ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MASTİTİSLİ İNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SUŞLARININ REP-PCR İLE TİPLENDİRİLMESİ

Ali İhsan ALBAYRAK

Selçuk Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Kuddisi ERTUĞRUL

2007, 29 Sayfa

Jüri : Prof. Dr. Kuddisi ERTUĞRUL

: Yrd. Doç. Dr. Emine ARSLAN

:Yrd. Doç. Dr. Birol ÖZKALP

Mastitis, sütçülük işletmelerinde giderlerin artması ve süt veriminin azalması gibi sonuçlara yol açarak önemli ekonomik kayıplara sebep olan yangısal bir bozukluktur. *Staphylococcus aureus*, mastitis`e sebep olan etken organizmalar arasında ilk sıralarda yer alır. Bu çalışmada, Konya Bölgesi'ndeki mastitisli ineklerden izole edilen 44 *S. aureus* ve yedi *S. intermedius* suşunun akrabalık derecelerinin REP-PCR yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır. REP-PCR sonucunda 500-3000 bp büyüklüklerinde ve 2-6 arasında değişen sayılarda bantlar gözlemlenmiştir. Bu REP profillerine göre çıkarılan dendrogramda *S. aureus* ve *S. intermedius* suşları arasındaki genetik akrabalık %9-82 oranında bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Mastitis, *Staphylococcus aureus*, REP-PCR

ABSTRACT

Master Thesis

TYPING OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* STRAINS ISOLATED FROM BOVINE MASTITIS WITH REP-PCR METHOD

Ali İhsan ALBAYRAK

Selcuk University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Kuddisi ERTUĞRUL

2007, 29 pages

Jury : Prof. Dr. Kuddisi ERTUĞRUL

: Yrd. Doç. Dr. Emine ARSLAN

:Yrd. Doç. Dr. Birol ÖZKALP

Mastitis is an inflammatory anomaly which results economic losses by factors like increase in prices at small dairies and decrease in milk production. *Staphylococcus aureus* is one the most effective factors which cause mastitis disease. The aim of this study was to determine of the relationship degree by REP-PCR between 44 *S. aureus* and seven *S. intermedius* strains isolated from bovines mastitis from Konya region. As a result, 500-3000 bp sized, 2-6 REP-PCR bands were observed. After obtaining a dendrogram from these REP profiles, it is determined that the relationship between *S. aures* and *S. intermedius* was 9-82.

Key Words: Mastitis, REP-PCR, *Staphylococcus aureus*

1. GİRİŞ

Mastitis genellikle memenin süt yapan dokusunun, süt kanallarının ve sütü depolayan kısımlarının tümünde görülebilen yangısal bozukluklar olarak tanımlanmıştır. Mastitisler genelde bakteriler tarafından oluşturulmaktadır. Ancak travmatik sebeplere bağlı olarak da non-enfeksiyoz (travma, sıcak-soğuk, kimyasal ajanlar) mastitisler şekillenebilmektedir (İntaş 1997).

Süt inekçiliğinin en önemli sorunlarından biri olan mastitis birçok bakteriyel (*Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae, Streptococcus dysgalactiae, Streptococcus pyogenes, Staphylococcus aureus, Corynebacterium pyogenes*), mikotik (*Candida*, *Cryptococcus*) ve viral patojen (herpes tipi viruslar) tarafından oluşturulur. Bakteriyel etkenler arasında *Staphylococcus aureus* ilk sıralarda yer alır (Arda ve İstanbulluoğlu 1979, Alaçam ve ark. 1994, Erganiş ve ark. 1995, Hadimli ve ark. 2001).

S. aureus genellikle, 0.8-1µm büyüklükte koklardır (Unat 1985). Kapsüllü ve koagülaz pozitiftirler. Özellikle inek, koyun ve keçide görülen akut yada kronik seyirli mastitis`e neden olurlar (Ülgen 2002).

Aynı zamanda *S. aureus*, dünya çapında %60 oranında sorumlu hastane kaynaklı enfeksiyonlara yol açan önemli bir patojendir. Avrupa`da %1-30 arasında değişen klinik bir problem olup, suşlar geniş bir alana hızla yayılmıştır. Bu patojenin yayılmasının kontrolünde, hastane enfeksiyon kontrol programları öncelik kazanmıştır (Frenay ve ark. 1994, Muto ve ark. 2003). Hızlı epidemiyolojik tipleme, kaynağın identifikasyonu için çok önemlidir ve enfeksiyonun yayılmasında bakterinin gelişimi için detaylı bilginin edinilmesini sağlamıştır (Del Vecchio ve ark. 1995).

S. aureus`un farklı konak koloniler oluşturmada büyük bir yeteneği vardır ve değişik anatomik bölgelerde enfeksiyonlara sebep olmaktadır. İnsanlardan ve

ineklerden izole edilen *S. aureus*`lardaki genotipiksel farklılıklar birçok yazar tarafından gözlemlenmiştir (Kapur ve ark. 1995, Reinoso ve ark. 2004a, Zadoks ve ark. 2000).

S. aureus suşlarının tiplendirilmesinde kullanılan metodun; hızlı, kolay, güvenilir ve yüksek ayırım gücüne sahip olması gerekir. Yapılan çalışmalarda REP-PCR yönteminin güvenilir bir yöntem olduğu kanaatine varmışlardır (Del Vecchio ve ark. 1995). REP-PCR metodu, bakteri kökenlerinin, kodlanmış tekrar dizileri ile hızlı olarak tanımlanmasında kullanılmıştır. Bu dizilerin boyutları her bakteri suşu için spesifiktir (Versalovic ve ark. 1991). REP-PCR bazı araştırmacılar tarafından gram negatif bakterilerde, yakın akraba ilişkisi gösteren suşlarda uygulanmıştır. Öbakteriyel türlerin ve suşların farklılıklarının tanımlanmasında önemli DNA parmak izi oluşturmuştur (Hulton ve ark. 1991, Versalovic ve ark. 1991).

