

Subklinik Mastitisli İneklerden İzole Edilen Stafilokok Suşlarının Bazı Virulens Faktörleri ve Antibiyotik Direnci

Osman Yaşar TEL Oktay KESKİN

Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji A.D., Şanlıurfa, Türkiye

Geliş tarihi: 08.11.2010

Kabul Tarihi: 17.12.2010

ÖZET

Bu çalışmada subklinik mastitislerden izole edilen 108 adet koagulaz pozitif stafilokok (KPS) ve 50 adet koagulaz negatif stafilokok (KNS) olmak üzere toplam 158 suşun bazı virulens faktörleri [deoksiribonukleaz (DNaz), termonukleaz (TNaz), kapsül, biyofilm üretimi, hemoliz, protein A özellikleri] ve antibiyotiklere dirençleri araştırıldı. Çalışmada, DNaz, TNaz, kapsül, biyofilm, hemoliz sonuçları sırasıyla, KPS izolatlarında 98 (%90), 72 (%66), 62 (%57), 76 (%70), 84 (%77) adedi, KNS izolatlarında ise 4 (%8), 11 (%22), 4 (%8), 26 (%52), 21 (%42) adedi pozitif olarak bulundu. Ayrıca KPS suşlarının 98 (%90)'inde Protein A saptandı. İzole edilen Stafilokokların antibiyotiklere duyarlılıkları Kirby Bauer Disk Difüzyon Yöntemi'ne göre yapıldı. 108 adet KPS suşunun yapılan antibiyogramı sonucunda, 98'i (%90.7) penicillin, 92'si (%85) ampicillin, 30'u (%27.7) norfloxacin, 20'si (%18.5) amoxicillin-clavulanic acid, 13'ü (%12) gentamicin, 12'si (%11) ciprofloxacin, 8'i (%7.4) sulphamethoxazole-trimethoprim, 6'sı (%5.5) oxacillin ve erythromycin, 4'ü (%3.7) tetracycline'e dirençli olarak bulunurken bütün suşlar clindamycin, cefuroxime ve vancomycin'e duyarlı olarak saptandı. KNS suşlarının ise 38'i (%76) penicillin, 30'u (%60) ampicillin, 18'i (%36) erythromycin, 10'u (%20) gentamicin ve tetracycline'e 9'u (%18) amoxicillin-clavulanic acid, 8'i (%16) ciprofloxacin, 5'i (%10) norfloxacin ve 2'si (%4) clindamycin'e dirençli bulunurken oxacillin, cefuroxime, vancomycin ve sulphamethoxazole-trimethoprim'e duyarlı olduğu saptandı. Ayrıca, KPS'lerde saptanan metisilin direnci PCR yöntemiyle doğrulandı.

Sonuç olarak, KPS'lerde KNS'lere göre virulens faktörlerinin yüksek olduğu, bu faktörlerin patojenitede önemli rol oynadığı ve etkenlerin genel olarak penicillin ve ampicillin dışındaki antibiyotiklere duyarlı olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler

Koagulaz Pozitif Stafilokok, Koagulaz Negatif Stafilokok, Virulens Faktörleri, Antibiyotik Direnci

Some Virulence Factors and Antibiotic Sensitivity of Staphylococcal Strains Isolated from Cows with Subclinical Mastitis

SUMMARY

In this study, some virulence factors [deoxyribonuclease (DNase), thermonuclease (TNase), presence of the capsule, biofilm formation and hemolysis] and antibiotic resistance were investigated in a total of 158 *Staphylococcus* strains (108 coagulase positive and 50 coagulase negative *Staphylococcus*) isolated from subclinical mastitis. The rate of positivity for deoxyribonuclease (DNase), thermonuclease (TNase), presence of the capsule, biofilm formation and hemolysis for coagulase positive staphylococcus (CoPS) strains were 98 (90%), 72 (66%), 62 (57%), 76 (70%), 84 (77%) and 4 (8%), 11 (22%), 4 (8%), 26 (52%), and 21 (42%) for coagulase negative staphylococcus (CoNS) strains, respectively. Additionally, protein A was determined at 98 (90 %) CoPS strains. Antimicrobial resistances of isolated 108 CoPS strains were determined by Kirby-Bauer antibiotic disc diffusion test were as follows: 98 (90.7%) penicillin G, 92 (85%) ampicillin, 30 (27.7%) norfloxacin, 20 (18.5%), amoxicillin-clavulanic acid, 13 (12%) gentamycin, 12 (11%) ciprofloxacin, 8 (7.4%) sulphamethaxazole-trimethoprim, 6 (5.5%) oxacillin and erythromycin, 4 (3.7%) tetracycline, respectively. In contrast, all strains were found to be sensitive to Clindamycin, Cefuroxime and vancomycin. Regarding CoNS strains, the numbers and percent of antimicrobial resistance to other antibiotics were as follows: 38 (76%) penicillin, 30 (60%) ampicilline, 18 (36%) erythromycine, 10 (20%) gentamycine and tetracycline, 9 (18%) amoxicillin-clavulanic acid, 8 (16%) ciprofloxacin, 5 (10%) norfloxacin and 2 (4%) clindamycine. In contrast, all strains were sensitive to oxacillin cefuroxime, vancomycin, and sulphamethaxazole-trimethoprim. Methicillin resistance in CoPSs were confirmed by PCR method.

