylococcus aureus'ün çok sayıda suşu vardır. Epidemiyolojik araştırmalarla etkenlerin alt tiplendirmeleri (klonal yakınlıklarının) yapılmakta ve bir patojenin doğadaki yayılma yolları ve kaynakları tam olarak belirlenerek etkili kontrol ve eradikasyon stratejileri geliştirilebilmektedir (8). Tiplendirme, mikroorganizmaların karakteristik özelliklerini tespit etmeye dayanan fenotipik metotlar ile mikroorganizmaların kromozomal ve ektrakromozomal genetik elementlerinin analizine dayanan genotipik metotlarla yapılmaktadır (3).

* Birinci yazarın doktora tezinden özetlenmiştir. Proje, TÜBİTAK (TOVAG 105 O 100) ve Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi (2005/12) tarafından desteklenmiştir.

Fenotipik metotlar, biyotiplendirme, antimikrobiyal direnç testleri, serotiplendirme, faj tipi ya da bakteriyosin tipi, elektroforetik protein tiplendirme olarak sıralanabilir (3, 8).

Antibiyotik direnç profil analizi (antibiyogram), laboratuvarlarda en çok kullanılan, ucuz, uygulanması kolay, hızlı ve ekonomik bir metottur. Fakat ayırım gücü yeterli değildir (9).

Genotipik tiplendirme metotları, plazmid profil analizleri, kromozomal DNA'nın restriksiyon endonükleaz analizi, Restriction Fragment Length Polymorphism-PCR (RFLP-PCR), Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD-PCR) ve Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) olarak sıralanabilir. Bu tekniklerin herbirinin ayırım gücü, tekrarlanabilirlik ve tiplendirilebilirliklerine göre avantajları ve dezavantajları vardır (5, 18).

Plazmid profil analizi epidemiyolojik çalışmalarda DNA'ya dayalı yapılan ilk tiplendirme metotlarından biridir. İzolatların taşıdıkları plazmid sayısı ve büyüklükleri belirlenerek suşlar birbirinden ayrılabilir (3). Bu analiz, hızlı ve tekrarlanabilirlik özelliklerine sahiptir. Ayrıca plazmid analizinde pek çok suş çalışılabilir (13). Ancak plazmidlerin bakteriler tarafından kolaylıkla kaybedilmesi veya kazanılması ve her izolatın plazmid taşıması gibi nedenlerle bazı izolatlar tiplendirilememektedir (9).

Pulsed-Field Gel Electrophoresis tekniği (PFGE) ayırım gücü yüksek, tekrarlanabilirliği olan, güvenilir bir metottur. Bu nedenle günümüzde moleküler tiplendirme yöntemleri içinde "altın standart" olarak kabul edilmektedir (14, 26).

Bu çalışmanın amacı, süt sığırcılığı işletmelerindeki mastitisli ineklerin sütlerinden, memebaşı derilerinden ve inek bakıcılarından izole ve tanımlanan *S. aureus* izolatlarının fenotipik ve genotipik özelliklerini araştırmaktır.

Materyal ve Metot

Kırıkkale İli ve çevresinde bulunan 20 süt sığırcılığı işletmesi Nisan 2005 - Ocak 2006 tarihleri arasında ziyaret edildi. Değişik ırk ve yaşlarda laktasyonun çeşitli dönemlerinde bulunan 109 sağmal ineğin burun mukozalarından, meme başı derilerinden ve bu işletmelerde bulunan 21 hayvan bakıcısının el ve burunlarından sürüntü örnekleri alındı. Ayrıca deri ve burun sürüntü örnekleri alınan ineklerden süt örnekleri de alındı. Laboratuara getirilen örneklerin Staphylococcus Medium 110 agara ve Kanlı agara (% 5 Koyun kanlı) ekimleri yapıldı. Gram pozitif, katalaz pozitif, tavşan plazması ile yapılan tüp koagülaz pozitif, mannitolün anaerobik kullanımı pozitif olan koklar *S. aureus* olarak tanımlandı.

İzolatların metisiline direncini tespit etmek için E-test metodundan önce Disk Difüzyon yöntemi ve Oksasilin tarama plakları kullanıldı. Stafilkoklar, NaCl

(%4 w/v; 0,68 mol/L) ve 6 µg oksasilin/ml içeren Mueller-Hinton agara inokule edildi ve 37 °C de 24 saat inkübe edildi. Ekim alanında bir koloninin bile üremiş olması, test edilen bakteri suşunun oksasiline dirençli olduğunu göstermektedir (7).

Penisilin G, sefalotin, eritromisin, gentamisin, enrofloksasin, tetrasiklin, trimetoprim-sulfametoksazol, rifampin, oksasilin, vankomisin, linezolid antibiyotiklerinin E- test stripleri (AB-Biodisk- Sweden) ile Klinik Laboratuvar Standartlar Enstitüsü'nün (Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI)) kriterleri dikkate alınarak yapıldı. Test kontrolü olarak *S. aureus* ATCC 29213 suşu kullanıldı.

İzole edilen 96 adet *S. aureus* izolatının plazmid analizi yapıldı. Plazmid DNA izolasyonu Şener ve ark. (21) göre yapıldı. Plazmidler %0,8'lik agarozda 90 voltta 3 saat elektroforeze tabi tutuldu. Plazmidlerin ortalama ağırlığını belirlemede 2067-16210 bp'lik marker kullanıldı. En az bir farklı plazmid taşıyan izolatlar farklı bir tip olarak tanımlandı.