Wieser ve Busse'nin 2000 yılında yaptıkları çalışmada ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) ve BOX-PCR'ın tür düzeyinde *Staphylococcus epidermidis* zincirlerinin hızlı tanımlanması için mükemmel metotlar olduğunu göstermişlerdir. Tür ayırt etmek için ERIC-PCR'ın, BOX-PCR'dan daha iyi bir metot olduğu gözlemlenmiştir. Ancak bu iki PCR metodunun kombinasyonu *Stafilokok* izolatlarının sınıflandırılmasında ve tanımlandırılmasında daha güvenilir sonuçların sağlanacağı kanaatine varılmıştır.

REP ve ERIC bazlı primerler *S. aureus*'un izolatlarının değerlendirilmesinde kullanılmıştır. Sağlam hücrelerle ve çok tekrarlı zincir kapsülleri ile REP-PCR bazlı DNA işaretlemesi doğrudan klinik örneklerden alınan *S. aureus*'un hızlı bir şekilde epidemiyolojik analizine imkan sağlaması gerektiği kanaatine varılmıştır. REP-PCR'ın kültürlenmesi zor organizmalarda epidemiyolojik kaydının yapılabileceğinin mümkün olduğu gözlemlenmiştir (Falkiner 1988, Parker 1978).

Klinik mikrobiyolojide moleküler suş tiplendirme metotları hastane kaynaklı enfeksiyonların %23 oranında azaldığını tespit etmişlerdir (Hacek ve ark. 1999). REP-PCR metodu; bakteriyel genomda ayrıntılı olarak kökenlerinin, kodlanmamış

tekrar sekansları ile hızlı olarak tanımlanmasında kullanılır. Bu sekansların boyutları her bakteri suşu için spesifiktir (Versalovic ve ark. 1991).

REP-PCR analizleri tek merkezli çalışmalarda Stafilokokal genomun çoklu kopya elementlerinin gösterdiği iyi ürün verebilme ve ayrım gücüne dayalı bir metottur (Cunny ve ark. 1996, Deplano ve ark. 1997, Kumari ve ark. 1997, van der Zee ve ark. 1999).

Tekrarlanan genomik diziler, kullanılan spesifik primerler ile REP, ERIC ve BOX PCR yöntemleri genel olarak REP-PCR adı altında toplanmıştır (Louws ve ark. 1994, Martin ve ark. 1992). Elde edilen verilerde gram negatif bakterilerin tanımlanmasında parmak izi yöntemi olarak kullanmışlardır. Bu tekrarlanan elementler birçok bakteri genlerinin bulunduğu ortamda farklı genlerin korunduğu bölgeler oluşturmaktadır (Hulton ve ark. 1991, Martin ve ark. 1992, Stern ve ark. 1984).

Versalovic ve ark. 1991 yılında yaptıkları çalışmada REP-PCR`ı, bakteriyel genomlarda PCR amplifikasyonu ile elde edilmiş tekrar eden DNA dizilerini inceleyerek, DNA parmak izini ortaya koyan bir metot olarak bildirilmiştir. Tekrarlanan dizileri çoğaltan temel polimeraz zincir reaksiyonları, yakın zamanda bulunmuş bir yöntem olmakla beraber, REP sekansları birçok enterik bakteri için tanımlanmıştır (de Bruijn, 1992, Georghiou ve ark. 1992, Gilson ve ark. 1984, Hulton ve ark. 1991, Sharples ve ark. 1990, Stern ve ark. 1984, Versalovic ve ark. 1991, Versalovic ve ark. 1992, Woods ve ark. 1992, Yang ve ark. 1988).

Bu çalışma, diğer birçok moleküler yöntemlere göre daha spesifik olan REP-PCR metodu ile mastitis etkeni *S. aureus* suşlarının tiplendirilmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Mastitis, sütçülük işletmelerinde giderleri arttırarak ve süt veriminde belirgin bir azalmaya sebep olarak önemli ekonomik kayıplara neden olan önemli bir problemdir (Rajala-Schultz ve ark. 1999, Shim ve ark. 2004, Waterman ve ark. 1983).

Mastitise bağlı olarak görülen ekonomik zararlar; sütün atılması, tedavi gideri, veteriner hekim ücreti, mastitisin şekillendiği laktasyon ve takip eden sonraki laktasyondaki süt veriminin düşmesi şeklinde sıralanabilir (Alaçam ve ark. 1986, Baştan 2002, Biggadike 2001, Deveci ve ark. 1994, Rajala-Schultz ve ark. 1999, Rasmussen ve Madsen 2000, Schroeder 1997, Shim ve ark. 2004). Bunun yanında bir işletmedeki günlük sağım sayısının ekonomik olmasını etkileyen faktörlerin başında süt fiyatları, işçilik masrafları ve yem fiyatları gelmektedir (Morrison 2003, Schroeder 1997).

Birçok araştırmaya göre sütçülük işletmelerindeki ineklerin mastitis olgularının çoğuna daha çok *Staphylococcus* ve *Streptococcus* etkenleri sebep olmaktadır (Alaçam ve ark. 1986, Baştan 2002, Biggadike 2001, Deveci ve ark. 1994, Rişvanlı ve Kalkan 2002). İzole edilen etkenlerin içerisinde *S. aureus* tüm dünyada sütçülük işletmelerindeki en sık görülen ve kontrolü en zor olan enfeksiyon etkeni olarak bildirilmektedir (Alaçam ve ark. 1986). Yapılan çalışmalarda da klinik mastitis olguların % 47.45'inin *S. aureus'*tan kaynaklandığı ve bu olguların % 10,8'inin tedaviye rağmen klinik olarak iyileşmediği gözlemlenmiştir (Bademkıran ve ark. 2005).

Stafilokoklar da denen bu cinsteki bakteriler gram pozitif, düzensiz kümeler yapan bazen birer veya ikişer ikişer duran 0.5-1.5µm çapında hareketsiz koklardır. Stafilokoklar kemoorganotrof ve fakültatif anaeropturlar. Birçok karbonhidratları, özellikle oksijen varken parçalarlar. Stafilokoklar sıcak kanlı canlıların deri, deri bezleri parazitleridir (Unat 1985)

S. aureus`un patogenezisinde önemli olan faktörler şunlardır; kapsül yapısı fagositoza karşı korur, fagositik hücreler içinde canlı kalabilir, koagülaz sayesinde antibakteriyellere direnç gösterir, hiyaluronidaz sayesinde vücutta yayılımı kolaylaştırır. İnfeksiyonun başlangıcından sonra meme bezlerinde üreyen *S. aureus* özellikle alfa toksin ve leukosidin oluşturur. Alfa toksin gangrenleşmeye neden olur. Bazen toksemiden ölüm görülür (Ülgen 2002).