In conclusion, virulence factors in CoPS were higher than those of CoNS. These factors play an important role in pathogenicity and *Staphylococcus* strains were mainly sensitive to antibiotics except penicillin and ampicillin.

Key Words

Coagulase Positive Staphylococcus, Coagulase Negative Staphylococcus, Virulence Factors, Antibiotic Susceptibility

GİRİŞ

Meme bezinin yangısı olarak tanımlanan mastitis, tüm dünyada süt yönlü yetiştiriciliğin en önemli problemidir. Modern işletmelerde uygulanan kontrol programlarına rağmen önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Quinn ve ark. 2004; Aydın ve Paracıkoğlu 2006). Subklinik mastitisler, klinik mastitis olgularına göre daha yaygın olarak bulunmakta ve daha fazla ekonomik kayba neden olmaktadır (Philpot ve Nickerson 1991). Süt sığırcılığı işletmelerinde büyük ekonomik kayıplara neden olan mastitislerin %70'ini subklinik mastitisler oluşturmaktadır (De Graves ve Fetrow 1993). Mastitis olgularında birçok etken izole ve tanımlanmıştır (Türütoğlu ve ark. 1995; Pitkala ve ark. 2004). Sığır mastitislerinden en sık izole edilen etkenlerin başında *Staphylococcus spp.* gelmektedir (Quinn ve ark. 2004; Aydın ve Paracıkoğlu 2006; Tel ve ark. 2009). Stafilkokların hastalık oluşturma potansiyellerinin virulens faktörlerine bağlı olduğu düşünülmektedir. Virulens faktörleri, konak dokuya kolonizasyonu artıran yüzey proteinleri, dokularda bakterinin yayılmasını sağlayan invazinler, hücre dışı enzimler, fagositik aktiviteyi inhibe eden yüzey faktörleri, koagülaz ve biofilm gibi özelliklerden oluşmaktadır (Quinn ve ark. 2004; Aydın ve Paracıkoğlu 2006).

Bu çalışmada subklinik mastitislerden izole edilen KNS ve KPS suşlarında potansiyel virulans faktörlerinden; DNaz, TNaz, kapsül, biyofilm üretimi, hemoliz, protein A, özelliklerinin araştırılması ve etkenlerin antibiyotiklere dirençlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Çalışmada, Şanlıurfa yöresinde subklinik mastitisli ineklerden izole edilen 108 adet KPS ve 50 adet KNS olmak üzere toplam 158 Stafilkok suşu incelendi. İzole edilen KNS ve KPS suşlarında, DNaz, TNaz, kapsül, biyofilm üretimi, hemoliz gibi virulans faktörleri yanında KPS suşlarında Protein A varlığı araştırıldı.

DNaz testi: Bu test için DNaz agar (DNase Agar, CM0321 Oxoid, UK) kullanıldı. Stafilkok suşları DNaz agara ekildi ve 37°C'de 4 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra agar yüzeyine 1 N HCl döküldü. Ekim alanında şeffaf bir zonun görülmesi pozitif olarak değerlendirildi (Feltham ve Barrow 2003).

TNaz testi: Test Hawkey ve ark. (1989)'larının bildirdiği yöntemle yapıldı. Toluidine blue deoxyribonucleic acid agar hazırlandı ve bakteriyel ekimler yapıldı. Testin sonunda "pembe halka" belirlenmesi TNaz aktivitesi varlığı olarak değerlendirildi.

Kapsül boyama: Bir öze dolusu çini mürekkebi ve az miktarda bakteri, lam üzerinde karıştırıldı ve üzerine lamel konarak kapsül varlığı incelendi (Feltham and Barrow 2003).

Biofilm üretimi: Biofilm üretimi Congo Red Agar (CRA) yöntemi ile saptandı (Fremeen ve ark. 1989). Bu test için CRA hazırlandı ve ekimler gerçekleştirildi. İnkübasyon sonucunda kuru kristalize siyah koloniler oluşturan suşlar biofilm pozitif, kırmızı veya pembe renkli koloni oluşturan suşlar ise negatif olarak değerlendirildi.

Hemoliz: Alfa hemoliz tespiti için %5 yıkanmış tavşan eritrositi içeren trypticase soy agar (TSA, L007516, BD, USA) hazırlandı. Geniş zonlu bulanık kenarlı tam hemoliz alanı pozitif olarak değerlendirildi. Beta hemoliz %5 koyun kanlı TSA'da araştırıldı. Keskin kenarlı tam olmayan hemoliz alanı pozitif olarak değerlendirildi. Hemoliz

görülmeyen suşlar da gama hemolitik olarak değerlendirildi (Quinn ve ark. 1994; Koneman ve ark. 1998).