Staphylococcus aureus (96 adet) izolatlarının PFGE ile analizleri Lencastre ve ark. (15) göre gerçekleştirildi. Her bir izolatın %5 koyun kanlı agarda üremiş kolonilerinden, bir koloni seçilerek "Trypticase Soy Broth" (TSB) içerisinde bir gece 37°C'de aerobik atmosferde inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 6000 rpm hızda 10 dakika santrifüj edilen tüplerdeki üst sıvı atıldı. Kalan bakteri peleti üzerine 1 ml PIV çözeltisi (10mM TRIS pH 8,0, 1M NaCl) eklendi. Karışımdan 1ml alınarak steril ependorf tüplere aktarıldı. Daha sonra 10.000 rpm hızda 10 dak santrifüj edildi ve üst sıvı atıldı. Peletin üzerine 200 µl PIV çözeltisi eklendi. Karışımdan 100 µl alınarak içerisinde %2'lik Light Melting Agaroz bulunan steril bir ependorf tüpe aktarıldı. Bakterili PIV çözeltisi ile Light Melting Agaroz karışımından 20µl' ye ayarlanmış otomatik pipet yardımıyla parafin kaplı cam üzerinde her örnek için 8-10 DNA diski hazırlandı. Diskler 1ml EC lizis (1M Tris, 0,5 M EDTA, 29,2 gr Sodyum klorür, 1 gr Sodyum deoksikolat, 2,5 gr Sodyum laurilsarkozin, 10 mg/ml RNase A, 20 mg/ml Lizozim, 1 mg/ml Lizostafin) çözeltisi içeren tüplere steril tek kullanımlık öze yardımıyla aktarıldı ve 1 gece 37°C'de bekletildi. Süre sonunda EC lizis çözeltisi döküldü ve 1 ml ESP (0,5 M EDTA, 1 gr Sodyum laurilsarkozin, 50mg Proteinaz K) çözeltisi eklendi ve tüpler 56 °C'de 1 gece bekletildi. Sonra 1X TE (10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA pH 8) buffer ile DNA diskleri 5 kez yıkandı. Yıkama işleminden sonra DNA disklerine 2 ml 1XTE buffer eklendi ve kesim işlemine kadar 4°C'de bekletildi. DNA içeren agaroz plakları her biri 15 U *SmaI* enzimi içeren 45 µl restriksiyon sıvısı ile 37°C'de 1 gece inkübe edilerek hücresel DNA'nın CCC-GGG bölgelerinden kesilmesi sağlandı. Agarozaya yüklenen örnekler Gene Navigator Pharmacia (İsveç)'da DNA'lar 12 saat

elektroforeze tabi tutuldu. Elektroforez işleminden sonra 1 µg/ml etidiyum bromid içeren jelin boyanması sağlandı. Oluşan bantlar, UV ışık altında GelDoc görüntüleme sistemi (GelDoc/BioRad/ABD) yardımıyla bilgisayar ortamına aktarıldı. Bantların aynılık oranları X-L-STAT (2, 19) programında Dice korelasyon katsayısı kullanılarak karşılaştırıldı.

Bulgular

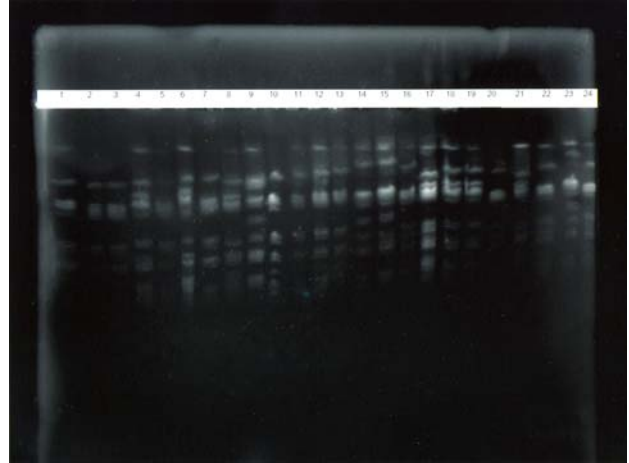
E-test sonuçlarına göre 96 adet *S. aureus* izolatının penisilin direnci %85.4 (82 adet) tetrasiklin direnci %39.6 (38), eritromisin direnci %5.2 (5) oksasilin direnci %3.1 (3), enrofloksasin direnci %1.0 (1) olarak belirlendi. Mastitisli inek sütlerinden izole edilen *S. aureus* suşlarının (46 adet) penisilin direnci %80.4, tetrasiklin direnci %26.1, eritromisin direnci %4.3 olarak belirlenirken; gentamisin, enrofloksasin, rifampin, trimetoprim-sulfametaksazol, oksasilin, vankomisin, sefalotin ve linezolidde tüm izolatlar duyarlı bulundu. Meme başı derisi ve burun sürüntü örneklerinden izole edilen 38 *S. aureus* izolatının penisilin direnci %86.8 ve tetrasiklin direnci %50.0 olarak belirlenirken incelenen diğer antibiyotiklere tüm izolatlar duyarlı olarak tespit edildi.