S. aureus, deri ve mukoz zarlarda normal flora olarak bulunur ve fırsatçı patojendir. Bulaşmada süt sağım makineleri ve sağıcıların elleri önemli rol oynar. Daha az olarak da etken memede oluşan yara ve sıyrıktan girerek mastitis oluşturur. Sığırlarda *S. aureus* mastitisi subklinikten şiddetli gangrenöz forma kadar değişen şekillerde seyreder. Fakat çoğunlukla subklinik seyirlidir, yavaş gelişir ve fark edilmeyebilir. Sütte kimyasal değişiklikler, süt üretiminde azalma meydana gelir. Bu ekonomik yönden önemlidir. Zamanla meme körleşebilir. Perakut gangrenöz form ise genellikle ilk kez buzağılaşmış düvelerde laktasyonun ilk zamanlarında meydana gelir ve meme dokusunda büyük miktarda kayıpla sonuçlanabilir. Başlangıçta meme şişer, ağrılı, ödemli, sıcak ve serttir. Sonradan oluşan gangrenleşme sonucu meme mavi-mor bir renk alır. Süt verimi azalır, sütün kokusunda değişme olur, kanlı ve pıhtılı bir görünüm alır. Memedeki ödem karın altında yayılabilir, sağaltıma erken başlanırda gangrenli kısımlar normal kısımlardan ayrılıp dökülür, iyileşme uzun sürer. Gangrenleşmenin gözlenmediği akut olaylarda süt seröz, purulent, pıhtılı, kanlı ve kıvamlıdır (Ülgen 2002).

Mastitis sürerliliğine göre akut ve kronik, kliniksel işaretlerin varlığına ve yokluğuna göre de klinik ve subklinik mastitis olarak sınıflandırılabilir (Griffin ve ark. 1987). Klinik mastitis`in bulguları, ağrı, sıcaklık, kızarıklık, fonksiyon bozukluğu gibi şekillerde görülür. Subklinik mastitis de ise memede ve sütte makroskobik bir değişiklik görülmez. Ancak sütün kalite ve miktarında önemli değişiklikler şekillenir (İntaş 1997).

Bakteriyel mastitislerin sağaltımında çeşitli antibiyotikle yoğun olarak kullanılmaktadır (Dinç ve ark. 1991, Hadimli ve ark. 2001, Kuyucuoğlu ve Uçar 2001). Ancak, tıpkı diğer infeksiyonların sağaltımında olduğu gibi, mastitislerin

sağaltımında da antibiyotiklerin kullanımı direnç sorununu doğurmuştur. Bu direncin en iyi bilinen mekanizması, Stafilokoklarda β-laktam antibiyotiklere karşı gelişenidir (Watts ve Salmon 1997). β-laktam antibiyotiklerin etkileri (penisilin, ampisilin, vb), bakterilerin peptidoglikan sentezi için gerekli olan transpeptidaz enziminin inhibisyonu yoluyladır. Dirençli bakteriler tarafından üretilen β-laktamaz enzimi ise, β-laktam halkasının yapısını bozarak etki eder (De Oliveria ve ark. 2000, Watts ve Salmon 1997). β-laktamaz (penisilinaz) enzimi, mastitislerden izole edilen Stafilokok suşlarının bazıları tarafından da üretilmektedir (Akan ve ark. 2001, Hadimli ve ark. 2001, Türütoğlu ve ark. 1995). Nazer ve Tavakoli (1994) klinik ve subklinik mastitislerden izole ettikleri Stafilokok suşlarında β-laktamaz pozitifliğini %89.4 olarak bildirirken, Uçan ve Arslan (2002), 81 koagülaz pozitif Stafilokok suşlarının β-laktamaz pozitivitesini %63 olarak bildirmişlerdir.

Bakterinin konakçı hücreye bağlanması, infeksiyonların patojenitesinde önemli bir aşamadır (Amorena ve ark. 1990, Iturralde ve ark. 1993, Opdebeeck ve ark. 1988). Konakçı ile mikroorganizmaların bu ilişkisinde virulansta önemli bir paya sahip olan ve ekzopolisakkarid içeren dış tabakanın kuvvetlice bağlanma özelliğinin önemli bir rolü vardır. Slime, bir bakterinin uygun bir ortamda üremesinden sonra şekillenen ekzopolisakkarid bir matrikstir. Bir stafilokok suşunun slime üretebilen varyantlarının, üretmeyen varyantlarından daha yüksek derecede kolonizasyon yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir (Baselga ve ark. 1993). Slime üretimi ile antibiyotiklere direnç arasında da bir ilişki olduğu ve bu suşların oluşturduğu infeksiyonların erdikasyonunun daha güç olduğu bildirilmektedir (Deighton ve ark. 1988). Arslan ve Uçar (2005) KKA (Kongo Kırmızılı Agar) yöntemi ile koagülaz pozitif stafilokokların %84`ünün slime ürettiğini gözlemlemişlerdir.

S. aureus`un sebep olduğu mastitisin kontrolü için çok çeşitli metotlara ihtiyaç duyulmaktadır (Matthews ve ark. 1992). Fenotipik teknikler (faj tiplendirme, serotiplendirme, biyotiplendirme, antibiyogramlar) inek orijinli Stafilokoklar için genellikle düşük tiplendirme yeteneğine sahiptirler (Matthews ve ark. 1992, Tenover ve ark. 1994). Son günlerde moleküler epidemiyolojinin DNA`ya dayalı metotları iyi sonuçlar vermiştir (Maslow ve ark. 1993, van Belkum ve ark. 1995). Bu tip

çalışmalar insan ve hayvan kaynaklı *S. aureus* suşları arasında farklılık olduğunu göstermiştir (Devriese 1984, Hajek ve Marsalek 1971, Kapur ve ark. 1995, Musser ve Kapur 1992).