Protein A'nın belirlenmesi: Bu amaçla *S. aureus* suşlarına lateks aglutinasyon kiti (Staphylect Plus, DR0850 Oxoid, UK) uygulandı. Aglutinasyonun olması pozitif olarak kabul edildi.

Antibiyotik Duyarlılıkları: İzole edilen stafilkokların antibiyotiklere duyarlılıkları "Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi" ile Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006) standartlarına göre yapıldı. (Bauer 1966). Antibiyotik duyarlılık testinde, Oxacillin (1 µg), Gentamycine (10 µg), Cefuroxime (30 µg), Vancomycin (30 µg), Erythromycin (15 µg), Clindamycin (2 µg), Amoxicillin- Clavulanic Acid (30 µg), Ampicillin (10 µg), Penicillin G (10 U), Ciprofloxacin (5 µg), Norfloxacin (10 µg), Tetracycline (30 µg) ve Sulphamethaxazole + Trimethoprim (25 µg) (oxoid) olmak üzere toplam 13 farklı antibiyotik diski kullanıldı.

Metisilin Direnci: İzole edilen etkenlerin metisilin dirençleri fenotipik ve genotipik olarak belirlendi. Metisilin direnci fenotipik olarak oksasilin (1 µg) diski kullanılarak disk difüzyon yöntemi ile CLSI standartlarına göre belirlendi.

İzole edilen Stafilkok suşlarından metisilin direncinin genotipik olarak belirlenmesi için DNA izolasyonu Sambrook ve ark (1989)'ları tarafından bildirilen yöntemle yapıldı. İzole edilen DNA'lar kullanılmaya kadar -20 °C'de buzdolabında saklandı. Amplifikasyon için, PCR reaksiyon karışımı; Choi ve ark (2003)'larının bildirdiği yöntemle hazırlandı.

Reaksiyon karışımı; 2 µl template DNA, 4 µl MgCl₂, 200 µM dNTP karışımı, 0.2 µM primerler (Met1, CCT AGT AAA GCT CCG GAA, Met2, CTA GTC CAT TCG GTC CA), 10 µl PCR buffer, 0.5 U Taq DNA polimeraz ve final konsantrasyonu 25 µl olacak şekilde steril distile sudan oluştu. PCR inkübasyonu sıcaklık ve süreleri sırasıyla, 95°C'de 5 dakikalık ilk denatürasyon, 95°C'de 2 dakikalık denatürasyon, 58°C'de 30 saniye primer bağlanması, 72°C'de 30 saniyelik ekstensiyonu içeren 30 siklustan oluştu. PCR sonucunda amplifiye edilen örnekler, % 2'lik jelde elektroforeze tabi tutuldu ve sonuçlar UV Transilluminatörde değerlendirildi (Choi ve ark 2003).

BULGULAR

108 KPS ve 50 KNS suşunda incelenen virulans faktörleri açısından bulunan (DNaz, TNaz, biyofilm, hemoliz, protein A ve kapsül) sonuçlar Tablo 1 'de gösterildi. Çalışmada, DNaz, TNaz, kapsül, biyofilm, hemoliz sonuçları sırasıyla, KPS suşlarında 98 (%90), 72 (%66), 62 (% 57), 76 (%70), 84 (%77), KNS suşlarında ise 4 (%8), 11 (%22), 4 (%8), 26 (%52), 21 (%42) adedi pozitif olarak bulundu. Ayrıca KPS suşlarının 98 (%90)'ünde Protein A varlığı saptandı.

Subklinik mastitisli inek sütlerinden izole edilen 108 adet KPS suşunun yapılan antibiyogramı sonucunda, 6'sı (%5.5) oxacillin, 13'ü (%12) gentamicin, 6'sı (%5.5) erythromycin, 20'si (%18.5) amoxicillin-clavulanic acid, 92'si (%85) ampicillin, 98'i (%90.7) penicillin, 12'si (%11) ciprofloxacin, 30'u (%27.7) norfloxacin, 4'ü (%3.7) tetracyclin ve 8'i (%7.4) de sulphamethoxazole-trimethoprim'e dirençli olarak bulunurken, bütün suşların clindamycin, cefuroxime ve vancomycin'e duyarlı olduğu saptandı. KNS suşlarının ise 10'u (%20) gentamicin, 18'i (%36) erythromycin, 2'si (%4) clindamycin, 9'u (%18) amoxicillin-clavulanic acid, 30'u (%60) ampicillin, 38'i (%76) penicillin, 8'i (%16) ciprofloxacin, 5'i (%10)