İnek bakıcılarının el ve burun sürüntü örneklerinden izole edilen 12 adet *S. aureus* suşunun penisilin, tetrasiklin, eritromisin, enrofloksasin ve oksasilin direnci sırasıyla %100.0, %58.3, %25.0, %8.3, %25.0 olarak belirlenirken diğer antibiyotiklere tüm izolatlar duyarlı bulundu.

Staphylococcus aureus izolatlarının (96) plazmid profil analizleri sonucunda 9 farklı tipte plazmid profili gözlemlendi. Analizleri yapılan izolatların 87 (%90.6) tanesinde 1.8 kb, 2 kb, 3kb, 5 kb, 7 kb, 8 kb, 10 kb, 12 kb, 16 kb ve 19 kb'lık on farklı büyüklükte plazmid belirlendi ve izolatlarının 9 tanesinde (%9,4) plazmid saptanamadı. Plazmid paternleri P1 (Patern 1), P2,..., P9 olarak ifade edildi. İzolatların plazmid paternleri ve taşıdıkları plazmitler Tablo1'de verilmiştir.

Çalışmada 96 *S. aureus* izolatının tümü PFGE metodu ile tiplendirildi. İzolatların kromozomal DNA'sı *SmaI* enzimi ile kesildiğinde 50-550kb arasında değişen moleküler ağırlıklarda 9-16 adet bant bulunan 42 farklı patern tanımlandı. Elde edilen PFGE sonuçlarına göre *S. aureus* izolatları 13 ana gruba (A, B, C, D, E, F,G, H, I, J, K,L, M) ve 33 alt gruba ayrıldı. Şekil 1' de, *S. aureus* izolatlarının *SmaI* enzimi ile kesilmiş PFGE pulsotipleri görülmektedir.

İzolatlar genetik ilişkilerine göre %95, %90 ve %80 oranlarında benzerlikle sırasıyla 36, 14, 12 pulsotipe ayrıldı (Şekil 2). İzolatların %58.3'ünün (56 adet) A, %16.7'sinin (16) B, %5.2'sinin (5) C, %5.2'sinin G, %3.1'inin (3) D, %2.1'inin (2) E, 2.1'inin (2) L, 2.1'inin (2) M, %1.0'ünün (1) F, %1.0'ünün (1) H, %1.0'ünün (1) I, %1.0'ünün (1) J ve %1.0'ünün (1) K grubunda yer aldığı saptandı.

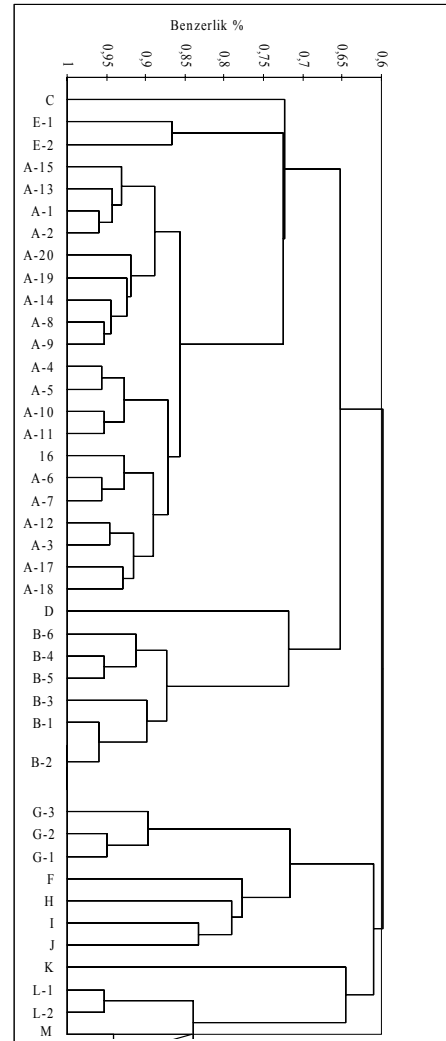


Şekil 1. *S. aureus* izolatlarının *SmaI* enzimi ile kesilmiş PFGE pulsotipleri.

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 21, 24 A klonundaki, 14, 15 ve 23'de ise B klonundaki süt kökenli izolatların makrorestriksiyon görüntüleri yer almaktadır.

Figure 1. PFGE pulsotypes of *S. aureus* isolates restricted by *SmaI* enzyme.

Macrorestriction genomic profiles of isolates originated from milk are shown in lanes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 21, 24 in A clone, 14, 15 and 23 in B clone.



Şekil 2. *S. aureus* izolatlarının oluşturduğu gruplara ait dendrogram
Figure 2. Dendrogram analysis of *S. aureus* isolates

Tablo 1. *S. aureus* izolatlarının, antibiyotik direnç özellikleri, plazmid profilleri ve pulsotipleri
 Table 1. Resistance to antibiotics, pulsotypes and plasmid characteristics of *S. aureus* isolates