Salgınlara yol açan suşların alt tiplendirilmesinde ve mikroorganizmaların tanımlanması veya sınıflamadaki yerlerinin belirlenmesinde DNA dizi analizinden faydanılmaktadır (Olive ve Bean 1999, Versalovic ve ark. 1996).

S. aureus`un epidemiyolojik tiplendirilmesi, zincir analizleri ve efektif enfeksiyon kontrolü sağlar. Günümüzde *S. aureus* için moleküler tiplendirme yöntemleri kullanılmaktadır. İdeal sistem; kolay, çabuk, gerçekçi, yüksek ayrımlı ve tekrarlanabilir olmalıdır (Maslow ve ark. 1993).

REP-PCR metodu ilk *Mycoplasma pneumoniae*`de kullanılmıştır (Wenzel ve Hermann 1988). *S. aureus* DNA`sı amplifikasyon örneği olarak kullanıldığında oluşan suşlar özel DNA fragmentleri oluşturmuştur (Del Vecchio ve ark. 1995).

Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) ile yapılan çalışmalar neticesinde REP-PCR ile PFGE metodunun performansı karşılaştırılmıştır. REP-PCR ile örneklerin sınıflandırılması PFGE sınıflandırmasına yakın bulunmuştur. Fakat PFGE tiplendirme yönteminin REP-PCR tiplendirme yöntemine göre daha iyi bir tiplendirme yöntemi olduğu kabul edilmiştir. Ancak zaman, hızlı uygulanabilme açısından ise REP-PCR`ın PFGE`ne göre daha avantajlı olduğunun kanaatine varmışlardır (Del Vecchio ve ark. 1995; van der Zee ve ark. 1999).

S. aureus ve *S. intermedius* suşları ile yapılan REP-PCR sonucu 6-15 arasında bant oluşmuştur. Genel olarak REP-PCR tiplendirmesinde diğer yöntemlere göre güçlü bir korelasyon gözlenmiştir. REP-PCR ürünleri suşlar arasındaki yakınlıkları ortaya koymuştur (van Der Zee ve ark. 1999)

REP-PCR filogenetik analizlerde ve bakteriyel suşların farklılığının ortaya konulmasında yaygın bir metot olarak kullanılmaya başlanmıştır. *Rhizobium* (de Bruijn 1992), *Frankia* (Murry ve ark. 1995), *Staphylococcus* (Del Vecchio ve ark.

1995), *Leigonella* (Georghiou ve ark. 1994), *Xanthomonas* ve *Pseudomonas* (Louws ve ark. 1994) türlerinde de başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

Bakteriyel izolatlar içinde klonal akrabalıkların DNA `ya dayalı epidemiyolojik değerlendirmesinde REP-PCR ile yapılan parmak izi kullanışlı bir yöntemdir. Birkaç saat içinde örneklerden izolatların karakterize edilmesini sağlar (Georghiou ve ark. 1992, Versalovic ve ark. 1993, Woods ve ark. 1992).

REP-PCR bakteriyel DNA tiplendirilmesinde hızlı bir şekilde yaygınlaşmaktadır. REP-PCR, REP ve ERIC sekanslarına dayalı primerle başarılı bir şekilde *Bartonella* (Rodriguez-Barradas ve ark. 1995), *Bacillus subtilis* (Versalovic ve ark. 1991), *Citrobacter diversus* (Harvey ve ark. 1995, Woods ve ark. 1992), *Enterobacter aerogenes* (Georghiou ve ark. 1995), *Rhizobium meliloti* (De Bruijn 1992), MRSA (Del Vecchio ve ark. 1995), *Streptococcus pneumoniae* (Versalovic ve ark. 1993, Zoe-Jordans ve ark. 1995), *Acinetobacker baumanii* (Dijkshoorn ve ark. 1993, Reboli ve ark. 1994), *Burkholderia cepacia* (Hamil ve ark. 1995), *Legionella pneumophilia* (Georghiou ve ark. 1994), *Helicobacter pylori* (Kwon ve ark. 1998), *Neisseria gonorrhoeae* (Poh ve ark. 1996) ve *meningitidis* (Woods ve ark. 1996) suşlarının ayırt edilmesinde kullanılmıştır. Bu teknik büyük veya küçük sayıda izolatlara kolayca uygulanabilmektedir. REP-PCR diğer plazmit profilleme ve genomik parmak izi bulma metotlarına göre daha iyi bir ayırma gücü ve daha uzak türlerde uygulanabilme kolaylığına sahiptir (Georghiou ve ark. 1995).

Ross ve ark. 2005 yılında yaptığı çalışmada REP-PCR uygulamasının kolay olduğunu göstermekle birlikte maliyetinin; temel ekipmanlar, ayraçlar ve personel masrafları da dahil PFGE'den oldukça fazla olduğu kanaatine varılmıştır. Ancak REP-PCR sonuçlarının gözlenebilmesi için gereken zaman PFGE'ye karşı bir avantaj sağlamakta ve REP-PCR'ı çok cazip kılmaktadır. REP-PCR'ın benzer klonları ve epidemiyolojik olarak alakalı dizileri güvenilir biçimde hızla tanımlanması, REP-PCR'ın epidemiyolojik araştırmalarda değerini artırmıştır. Ancak REP-PCR'ın ortaya çıkan kümelerdeki aynı zincirleri tanımlamada PFGE'den daha zayıf olduğu bulgusu aynı bantları paylaşan izolatların, PFGE yada mümkün olduğunda

multilokus zincir tiplendirmesi gibi daha ayırt edici metotlarla test edilmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

Patojenik potansiyeli olan stafilokokal türlerin klinik açıdan önemli suşlarının tanımlanmasında etkili metotlar gerekmektedir. Biyokimyasal testler ve yağ asidi testleri uygulandığında *S. aureus* izolatlarının tanımlanmasını sağlamıştır. Fakat çoğu zaman koagülaz negatif stafilokokların tanımlanmasında başarısız olmuşlardır (Stoakes ve ark. 1994). ERIC ve REP-PCR analizleri *Citrobacter koseri* ve *Rhizobium meliloti* gibi gram negatif bakterilerin suşlarının tanımlanmasında kesin sonuçlar vermiştir (De Bruijn 1992, Woods ve ark. 1992).