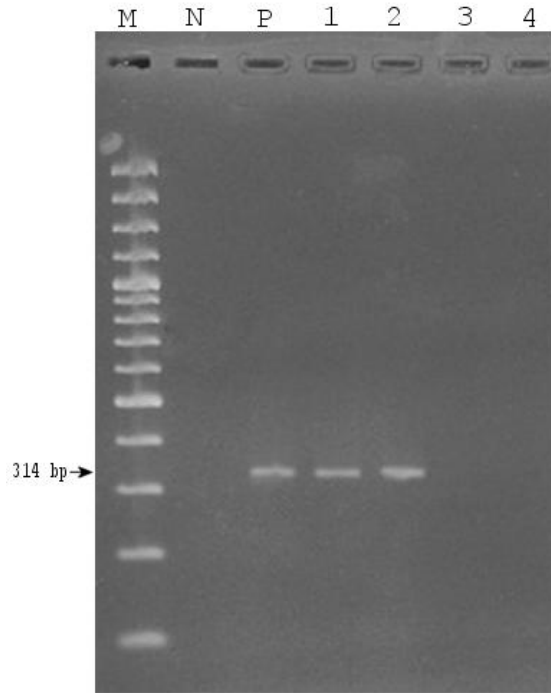
norfloxacin, 10'u (%20) tetracycline'e dirençli bulunurken tamamının oxacillin, cefuroxime, vancomycin ve sulphamethoxazole-trimethoprim'e duyarlı olduğu belirlendi (Tablo 2).

Tablo 2. Stafilokok suşlarının antibiyotik dirençliliklerinin dağılımı.

Table 2. Distribution of antimicrobial resistance in *Staphylococcus spp.*

Antibiyotikler	Dirençli İzolat Sayısı (%)	
	KPS (n:108)	KNS (n:50)
Oxacillin	6 (5.5)	0
Gentamicin	13 (12)	10 (20)
Cefuroxime	0	0
Vancomycin	0	0
Erythromycin	6 (5.5)	18(36)
Clindamycin	0	2 (4)
Amoxicillin-clavulanic acid	20 (18.5)	9 (18)
Ampicillin	92 (85)	30 (60)
Penicillin G	98 (90.7)	38 (76)
Ciprofloxacin	12 (11)	8 (16)
Norfloxacin	30 (27.7)	5 (10)
Tetracycline	4 (3.7)	10 (20)
Sulphamethoxazole-trimethoprim	8 (7.4)	0

KPS: Koagulaz pozitif stafilokok; KNS: Koagulaz negatif stafilokok



Şekil 1. PCR Ürünlerinin Agaroz Jeldeki Görüntüsü. M- 100 bç marker (Fermantas, Litvanya). N, Negatif. P- *S. aureus* ATCC (95047) suşu. 1,2 - *mecA*(+) suş. 3, 4- *mecA*(-) suş.

Figure 1. Agarose gel image of PCR products. M- Gene ruler DNA ladder (Fermantas, Litvanya), P- *S. aureus* ATCC (95047), N- Negative control, 1,2- *mecA*(+) positive strain, 3,4- *mecA*(-) negative strains

Moleküler çalışma sonucunda, fenotipik olarak metisilin dirençli bulunan 6 adet KPS suşun tamamında PCR yöntemiyle *mecA* geni saptanmıştır (Şekil 1).

Tablo 1. Virulens faktörlerinin KPS ve KNS 'lerde dağılımı.

Table 1. Distribution of virulence factors for KPS and KNS

Virulens faktörleri	Pozitif izolat sayısı (%)	
	KPS (n:108)	KNS (n:50)
DNaz	98 (90)	4 (8)
TNaz	72 (66)	11 (22)
Kapsül oluşumu	62 (57)	4 (8)
Biofilm üretimi	76 (70)	26 (52)
Hemoliz	84 (77)	21 (42)
Protein A	98 (90)	-

TARTIŞMA ve SONUÇ

Mastitis, süt veriminde azalma, artan tedavi giderleri, yüksek oranda kesime sevk edilme ve ölümler nedeniyle süt sığırı yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olan meme dokusu hastalığıdır. Sığır mastitislerinden en sık izole edilen etkenlerin başında *Staphylococcus spp.* gelmektedir (Quinn ve ark. 2004; Aydın ve Paracıkoğlu 2006; Tel ve ark. 2009). Bu çalışmada, sığırlarda subklinik mastitis olgularından izole edilen KNS ve KPS suşlarının bazı virulens faktörleri ve antibiyotiklere direnç oranları araştırıldı.

Biofilm üretimi, hemoliz, kapsül ve DNase gibi özellikler Stafilokoklarda virulens faktörleri olarak bildirilmiştir (Aydın ve Paracıkoğlu 2006). Bedini-madani ve ark. (1998), izole ettikleri 165 KNS suşunun 48 (%29)'inde, Berke ve Tilton (1986), 118 *S.aureus* suşunun tamamında TNaz aktivitesi belirlemişlerdir. Başka bir çalışmada TNaz aktivitesi KPS'lerde % 43,3 ve KNS'lerde % 5,6 olarak bulunmuştur (Türkyılmaz ve Kaya 2006). Bu çalışmada KPS suşlarının 72 (%66)'sinin, KNS suşlarının da 11 (%22)'inin TNaz testi pozitif olduğu saptanmıştır. TNaz testinin KPS suşlarında daha yüksek görülmesi araştırmacıların bulgularına benzerdir.