İzolat no	İzolatın izole edildiği yer	Pulsotip	Patern	Plazmid sayısı	Büyükük	Antibiyotik direnç özelliği
1	Deri 12ç-01 Sd	A-07	P9	-	-	-
2	Deri 07ç-05 Sd	K	P1	1	12 kb	-
3	Deri 12ç-01 Sd	B-05	P1	1	12 kb	-
4	Süt 04ç-06 Ss	A-10	P1	1	12 kb	-
5	Süt 04ç-07 Ss	A-14	P1	1	12 kb	-
6	Süt 17ç-01 Ss	M	P1	1	12 kb	-
7	Deri 20ç-09 Sd	G-03	P1	1	12 kb	-
8	Burun 15ç-01 Sb	B-02	P2	2	5 kb,10 kb	-
9	Süt 12ç-02 Ss	A-13	P3	3	5 kb, 12 kb, 19 kb	-
10	Süt 12ç-02 Ss	A-12	P8	4	3 kb, 8 kb, 12 kb, 16 kb	-
11	Süt 17ç-01 Ss	F	P7	4	7 kb, 8 kb, 12 kb, 19 kb	-
12	Süt 07ç-07 Ss	A-11	P9	-	-	P
13	Süt 05ç-20 Ss	A-06	P9	-	-	P
14	Deri 20ç-06 Sd	A-01	P9	-	-	P
15	Süt 20ç-06 Ss	A-11	P9	-	-	P
16	Süt 20ç-06 Ss	B-04	P9	-	-	P
17	Deri 20ç-09 Sd	G-03	P9	-	-	P
18	Süt 01ç-02 Ss	A-14	P1	1	12 kb	P
19	Süt 01ç-02 Ss	G-04	P1	1	12 kb	P
20	Süt 01ç-07 Ss	A-01	P1	1	12 kb	P
21	Süt 01ç-07 Ss	A-07	P1	1	12 kb	P
22	Süt 01ç-07 Ss	A-09	P1	1	12 kb	P
23	Deri 01ç-07 Sd	I	P1	1	12 kb	P
24	Süt 01ç-07 Ss	B-02	P1	1	12 kb	P
25	Süt 01ç-10 Ss	A-03	P1	1	12 kb	P
26	Süt 01ç-10 Ss	A-09	P1	1	12 kb	P
27	Süt 02ç-12 Ss	A-14	P1	1	12 kb	P
28	Süt 06ç-27 Ss	B-04	P1	1	12 kb	P
29	Deri 07ç-01 Sd	A-01	P1	1	12 kb	P
30	Süt 10ç-02 Ss	A-09	P1	1	12 kb	P
31	Bakıcı 17ç-Bb	B-03	P1	1	12 kb	P
32	Bakıcı 17ç-Bb	H	P1	1	12 kb	P
33	Deri 13ç-01 Sd	G-02	P1	1	12 kb	P
34	Süt 04ç-01 Ss	A-18	P1	1	12 kb	P
35	Süt 16ç-01 Ss	A-11	P1	1	12 kb	P
36	Süt 16ç-02 Ss	A-09	P1	1	12 kb	P
37	Süt 16ç-03 Ss	E-02	P1	1	12 kb	P
38	Süt 17ç-01 Ss	B-02	P1	1	12 kb	P
39	Deri 20ç-06 Sd	A-15	P1	1	12 kb	P
40	Süt 20ç-06 Ss	A-13	P1	1	12 kb	P
41	Deri 20ç-06 Sd	A-15	P1	1	12 kb	P
42	Deri 20ç-05 Sd	A-15	P2	2	5 kb,10 kb	P
43	Süt 20ç-05 Ss	A-02	P2	2	5 kb,10 kb	P
44	Süt 20ç-06 Ss	A-13	P2	2	5 kb,10 kb	P
45	Bakıcı 15ç-Bb	D	P5	3	7 kb, 8 kb, 12 kb	P
46	Deri 20ç-06 Sd	A-08	P5	3	7 kb, 8 kb, 12 kb	P
47	Süt 04ç-01 Ss	B-01	P8	4	3 kb, 8 kb, 12 kb, 16 kb	P
48	Deri 20ç-05 Sd	A-01	P7	4	7 kb, 8 kb, 12 kb, 19 kb	P
49	Süt 20ç-05 Ss	A-19	P7	4	7 kb, 8 kb, 12 kb, 19 kb	P
50	Bakıcı15ç-Be	D	P3	3	5 kb, 12 kb, 19 kb	P, E
51	Süt 05ç-11 Ss	A-02	P9	-	-	P, T
52	Deri 16ç-01 Sd	L-01	P1	1	12 kb	P, T
53	Bakıcı 12ç-Bb	L-02	P1	1	12 kb	P, T
54	Deri 20ç-07 Sd	A-15	P1	1	12 kb	P, T
55	Deri 16ç-01 Sd	B-04	P2	2	5 kb,10 kb	P, T
56	Deri 07ç-03 Sd	C	P3	3	5 kb,12 kb, 19 kb	P, T
57	Bakıcı 15ç-Bb	D	P1	1	12 kb	P, T, E
58	Bakıcı 11ç- Be	E-01	P1	1	12 kb	P, T, Ox
59	Bakıcı 11ç- Bb	J	P1	1	12 kb	P, T, E, Ox
60	Süt 05ç-17 Ss	A-17	P1	1	12 kb	P, E
61	Bakıcı 10ç-Bb	G-01	P9	-	-	P, E, Enr, Ox
62	Süt 07-06 Ss	A-13	P1	1	12 kb	P, T
63	Deri 07ç-09 Sd	C	P1	1	12 kb	P, T