Bunun yanında sekans elementlerinin, gram pozitif bakterilerin genomlarında bulunduğuna dair kanıtlar vardır. *S. aureus* suşlarının arasındaki farklılığın bulunmasında tek primere dayalı metot olarak ERIC sekansları kullanılmış (Van Belkum ve ark. 1995) ve REP sekanslarından elde edilen primerler ise *Streptococcus pneumoniae* izolatlarında uygulanmıştır (Versalovic ve ark. 1993).

Van Der Zee ve ark. (1999) yaptıkları çalışmanın temelinde REP-PCR metodunun PFGE'den daha kullanışlı olduğunu göstermişlerdir. Çünkü daha yüksek çözünürlük gücüne ve uygulama kolaylığına sahiptir. *S. aureus* suşlarının epidemiyolojik tiplendirilmesi için REP-PCR tiplendirmesinin klinik mikrobiyoloji laboratuarlarında yaygın olarak kullanımının uygun olacağı sonucu çıkmaktadır. REP-PCR'ın parçalanmış hücrelerle değil de izole edilmiş kromozomal DNA ile uygulanması ve jel elektroforezinin yapılması uygun bulunmuştur. Depolanmış REP-PCR profillerinin ve dijitalleştirilmiş parmak izlerinin elektronik postayla paylaşılması gelecekteki hastane kaynaklı *S. aureus* analizinde ve yüksek epidemik potansiyelli bantların uluslar arası platformda gösterilmesi açısından önemli bir rol oynayabilir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Bakteri Örnekleri

Çalışmada kullanılan bakteri örnekleri, Yrd. Doç. Dr. Emine Arslan`ın doktora tezinde kullandığı Konya Bölgesindeki mastitisli ineklerden izole ettiği bakterilerden alınmıştır.

3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Besiyerleri

Fenol, kloroform, izoamil alkol gibi kimyasal maddeler Merck KGaA, 64271, Darmstadt, Almanya firmasından elde edilmiştir.

Agaroz, etidyum bromür, NaCl, izopropanol, glasial asetik asit gibi kimyasal maddeler ise Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, 89552, Steinheim, Almanya firmasından sağlanmıştır.

Besiyeri olarak Nutrient Broth (NB) ve Triptone Soy Agar (TSA) Oxoid marka kullanılmıştır.

3.1.3.Tampon ve Çözeltiler

3.1.3.1. Bakteriden genomik DNA izolasyonu için gerekli çözeltiler

- TE tamponu :Tris 10mM, EDTA 1mM, pH=8
- SDS : %10
- Proteinaz K : 20mg/ml
- CTAB : %1

- NaCl : 5M
- Lizostafin : 2mg/ml
- Kloroform / İzoamil alkol : 24:1 oranında Kloroform / İzoamil alkol karıştırılarak hazırlanmıştır.
- Fenol / Kloroform : 25:24 oranında
- İzopropanol

3.1.3.2. Agaroz jel elektroforezi için gerekli çözeltiler

-Agaroz : %2 agaroz TAE tamponunda hazırlanmıştır.

-Tris asetat (TAE) tamponu pH:8.0 : 242g Tris base, 57,1 ml glasial asetik asit, pH 8.0`a ayarlanmış 100ml 0.5M EDTA

-Etidyum Bromür : 10mg/ml konsantrasyonunda hazırlanmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Bakteri Örnekleri

-80˚C`de saklanan bakteri suşları TSA besiyerinde aktif hale getirilmiştir. Daha sonra DNA izolasyonları için Nutrienth Broth sıvı besiyerine ekim yapılarak 37˚C`de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.2. Bakterinden Genomik DNA izolasyonu

Bakteriden DNA izolasyonu Ausubel (1991)'in önerdiği metoda göre yapılmıştır. 2 ml`lik sıvı besiyerinde bakteri örnekleri üretilmiştir. 14.000 rpm`de 10 dakika santrifüj edilmiştir ve 200µl TE tamponunda (pH:8.0) süspanse edilmiştir. 9µl lizostafin (2mg/ml) solüsyonu süspansiyona ilave edilerek 37˚C`de 1 saat inkübe edilmiştir. 30µl %10`luk SDS ve 3µl proteinaz K (20mg/ml) ilave edilmiştir. Daha sonra 37˚C`de 1 saat bakteri hücrelerinin parçalanması için inkübe edilmiştir. 1M NaCl içerisinde %1`lik CTAB çözeltisinden 80µl ve 100µl 5M NaCl çözeltisi ilave

edilmiştir. 10 dakika 65˚C`de inkübe ettikten sonra lizat kloroform ile ekstrakte edilmiş ve daha sonra fenol / kloroform ile ekstrakte edilmiştir. DNA 0,6 hacim izopropanol ile süpernatant`tan presipite edilmiştir ve 50µl steril distile su ile süspanse edilmiştir. DNA konsantrasyonu spektrofotometre ile belirlenmiştir.

3.2.3. REP-PCR uygulaması

REP-PCR uygulaması için 25 µl çözelti hazırlanmıştır. Her reaksiyon karışımı için, 75 pikomol RW3A primeri (5'-TCGCTCAAAACAACGACACC-3') (Del Vecchio ve ark., 1995), 10X PCR tamponu (50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH=9, %0.1 TritonX-100), 3mM MgCl, 2.5mM dNTP ve 2.5U Taq polimeraz kullanılmıştır. Daha önceden bakteriden izole ettiğimiz genomik DNA`dan 50ng karışıma eklenmiştir. Karışım hazırlandıktan sonra thermo-cycler cihazı 94ºC`ta 3 dakika, 94ºC`ta 1 dakika, 54ºC`ta 1 dakika ve 72ºC`ta 2 dakika`ya 30 döngü yapılması için programlanmıştır. Son olarak program bittiğinde 72ºC`ta 5 dakikalık uzantı basamağı eklenerek ve hazırlanan tüpler thermo-cycler cihazına yerleştirilip çoğaltım yapılmıştır.