Kapsül hücre duvarını kapsayan polisakarit tabakadan oluşmuştur ve etkenleri fagositozdan koruyan önemli bir virulens faktörüdür. Saa ve ark. (1995)'ları inceledikleri 190 sığır kaynaklı KNS suşunun %7.9'unu, Velazquez-Ordenez ve ark. (2004)'ları, 38 *S. aureus* suşunun %87.5'inin kapsüllü olduğunu saptamışlardır. Başka bir çalışmada kapsül formasyonu KPS'lerde %53.3 ve KNS'lerde %13.3 bulunmuştur (Türkyılmaz ve Kaya 2006). Yapılan çalışmada KPS suşlarının 62 (%57), KNS suşlarının 4 (%8) adedinin kapsüllü olduğu görülmüştür. Bu oranlar karşılaştırıldığında KPS'lerde KNS'ere göre daha yüksek oranda kapsül oluşumu araştırmacıların bulgularına benzerdir ancak kapsül oluşturma oranlarının bölgelere göre farklılık gösterebileceği bildirilmiştir (Tollersrud ve ark. 2000).

Bedini-madani ve ark. (1998)'ları izole ettikleri 165 KNS suşunun 109 (%66)'unu, Morton ve Cohn (1972), 224 *S. aureus* suşunun %99'unu, Eraksoy (1988) ise 167 KPS suşun tamamını DNaz pozitif olarak bulmuşlardır. Çıtak ve ark. (2003)'ları 704 *S. aureus* ve 147 KNS olmak üzere toplam 851 stafilokok izolatını inceledikleri bir araştırmada DNaz aktivitesini, *S. aureus* suşlarında %93.6 ve KNS'lerde %10.2 olarak saptamışlardır. Sonuçlar sunulan çalışmayla uyumludur.

Mastitis izolatlarının %17.5-96.2 oranında α hemoliz ve %65.5-100 oranında β hemoliz oluşturduğu bildirilmiştir

(Jasper ve Jain 1966; Frost 1967; Kenny ve ark. 1992; Matsunaga ve ark. 1993; Calvino ve ark. 1994; Aarestrup ve ark. 1999). Türkyılmaz ve ark. (2006)'ları yaptıkları çalışmada, KPS'lerde %58.9, KNS'lerde %28.9, Hodges ve ark. (1984)'ları KPS'lerde %98.3 ve KNS'lerde %60 oranında hemoliz saptamışlardır. 144 *S. aureus* izolatının incelendiği başka bir çalışmada 132 (%91.6) suşun α hemoliz, 133 (%92.4) suşun β hemoliz gösterdiği saptanmıştır. Araştırmacılar α ve β hemolizin *S. aureus* suşları arasında yaygın olduğunu bildirmişlerdir (Fitzgerald ve ark. 2000). Çalışmalar sığır izolatlarının çoğunun β hemoliz gösterdiğini, α hemolizin değişken olduğunu göstermiştir (Elek ve Levy 1950; Hummel ve ark. 1992). Bu çalışmada KPS suşlarında %77 ve KNS suşlarında %42 oranında α/β hemoliz görülmüştür. Saptanan hemoliz oranları araştırmacıların bulgularına benzerdir.

Stafilokokal protein A (Spa), *S. aureus* suşlarının % 90-95'inde bulunan, hücre duvarına bağlı bir proteindir. (Kronvall ve ark. 1972; Sutra ve Poutrel 1994). Araştırmacılar *S. aureus* suşlarında protein A yönünden %58.6-99.2 oranında pozitiflik belirlemişlerdir (Berke ve Tilton 1986; Matsunaga ve ark. 1993; Yazgı ve ark. 1997; İzgür ve ark. 1988) Bu çalışmada, Staphylect Plus (Oxoid) lateks aglutinasyon kiti ile KPS suşlarının 98 (% 90)'ünün, protein A'ya sahip olduğu saptandı. Elde edilen pozitiflik oranı araştırmacıların bulgularına benzerdir.

Stafilokokların sahip oldukları ekzotoksinler ve yüzey proteinleri yanında, biyofilm üretiminin önemli bir virulens faktörü olduğu bildirilmektedir (Vasudevan ve ark. 2003; Fox ve ark. 2005; Melchior ve ark. 2006). Türkyılmaz ve ark. (2006)'ları, çeşitli hayvansal klinik örneklerden izole ettikleri 180 stafilokok (90 KPS ve 90 KNS) suşunun biyofilm oluşturma yeteneklerini araştırmışlar ve CRA yöntemiyle KPS'lerde %77.8 KNS'lerde ise %44.4 oranında pozitiflik saptamışlardır. Ammendolia ve ark. (1999)'ları, biyofilm pozitiflik oranını KPS %88.9, KNS'lerde %47.8 olarak bildirmiştir. Arciola ve ark. (2001)'ları, *S. aureus* suşlarının (%61) *S. epidermidis*'e (%49) göre daha fazla biyofilm ürettiğini belirtmiştir. Bu çalışmada KPS'lerde %70 ve KNS'lerde %52 oranında pozitiflik görülmüştür. Bu bulgular araştırmacıların bulgularına benzerdir.