64	Deri 10ç-02 Sd	B-06	P1	1	12 kb	P, T
65	Deri 10ç-02 Sd	M	P1	1	12 kb	P, T
66	Deri 06ç-08 Sd	A-13	P1	1	12 kb	P, T
67	Deri 06ç-08 Sd	A-13	P1	1	12 kb	P, T
68	Deri 11ç-02 Sd	B-05	P1	1	12 kb	P, T
69	Deri 07ç-10 Sd	A-20	P2	2	5 kb,10 kb	P, T
70	Deri 07ç-10 Sd	A-20	P2	2	5 kb,10 kb	P, T
71	Bakıcı 10ç-Be	B-03	P2	2	5 kb, 10 kb	P, T
72	Deri 10ç-01 Sd	A-02	P2	2	5 kb,10 kb	P, T
73	Deri 10ç-03 Sd	A-02	P2	2	5 kb,10 kb	P, T
74	Süt 10ç-03 Ss	A-04	P2	2	5 kb,10 kb	P, T
75	Deri 10ç-04 Sd	A-01	P2	2	5 kb,10 kb	P, T
76	Süt 10ç-04 Ss	A-05	P2	2	5 kb,10 kb	P, T
77	Burun 10ç-05 Sb	A-01	P2	2	5 kb,10 kb	P, T
78	Deri 11ç-01 Sd	A-07	P2	2	5 kb,10 kb	P, T
79	Süt 11ç-04 Ss	A-05	P2	2	5 kb,10 kb	P, T
80	Süt 15ç-01 Ss	B-04	P6	2	3 kb, 10 kb	P, T
81	Süt 15ç-01 Ss	B-04	P6	2	3 kb, 10 kb	P, T
82	Süt 02ç-17 Ss	A-06	P4	3	1,8 kb, 2 kb, 10 kb	P, T
83	Deri 07ç-10 Sd	A-16	P3	3	5 kb,12 kb, 19 kb	P, T
84	Burun 07ç-10 Sb	C	P3	3	5 kb,12 kb, 19 kb	P, T
85	Deri 10ç-01 Sd	A-02	P3	3	5 kb,12 kb, 19 kb	P, T
86	Deri 10ç-02 Sd	A-02	P3	3	5 kb, 12 kb, 19 kb	P, T
87	Süt 20ç-08 Ss	A-06	P3	3	5 kb, 12 kb, 19 kb	P, T
88	Bakıcı 07ç-Bb	C	P3	3	5 kb,12 kb ,19 kb	P, T
89	Süt 03ç-01 Ss	A-06	P8	4	3 kb, 8 kb, 12 kb, 16 kb	P, T
90	Deri 10ç-02 Sd	B-06	P8	4	3 kb, 8 kb, 12 kb, 16 kb	P, T
91	Süt 10ç-06 Ss	A-02	P1	1	12 kb	P, T, E
92	Bakıcı 07ç-Bb	C	P1	1	12 kb	P, T, E
93	Deri 10ç-01 Sd	B-04	P2	2	5 kb, 10 kb	P, T
94	Süt 02ç-14 Ss	A-03	P1	1	12 kb	T
95	Süt 02ç-01 Ss	A-03	P1	1	12 kb	T
96	Süt 02ç-17 Ss	A-06	P4	3	1,8 kb, 2 kb, 10 kb	T, E

P: penisilin, T: tetrasiklin, E: eritromisin, Ox: oksasilin, Enr: enrofloksasilin 01ç-02 Ss: Birinci çiftlik, ikinci sığır süt, 01ç-07 Sd: Birinci çiftlik, yedinci sığır deri, 07ç-10 Sb: Yedinci çiftlik, onuncu sığır burun, 10ç-Bb: Onuncu çiftlik, bakıcı burun, 15ç-Be: Onbeşinci çiftlik, bakıcı el.

Mastitisli inek sütlerinden izole edilen *S. aureus* izolatları 6 ana gruba ve 23 farklı pulstotipe ayrıldı. A pulstotipi 10 işletmede de belirlenen yaygın bir *S. aureus* klonu olarak saptandı. İnek meme başı derisi ve inek burun kökenli izolatlar (38) 19 farklı pulstotipe, bakıcılarından elde edilen *S. aureus* izolatları ise (12) 8 farklı pulstotipe ayrıldı. B pulstotipi 4 işletmede belirlenirken, E, F, G ve M pulstotipleri yalnızca bir işletmede saptandı. Ayrıca bir işletmede en fazla dört farklı pulstotip belirlendi. Bir işletmede üç farklı pulstotip, iki işletmede iki farklı pulstotip ve yedi işletmede ise bir pulstotip belirlendi.

Süt sığırcılığı işletmelerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının çoğunluğunun (%58.3) A grubunda yer aldığı belirlendi. Ayrıca A pulstotipinde gruplandırılan izolatlar 12 farklı işletmeden izole edildi.

Çalışmada incelenen 96 *S. aureus* izolatının, antibiyotik direnç özellikleri, plazmid profilleri ve pulstotipleri Tablo 1'de verilmiştir.

Tartışma ve Sonuç

Stafilokoklar, hayvanlarda ve insanlarda önemli enfeksiyonlara neden olmaktadır ve son yıllarda

MRSA'ların izolasyonunda meydana gelen artışlar, stafilokok enfeksiyonlarının ve antibiyotiklere karşı mikroorganizmalardaki direnç gelişiminin kontrolü için etkili stratejiler geliştirmek gereğini ortaya çıkarmıştır. Bu nedenle, *S. aureus* epidemiyolojisinin, patogenezinin ve popülasyon genetiğinin iyi bilinmesi gerekmektedir.