3.2.4. *S. aureus* suşlarının REP-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

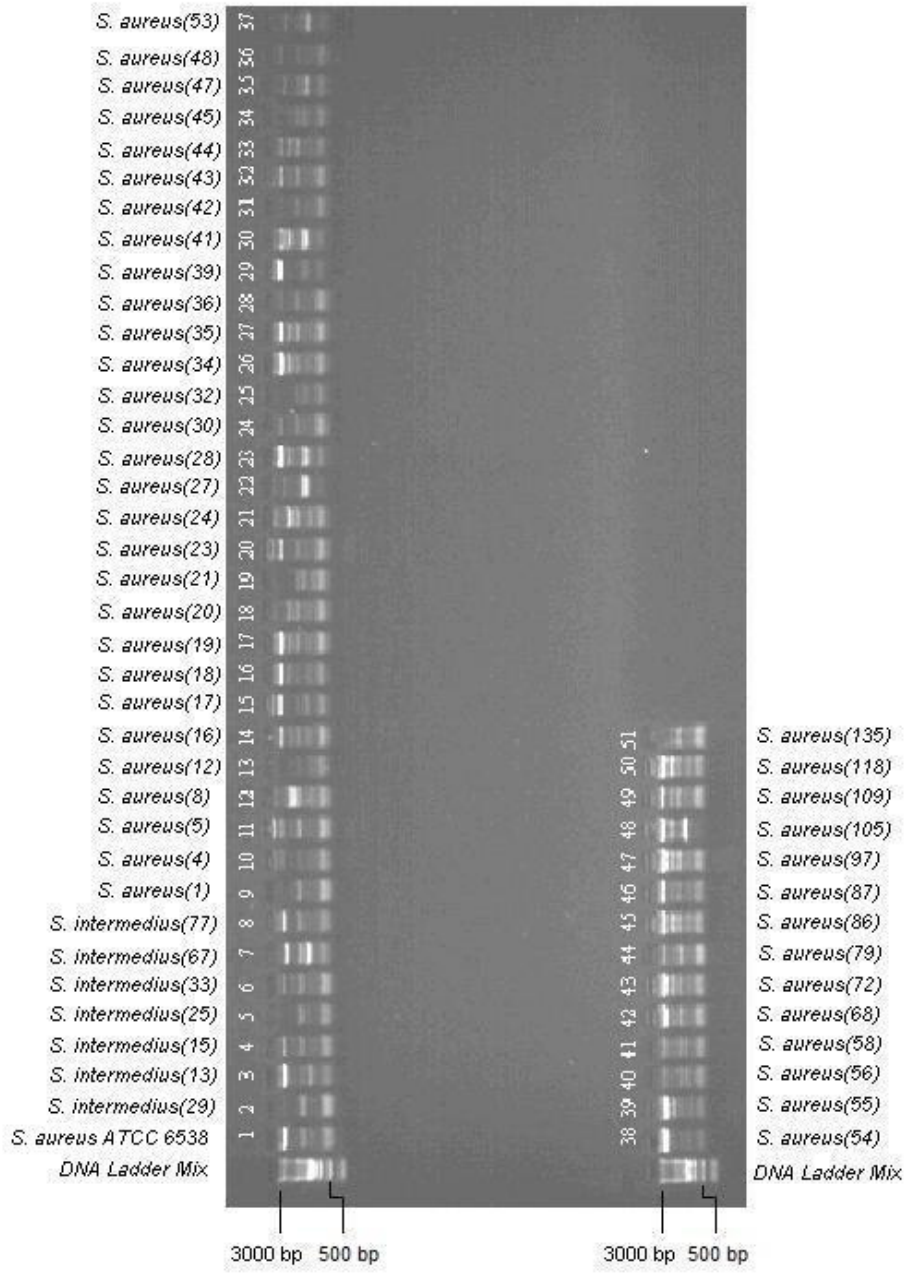
REP-PCR ürünleri değerlendirilmek için %2'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuştur (Maniatis ve ark. 1982). Agaroz jel için 0.4 gr agaroz tartılıp, 20ml TAE tamponu içinde kaynatılmıştır. Kaynadıktan sonra 1 µl etidyum bromür eklenerek elektroforez kabına dökülmüş ve taraklar yerleştirilmiştir. Daha sonra soğumaya bırakılmıştır. Jel soğuduktan sonra REP-PCR ürünleri kuyucuklara yüklenerek 90 voltta yürütülerek U.V. transilluminatörde görüntülenen fotograf bilgisayara aktarılmış.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA

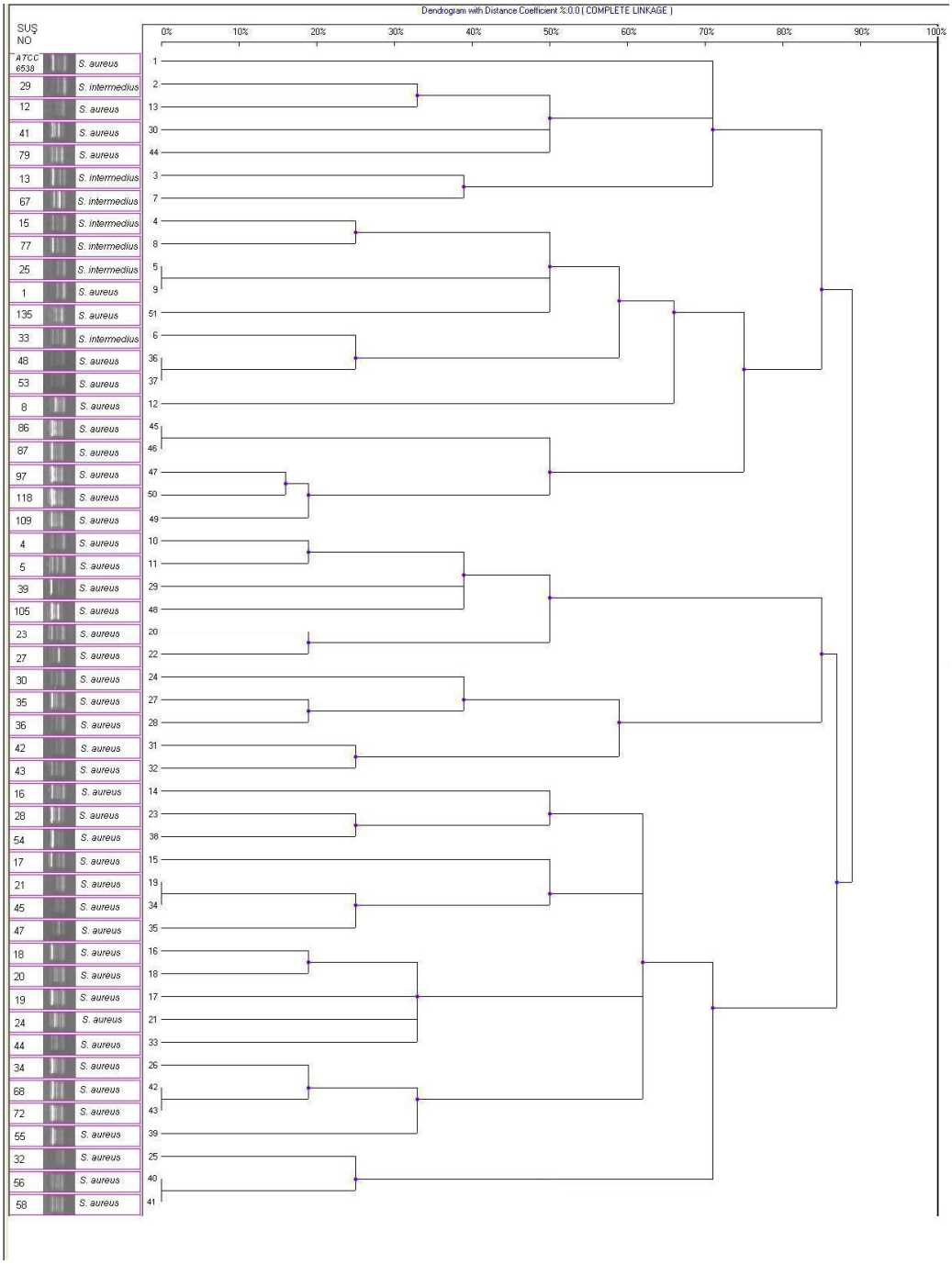
REP-PCR sonucu ile elde edilen fotografta (Şekil 1), bantların varlığı ve yokluğuna göre Bio-1D++ bilgisayar programı ile genetik akrabalıkları hesaplanarak dendrogramı çıkarılmıştır. Elde edilen dendrograma göre (Şekil 2) iki ana grup oluşmuştur. Birinci ana grup *S. intermedius* ve *S. aureus* suşları içeren iki alt grup içerir. Birinci alt grupta *S. aureus* ve *S. intermedius* suşları %30-40 oranında genetik olarak uzak bulunurken, bu suşlara Standart *S. aureus* suşunun %70 oranında uzak olduğu gözlenmiştir. Birinci alt gruba %86 oranında uzak olan ikinci alt grupta ise birbiri ile tamamen aynı olan *S. aureus* suşları (48-53, 87-97 no`lu suşlar) yer alırken, 25 no`lu *S. intermedius* suşu ve 1 no`lu *S. aureus* suşu birbirinin aynısı bulunmuştur. *S. aureus* suşlarından 105-118-135 nolu suşlar birbirlerine %84 oranında benzerdir. Bununla birlikte %15 ve %65 arasında değişen genetik uzaklıklarda diğer *S. aureus* suşları yer almıştır.

İkinci ana grup kendi içinde 2 alt gruba ayrılmış ve bu grup üyelerini *S. aureus* suşları oluşturmuştur. Birinci alt grupta %86 oranında uzak iki küçük küme meydana gelirken, iki küçük kümenin *S. aureus* suşları %80`den %40`a kadar değişen genetik benzerlikler göstermiştir. İkinci alt grubu oluşturan *S. aureus* suşlarından bazıları genetik açıdan birbirinin aynısı bulunurken (21-45, 58-68 ve 72-79 no`lu suşlar) diğer *S. aureus* suşları yaklaşık %80 ile %30 oranında değişen genetik açıdan birbirlerine oldukça benzer olduğu tespit edilmiştir.

Genel olarak bakıldığında *S. aureus* ve *S. intermedius* suşları %9-82 oranında birbirlerine yakındır. Ayrıca oluşturulan matris tablosunda (Tablo 1) tüm suşların ortalama benzerlik derecesi %57 oranında bulunmuştur. REP primerleri ile yapılan PCR sonucunda her bir suşun 2-6 arasında değişen bantlara sahip oldukları bulunurken bu bantların büyüklüklerinin de 500-3000 bp arasında değişen DNA fragmentlerinden oluştuğu gözlemlenmiştir.