Günümüzde hayvanlardan metisilin dirençli stafilokok izolasyonunun giderek arttığı bildirilmiştir (Leonard ve Markeley 2008). Türkiye'de mastitisli süt örneklerinde metisilin direncinin incelendiği çalışmalarda; Uçan ve Aslan (2002), Konya bölgesinde yaptıkları bir çalışmada 75 *S. aureus* izolatından birinin, Hadimli ve ark. (2001)'ları, 78 *S. aureus* izolatının 14'ünün metisilin dirençli olduğunu belirtmişlerdir. Yaptıkları çalışmada, Kireççi ve Çolak (2002), 2 (%8.7), Kaynarca ve Türkyılmaz (2010), 16 (%10.4), Yoshida ve ark. (1998)'ları 4 (%5) metisilin dirençli suş izole etmişlerdir. Bu çalışmada incelenen KPS suşlarından 6'sı (%5.5) metisilin dirençli olarak bulunurken KNS suşlarında metisilin direnci saptanmamıştır. Araştırmalarda, düşük oranda bildirilen metisilin direnci, sunulan çalışmada elde edilen oranlarla uyumludur (Yoshida ve ark. 1998; Gentilini ve ark. 2000; Hadimli ve ark. 2001).

Tedavi için uygun antibiyotiğin seçiminde bakteriyel identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık testleri önemlidir. Konya'da Güler ve ark. (2004)'ları, izole ettikleri 235 stafilokok suşunun %63 oranında penicillin ve ampicillin, %27.9 oxytetracycline, %1.8 oranında trimethoprim-sulfamethoxazole'e dirençli olduğunu, amoxicillin-clavulanic acid, oxacillin, enrofloxacin ve kanamycin-

cephalexin'e ise direnç bulunmadığını bildirmişlerdir. Aydın ve ark. (1995)'ları, Kars ilinde yaptıkları çalışmada *S. aureus* izolatlarında penicillin direncini %82, tetracycline direncini %67, enrofloxacin direncini %10 olarak belirlemişlerdir. Hadimli ve ark. (2001)'ları, Konya'da yaptıkları çalışmada penicillin direncini %61.7 olarak bildirmiştir. Ünal ve İstanbulluoğlu (2009), yaptıkları çalışmada, *S. aureus* suşlarında penicillin direncini %80.4, tetracycline direncini %26.1, eritromycin direncini %4.3 olarak belirlerken, gentamicin, enrofloxacin, rifampin, trimethoprim-sulfamethoxazole, oxacillin, vancomycin, cefalotin ve linezolid'e tüm izolatların duyarlı bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada en fazla direnç penicilline karşı görülmüştür. Bunu ampicillin, norfloxacin izlemiştir. Penicillin direncinin yüksekliği diğer araştırmacıların bulgularına benzer olmakla beraber, penicillin preparatlarının mastitiste sıklıkla kullanılmasının sonucu olarak β -laktamaz enzimlerinin yayılımı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Goel ve ark. 1991; Pathak ve ark. 1994; Mohan ve ark. 2002).

Sonuç olarak, KPS'larda KNS'lara göre virulens faktörlerinin daha yüksek oranda bulunduğu, bu faktörlerin patojenitede önemli rol oynadığı ve genel olarak etkenlerin penicillin ve ampicillin dışındaki antibiyotiklere duyarlı olduğu saptandı. Metisilin direncinin bölgede veteriner hekimlik açısından henüz sorun oluşturacak düzeyde olmadığı, ancak antibiyotik kullanımının artmasıyla birlikte direnç gelişimine bağlı problemlerin ortaya çıkabilme olasılığı nedeniyle göz ardı edilmemesi gerektiği kanısına varıldı.