Arda ve İstanbulluoğlu (4), 60 *S. aureus* izolatının penisiline %75, eritromisine %50, tetrasikline %70, gentamisine %60 oranlarında dirençli olduklarını tespit etmişlerdir. Hadimli ve ark. (10), yaptıkları bir çalışmada 107 stafilokok suşunun penisilin direncini % 61,7 olarak bildirmişlerdir. Aydın ve ark. (6) Kars ilinde yaptıkları çalışmada *S. aureus* izolatlarında penisilin direnci %82, tetrasiklin direnci %67, enrofloksasin direnci %10 olarak bildirmişlerdir. Sunulan bu çalışmada ise izolatların penisilin direnci % 80.4 (37), tetrasiklin direnci %26.1 (12), eritromisin direnci % 4.3(2) olarak belirlenirken diğer antibiyotiklere direnç belirlenmedi. Penisilin direnciyle ilgili değer diğer çalışmalara benzerlik gösterirken, diğer antibiyotiklere karşı bu çalışmada elde edilen direnç düzeyleri ülkemizde bu antibiyotikler için bildirilenlerden daha düşük olmuştur. Bu durumun Kırıkkale ve çevresindeki yetiştiricilik uygulamalarındaki

farklılıklardan (örneğin ineklerde daha az antibiyotik kullanımı, işletmelerin küçük olması gibi) kaynaklandığı düşünülmektedir.

Vintov ve ark. (25) dokuz Avrupa ülkesi ve ABD’de mastitisli inek sütlerinden izole ve identifiye edilen 815 *S. aureus* izolatının çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıklarını incelemişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre, İskandinav ülkelerinde (Danimarka, Norveç, İsveç) penisilin direnci düşük, Amerika, İngiltere ve İrlanda gibi ülkelerde çok yüksek tespit edilmiştir. Bu farklılık, bu ülkelerde uygulanan antimikrobiyal politika farklılıklarından kaynaklanabilmektedir.

Uçan ve Aslan (22), 75 *S. aureus* izolatından bir tanesinde metisilin direnci saptamışlardır. Hadimli ve ark. (10), 78 *S. aureus* izolatının 14 tanesinin MRSA olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmalarda metisilin direnci oksasilin diski kullanılarak Kirby-Bauer Disk Difüzyon metodu ile belirlenmiştir. Sunulan bu çalışmada ise 96 *S. aureus* izolatının metisilin direnci, oksasilin (1µg) diski, sefoksitin diski (30 µg) ile disk difüzyon metodu ve ayrıca oksasilinli agar tarama plağı ile değerlendirilmiş ve Etest metodu ile de MİK’leri belirlenmiştir. Günümüzde metisilin direncinin belirlenmesinde tek başına oksasilin diski yeterli kabul edilmemektedir. Sefoksitin diskinin kullanımı, MİK’lerin belirlenmesi ve *mecA* geninin varlığının da PCR ile doğrulanması gerekmektedir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre inek kökenli izolatların tümü metisiline duyarlı bulunmuş, ancak 12 bakıcı kökenli izolatın 3 tanesinde metisilin direnci belirlenmiştir. Metisiline dirençli suşlar sefalosporinler de dahil tüm β-laktam antibiyotiklere dirençlidirler. β-laktamazlara dayanıklı olan antibiyotiklere direnç gelişimi Veteriner Hekimlikte henüz bir sorun teşkil etmezken, bu antibiyotiklerin kullanımının artmasıyla birlikte direnç gelişimi görülebileceği belirtilmektedir. Bu nedenle mastitis tedavisinde metisilin direncinin önemli bir faktör olarak dikkate alınmasının yararlı olacağı düşünülmektedir.

Plazmid profil analizi hızlı, kolay ve tekrarlanabilirliği olan bir yöntemdir (18). *S. aureus* plazmidlerinin çok sabit olmaması yani plazmidlerini çabuk kaybedebilmeleri veya kazanabilmeleri nedeniyle aynı işletmeden izole edilen *S. aureus* suşları arasında küçük farklılıklar olmaktadır. Plazmid taşımayan suşların tiplendirilmesi yapılamayacağı gibi az sayıda (1-2) plazmid taşıyan suşlar için bu yöntemin ayırt etme gücü zayıftır.

Yapılan çeşitli çalışmalarda (5, 14) plazmid tespit edilen izolatların çeşitli antibiyotiklere dirençli oldukları belirlenmiştir. *S. aureus* izolatlarındaki antibiyotik direncinin plazmidler üzerindeki direnç genleriyle kodlandığı vurgulanmıştır (17). Bu çalışmada da benzer şekilde dirençli izolatların çoğunluğunun plazmid taşıması *S. aureus* izolatlarında antibiyotik direnci ile

plazmidler arasında bir bağlantının olduğunu desteklemektedir.

Hennekinne ve ark. (11), kesimhanelerde kasap burunlarından, domuz, tavşan, kanatlı etlerinden, Veteriner fakültesi öğrencilerinden, domuz burunlarından, mastitisli inek sütlerinden ve kanatlılardan izole ettikleri 73 adet *S. aureus* izolatının makrorestriksiyon analizini yapmışlar ve 61 PFGE paterni belirlemişlerdir. Sığır kökenli suşların bir alt kümede toplandığını bildirmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre aynı türden köken alan suşların aynı pulstotip içerisinde yer aldıklarını ve pulstotip ile tür arasında yüksek korelasyon olduğunu ortaya koymuşlardır. Sunulan bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre bakıcıların el ve burunlarından izole edilen *S. aureus* izolatları ile mastitisli ineklerin sütlerinden ve meme başı derilerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının benzer pulstotipte oldukları belirlenmiştir. Ancak ineklerin meme başı derisi ve sütlerinden izole edilen 56 adet (%58) izolatın A pulstotipinde tiplendirilmesi ve bu tipte hiç bakıcı kökenli izolatın bulunmaması *S. aureus* izolatlarının tür özgüllüğünün olduğunu ve yalnızca bazı *S. aureus* izolatlarının hem insan hem ineklerde kolonize olabilecekleri düşünülmektedir.

Vautor ve ark. (24), keçi sütlerinden üretilen peynirlerden izole edilen *S. aureus*’larla sağım işlemini yapan insanların ellerinden izole edilen *S. aureus*’ların aynı pulstotipte bulunduğunu belirlemişler ve sağımçıların ellerinin bir çiftlikte *S. aureus* bulaşmasında rol alabildiklerini belirtmişlerdir. Zadoks ve ark. (27), 70 adet inek meme başı derisi, 4 adet sağımçı eli, 34 adet sağım makinası ve 117 adet inek sütü kökenli *S. aureus* izolatlarını PFGE metodu ile tiplendirmişlerdir. Meme başı derisinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının inek sütü izolatlarından farklı, bakıcıların ellerinden izole edilen az sayıdaki izolatlarla ise aynı pulstotipte olduklarını belirlemişlerdir. İnsan izolatlarının inek meme başı derisine bulaşmasında süt sağım makinalarının rol alabileceğini ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada ise inek meme başı derisinden izole edilen *S. aureus* izolatları ile mastitisli inek sütlerinden izole edilen *S. aureus* izolatları genetik olarak yakın ilişkili bulunmuştur. Bu durumun bölgede elle sağımın yapıldığı küçük aile tipi işletmelerinin yaygın olmasından dolayı mastitisli ineklerin sütlerindeki patojen etkenlerin sağım işlemi sırasında meme başı derisine ve diğer hayvanlara bulaştığını düşündürmektedir. Ayrıca bu çalışmada süt sığırcılığı işletmelerinde, infekte ineklerin memelerinin sürüdeki diğer hayvanlara *S. aureus* bulaşmasında önemli rol oynadığı gösterilmiştir.

PFGE analizleriyle, Stephan ve ark. (20) İsviçre’nin kuzey doğusunda, Annemüeller ve ark. (1) Almanya’nın bir bölgesinde ve bu çalışmada da Kırıkkale ve

çevresindeki ineklerde subklinik mastitislerden benzer *S. aureus* 'ların sorumlu olduğu ortaya konulmuştur.

PFGE, ayırım gücü ve tekrarlanabilirliği yüksek olan güvenilir bir genotiplendirme metodudur. Bu yöntem tekrarlanabilirlik özelliğinin yüksek olması nedeniyle moleküler yöntemler içerisinde altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak masraflı olması, pahalı ekipmanlara gerek olması, zaman alıcı olması, zahmetli olması ve sonuçların yorumlanmasının zor olması gibi dezavantajları bulunmaktadır (14, 26).

Bu çalışmada elde edilen moleküler veriler, ülkemizin diğer bölgelerinde gerçekleştirilecek çalışmalardan elde edilecek verilerle birlikte değerlendirilerek mastitis enfeksiyonunun kontrolünde yararlanılacak etkili aşular geliştirilmesinde yardımcı olabilir.

Sunulan çalışmada elde edilen verilere göre Kırıkkale ve çevresinde ineklerde mastitislerden sorumlu *S. aureus* izolatlarının aynı bant paternlerinde oldukları ve bu izolatların bakıcılardan izole edilenlerden farklı oldukları gösterilmiştir.