KAYNAKLAR

- Aarestrup EM, Larsen HD, Eriksen NHR, Elsberg CS, Jensen NE (1999). Frequency of α and β haemolysin in *Staphylococcus aureus* of bovine and human origin. *APMIS*, 107, 425-30.
- Ammendolia MG, Di Rosa R, Montanaro L, Arciola CR, Baldassari L (1999). Slime production and expression of the slime-associated antigen by staphylococcal clinical isolates. *J Clin Microbiol*, 37, 3235-3238.
- Arciola CR, Baldassari L, Montanaro L (2001). Presence of ica A ve ica D genes and slime production in a collection of *Staphylococcal* strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol*, 39, 2151-2156.
- Aydın F, Leloğlu N, Şahin M, Çolak A, 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.
- Aydın N, Paracıoğlu J. (2006). Veteriner Mikrobiyoloji, İlke-Emek Yayınları, Ankara.
- Bauer AU, Kirby WM, Sherris JC, Tack M (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *J Clin Pathol*, 45, 493-494.
- Bedidi-Madani N, Greenland T, Richard Y (1998). Exoprotein and slime production by coagulase-negative staphylococci isolated from goat's milk. *Vet Microbiol*, 59, 139-145.
- Berke A, Tilton RC (1986). Evaluation of rapid coagulase methods for the identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, 23(5), 916-919.
- Calvino LF, Dodd K (1994). Frequency and distribution of haemolysins of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk in Ireland. *Irish Vet J*, 47, 53-57.
- Choi SM, Kim S, Kim H, Lee DG, Choi JH, Yoo JH, Kang JH, Shin WS, Kang MW (2003). Multiplex PCR for the detection of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes and methicillin resistance among *Staphylococcus* species. *J Korean Med Sci*, 18, 631-636.
- CLSI (2006). Clinical and laboratory standards institute performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 15th informational supplement. Approved Standard, MS100-S16, Wayne, PA, USA.
- Çatak S, Varlık Ö, Gündoğan N (2003). Slime production and DNase activity of staphylococci isolated from raw milk. *J Food Safety*, 23, 219-229.
- De Graves FJ, Fetrow J (1993). Economics of mastitis control, *Vet Clin North Am: Food Animal Practice*. 9, 421-434.