Kaynaklar

1. **Annemüeller C, Lammler CH, Zschock M** (1999): *Genotyping of Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis*. Vet Microbiol, **69**, 217–224.
2. **Anonim** (2006): xlstat statistic program (<http://www.xlstat.com>, Erişim Tarihi: 15.05. 2006)
3. **Arbeit RD** (1999): *Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms*. 116-137. In: Manual of Clinical Microbiology PR Murray, EJ Baron, MA Pfaller, FC Tenover and RH Tenover (Ed), 7rd ed, ASM press, Washington USA.
4. **Arda M, İstanbulluoğlu E** (1979): *Mastitislere neden olan aerob, anaerob, mikoplazma ve mantarların izolasyonu, identifikasyonu, bunlara karşı etkili olan antibiyotik ve fungusitlerin saptanması*. Ankara Üniv Vet Fak Derg, **26**, 14–29.
5. **Aslantaş Ö, Öztürk F, Çelebi A, Açık L, Ergün Y** (2006): Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from subclinic bovine mastitis by protein patterns, antibiotic resistance and plasmid profile Ankara Üniv Vet Fak Derg, **53**, 47–51.
6. **Aydın F, Leloğlu N, Şahin M, Çolak A ve Otlı S** (1995). Kars yöresi süt ineklerinde klinik ve subklinik mastitislere neden olan mikroorganizmaların identifikasyonları ve antibiyotiklere duyarlılıkları üzerine çalışmalar. Pendik Vet Mikrobiyol Derg, **26**, 55–65.
7. **Clinical Laboratory Standards Institute** (2002): *Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard- Second Edition. M31-A2 and M37-A2*. Clinical Laboratory Standards Institute Pennsylvania, USA.
8. **Derbentli Ş** (1996): *Stafilokok ve enterokoklarda antibiyotik duyarlılık deneylerinin özellikleri*. Ankem Derg, **10**, 211–219.
9. **Foster T** (2003): *Staphylococcus*. Erişim: (<http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch012>, Erişim Tarihi: 26.04.2006)
10. **Hadimli HH, Ateş M, Güler L, Kav K, Öncel T** (2001): *Mastitisli süt ineklerinden izole edilen stafilocokların β -laktamaz aktiviteleri ve antibiyotiklere duyarlılıkları* Vet Bil Derg, **17**, 21–25.
11. **Hennekinne JA, Kerouanton A, Brisabois A, De Buyser MI** (2003): *Discrimination of Staphylococcus aureus biotypes by pulsed- field gel electrophoresis of DNA macro-restriction fragments*. J Appl Microbiol, **94**, 321–329.
12. **Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K** (2003): *Insights on antibiotic resistance of S. aureus from its whole genome: genomic island SCC*. Drug Resist Opda, **6**, 41–52.
13. **Kozarsky PE, Rimland D, Terry PM, Wachsmuth K** (1986): *Plasmid analysis of simultaneous nosocomial outbreaks of methicillin resistant Staphylococcus aureus*. Infect Cont, **7**, 577–581.
14. **Lange C, Cardoso M, Senczek D, Schwarz S** (1999): *Molecular subtyping of Staphylococcus aureus from cases of bovine mastitis in Brazil*. Vet Microbiol, **67**, 127–141.
15. **Lencastre H, Cauto I, Santos I, Melo-Cristino J, Torres-Pereira A, Tomasz A** (1994): *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus disease in a Portuguese Hospital: characterization of clonal types by a combination of DNA typing methods*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, **13**, 64–73.
16. **Leonard FC, Markey BK**. (2007): *Meticillin-resistant Staphylococcus aureus in animals: A review*. Vet J, doi: 10.1016/j.tvjl. 2006.11.008.
17. **Lyon BR, Skurray R** (1987): *Antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus: genetic basis*. Microbiol Rev, **51**, 88–134.
18. **Sancak B, Günalp A** (2001): *Metisilin dirençli Staphylococcus aureus izolatların kantitatif antibiyogram ve plazmid profil analizi yöntemleri ile tiplendirilmesi* Mikrobiyol Bült, **35**,11-24.
19. **Soll DR, Lockhart SR, Pujol C** (2003): *Laboratory procedures for the epidemiological analysis of microorganism*. 139–161. In: Manual of Clinical Microbiology PR Murray, EJ Baron, JH Jorgensen, MA Pfaller, RH Tenover (ED). ASM press, Washington.
20. **Stephan R, Annemüeller C, Hassan AA, Lammler CH** (2001): *Characterization of enterotoxigenic Staphylococcus aureus strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland*. Vet Microbiol, **78**, 373–382.
21. **Şener K, Saraçlı MA, Açık CH, Doğanç I** (2004): *Nozokomiyal metisilin dirençli Staphylococcus aureus (MRSA) izolatlarının serotiplendirilmesinde üç ayrı yöntemin incelenmesi*. Mikrobiyol Bült, **38**, 363–375.
22. **Uçan US, Aslan E** (2002): *İnek mastitislerinden izole edilen koagulaz pozitif stafilocok suşlarının penisilin direnci ve bazı antibiyotiklere duyarlılıkları*. Vet Bil Derg, **18**, 19-22.
23. **Ugur A, Ceylan Ö** (2003): *Occurrence of resistance to antibiotics, metals, in clinical strains of Staphylococcus aureus spp*. Arch Medical Res, **34**, 130–136.

24. **Vautor E, Abadie G, Guibert JM, Huard C, Pepin M** (2003): *Genotyping of Staphylococcus aureus isolated from sites on farms with dairy sheep using pulsed-field gel electrophoresis*. Vet Microbiol, **96**, 69–79.
25. **Vintov J, Aarestrup FM, Zinn CE and Olsen JE** (2003). *Association between phage types and antimicrobial resistance among bovine Staphylococcus aureus from 10 countries*. Vet Microbiol, **95**, 133–147.
26. **Zadoks RN, Leeuwen W, Kreft D, Barkema H, Sampion O, Verbrugh H, Schukken YH, Belkum A** (2000): *Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human Staphylococcus aureus isolated*. J Clin Microbiol, **38**, 1931–1939.
27. **Zadoks RN; Van Leeuwen WB, Kreft D, Fox LK, Barkema HW, Schukken YH, Belkum A.** (2002): *Comparison of isolates from bovine and human skin, milking equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed- field gel electrophoresis, and binary typing*. J Clin Microbiol, **40**, 3894–3902.

Geliş tarihi: 10.01.2008 / Kabul tarihi: 21.04.2008

Yazışma adresi

Ar. Gör. Dr. Nilgün Ünal

Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yahşihan – Kırıkkale

E mail: nilkarakaya@hotmail.com