- Elek SD, Levy E (1950).** Distribution of haemolysins in pathogenic and non-pathogenic staphylococci. *J Pathol Bacteriol*, 62, 541-554.
- Eraksoy H (1988).** Klinik mikrobiyoloji laboratuvarında *Staphylococcus aureus*'un identifikasyonu. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 18, 122-128.
- Feltham RKA, Barrow GI (2003).** Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria. Cambridge University Press. Cambridge, United Kingdom.
- Fitzgerald JR, Hartigan PJ, Meaney WJ and Smyth CJ (2000).** Molecular population and virulence factor analysis of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infection. *J Appl Microbiol*, 88, 1028-1037.
- Fox LK, Gershman M, Hancock DD, Hutton CT (1991).** Fomites and reservoirs of *Staphylococcus aureus* causing intramammary infections as determined by phage typing; the effect of milking time hygiene practices. *Cornell Vet*, 81, 183-193.
- Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT (1989).** New method for detecting slime producing by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol*, 42, 872-874.
- Frost AJ (1967).** Haemolysin production from bovine staphylococci. *Aust J Exp Biol Med Sci*, 45, 449-452.
- Gentilini E, Denamiel G, Llorente P, Godaly S, Reuelto M, De Gregorio O (2000).** Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. *J Dairy Sci*, 83, 1224-1227.
- Goel MM, Singh AV, Mathur SK, Singhal S, Chaturvedi UC (1991).** Resistant coagulase negative staphylococci from clinical samples. *Indian J Med Res*, 93, 350-352.
- Güler L, Ok Ü, Gündüz K, Gülcü Y, Hadimli HH (2005).** Antimicrobial susceptibility and coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis cases in Turkey. *J Dairy Sci*, 88, 3149-3154.
- Hadimli HH, Ateş M, Güler L, Kav K, Öncel T (2001).** Mastitisli süt ineklerinden izole edilen stafilokokların β -Laktamaz aktivite ve antibiyotiklere duyarlılıkları. *Vet Bil Derg*, 17, 21-25.
- Hawkey PM, Lewis DA (1989).** *Staphylococcus spp.* In Medical Bacteriology: a practical approach. 1st ed. Oxford, IRL Press, England.
- Hodges RT, Jones YS, Holland JTS (1984).** Characterization of *Staphylococci* associated with clinical and subclinical bovine mastitis. *N Z Vet J*, 32, 141-145.
- Hummel R, Devriese LA, Lehmann G (1992).** Characteristics of bovine *Staphylococcus aureus* with special regard to clumping factor activity. *Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis*, 276, 487-492.
- Izgür M, Akay Ö, Uslanoğlu B Erganiş O (1988).** Mikrotiter plate'leri kullanarak insanlardan izole edilen *S.aureus* suşlarının Protein A ve koagulaz aktivitelerinin tanımlanması. *Infek Derg*, 2, 397-407.
- Jasper DE, Jain NC (1966).** Hemolytic behaviour of staphylococci isolated from cows' milk. *Can J Comp Med Vet Sci*, 30, 63-70.
- Kaynarca S, Türkyılmaz S (2010).** Sığır mastitislerinden izole edilen stafilokoklarda metisilin direnci ve slaym pozitifliği. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16, 567-572.
- Kenny K, Bastida FD, Norcross NL (1992).** Secretion of alpha-hemolysin by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus*. *Can J Vet Res*, 56, 265-268.
- Kırkan Ş, Göksoy EÖ, Kaya O (2005).** Identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci from bovine mastitis in the Aydın region of Turkey. *Türk J Vet Anim Sci*, 29, 791-796.
- Kireççi E, Çolak A (2002).** Kuru dönem başlangıcında subklinik mastitisli ineklerden izole edilen stafilokok suşlarında metisilin direnci. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 8, 98-100.
- Koneman EW, Allen SD, Dowell VR, Sommer HM (1988).** Diagnostic Microbiology. 5th ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia, USA.
- Kronvall G, Holmberg O, Ripa T (1972).** Protein A in *Staphylococcus aureus* strains of human and bovine origin. *Acta Pathol Microbiol Scand (B)*, 80, 735-742.
- Sutra L, Poutrel B (1994).** Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol*, 40, 79-89.
- Leonard FC, Markey BK (2007).** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: A review. *Vet J*, 175, 27-36.
- Matsunaga T, Kamata S, Kakiichi N, Uchida K (1993).** Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. *J Vet Med Sci*, 55, 297-300.
- Melchior MB, Fink-Gremmels J, Gastra W (2006).** Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. *J Vet Med B*, 53, 326-332.
- Mohan U, Jindal L, Aggarwal P (2002).** Species distribution and antibiotic sensitivity pattern of coagulase negative *Staphylococci* isolated from various clinical specimens. *Indian J Med Microbiol*, 20, 45-46.
- Morton HE, Cohn J (1972).** Coagulase and deoxyribonuclease activities of staphylococci isolated from clinical sources. *Appl Microbiol*, 23, 725-733.
- Pathak J, Udgaonkar U, Kulkarni RD, Pawan SW (1994).** Study of coagulase negative staphylococci and their incidence in human infections. *Indian J Med Microbiol*, 12, 90-95.
- Philpot WN, Nickerson SC (1991).** Mastitis: Counter Attack, Babson Bros Co., Naperville, U.S.A.
- Pitkala A, Haveri M, Pyorala S, Myllys V, Honkanen-Buzalski T (2004).** Bovine mastitis in Finland 2001-prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *J Dairy Sci*, 87, 2433-2441.
- Quinn PJ, Carter ME, McKey B, Carter GR (1994).** Clinical Veterinary Microbiology. Spain, Wolfe Pub.
- Saa E, Kruze J (1995).** Virulence factors of coagulase-negative staphylococcus of human and bovine origin. *Rev Latinoam Microbiol*, 37, 201-208.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989).** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed., Cold Spring Harbor Press, New York.
- Tel OY, Keskin O, Zonturlu AK, Arserim Kaya NB (2009).** Şanlıurfa yöresinde subklinik mastitislerin görülme oranı aerobik bakteri izolasyonu ve duyarlı antibiyotiklerin belirlenmesi. *F Ü Sağ Bil Vet Derg*, 23, 101 - 106.
- Tollersrud T, Kenny K, Reitz AJ, Lee JC (2000).** Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus spp.* from Europe and the United States. *J Clin Microbiol*, 38, 2998-3003.
- Türkyılmaz S, Kaya O (2006).** Determination of some virulence factors in *Staphylococcus spp.* isolated from various clinical samples. *Türk J Vet Anim Sci*, 30, 127-132.
- Türütoğlu H, Ateşoğlu A, Salihoğlu H, Öztürk M (1995).** Marmara bölgesi süt ineklerinde mastitise neden olan aerobik etkenler. *Pendik Vet Mikrobiyol Derg*, 26, 125-137.
- Uçan US, Aslan E (2002).** İnek mastitislerinden izole edilen koagulaz pozitif stafilokok suşlarının penisilin direnci ve bazı antibiyotiklere duyarlılıkları. *Vet Bil Derg*, 18, 19-22.
- Ünal N, İstanbulluoğlu E (2009).** İnsan ve sığır kökenli *Staphylococcus aureus* izolatlarının fenotipik ve genotipik özelliklerinin araştırılması. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 56, 119-126.
- Velazquez Ordonez V, Oaxaca JS, Alonso Fresan MU, Bernabe SL, Enriquez E (2004).** Phenotypical expression of *Staphylococcus aureus* virulence factors isolated from dairy cows with subclinical mastitis. International Society for Animal Hygiene - Saint-Malo.
- Vasudevan P, Nair MKM, Annamalai T, Venkitanarayanan KS (2003).** Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet Microbiol*, 92, 179-185.
- Yazgı H, Ayyıldız A, Aktaş EA, Aktaş O, Yiğit N, Görgün S (1997).** Bölgemizde çeşitli klinik örneklerden soyutlanan *Staphylococcus* suşlarının "Slime faktör" ve "Protein A" yönünden incelenmesi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 27, 10-13.
- Yoshida M, Kashiwagi Y, Okuda M, Tsumagari F (1998).** Differentiation of coagulase negative staphylococci (CNS) from cases of bovine mastitis and their antibiotic sensitivity. *J Vet Med*, 51, 893-896.