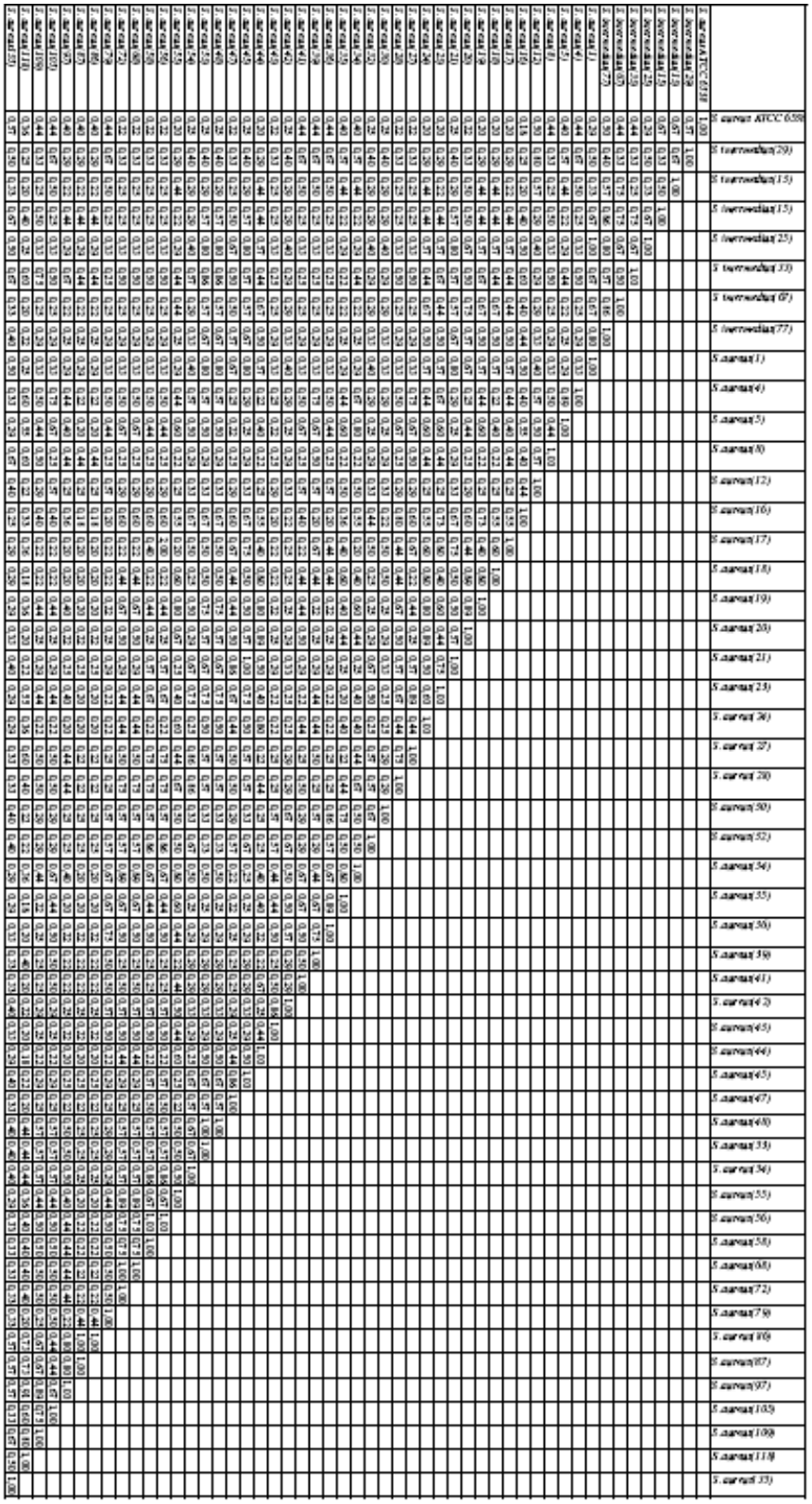


Şekil 1. REP-PCR Profilleri



Şekil 2. Bio-1D++ Programı Sonucu Elde Edilen Dendrogram

Tablo 1 S. aureus ve S. intermedius Suşları Arasındaki Genetik Uzaklık Matrisi



Son günlerde moleküler epidemiyolojinin DNA'ya dayalı metodları iyi sonuçlar vermiştir (Maslow ve ark. 1993, van Belkum ve ark. 1995). Bu sonuçlar, insan ve hayvan kaynaklı *S. aureus* suşları arasında farklılık olduğunu göstermiştir (Devriese 1984, Hajek ve Marsalek 1971, Kapur ve ark. 1995, Musser ve Kapur 1992).

İnsan kaynaklı *S. aureus* ve S. *intermedius* suşları REP-PCR ile tiplendirilerek 5-15 arasında değişen sayıda bantlar elde edilmiş ve bu bantların büyüklükleri yaklaşık 300-5000 bp arasında değiştiği gözlenmiştir (Van Der Zee ve ark. 1999). Del Vecchio ve ark. (1995) yine insan kaynaklı *S. aureus* suşlarının REP-PCR sonuçlarına göre, 3-12 arasında bant oluşturduklarını ve aynı tip izolatların özel coğrafik bölgelerde yayıldığını belirlemişlerdir. Yaptığımız çalışmada iki bakteri türüne ait suşlardan elde edilen bant sayıları insan kaynaklılardan daha az olduğu görülmektedir. Reinoso ve ark. (2004b) mastitisli ineklerden izole ettikleri *S. aureus* suşlarının 200-1700bp büyüklükleri arasında REP-PCR ürünlerini elde etmişlerdir. Yapılan tüm çalışmalarda bant büyüklükleri 200 ve 5000 bp arasında sınırlanırsa bizim bulduğumuz 500-3000bp bant büyüklükleri bu değerler arasında olduğu için diğer sonuçlarla uyum göstermektedir.

Arslan ve ark. (2005) ineklerden izole ettikleri mastitis etkeni *S. aureus* ve *S. intermedius* suşlarını RAPD-PCR metodu kullanarak en yüksek akrabalık derecesini %91.30 olarak bildirirlerken, Reinoso ve ark. (2004b) elde ettikleri REP-PCR sonuçlarına göre insanda enfeksiyona neden olan *S. aureus* suşlarında %87, ineklerden elde edilen *S. aureus* suşlarında ise %93 genetik akrabalık olduğunu ve Peles ve ark. (2007) PFGE (Pulsed Field Jel Elektroforez) sonuçlarına göre ise 59 *S. aureus* izolatının %86 benzerlikte olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada da tüm Stafilokok suşlarının %9-82 benzerlik derecesinde bulunması yukardaki sonuçlara yakın olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmalarda mastitisli ineklerden izole edilen *S. aureus* suşlarının çok az sayıda genotipleri olduğu belirlenmiştir. Bu genotipik çeşitliliğin az olmasının sebeplerinden biri *S. aureus*'un bulaşıcılığından dolayı çiftlikteki hayvanlar arasında yayılmasıdır (Matthews ve ark. 1992).

Metisiline dirençli *S. aureus* suşları için REP-PCR diğer metodlara nisbeten daha hızlı, güvenilir ve etkili moleküler tiplendirme sistemi olarak geliştirilmiştir. Bu da RW3A primerinin kullanımı ile başarılmıştır. RW3A primer dizisinin *S. aureus*'ların kromozomunda sayı ve pozisyonu çeşitli olduğu için suşlar arasında farklı REP-PCR profilleri gözlenmektedir. Bu primerin kullanımıyla agaroz jel elektroforezinde son derece ayırt edici PCR ürünleri meydana gelmektedir. Zahmetsiz ve ucuz donanımla yürütülebilen bu teknik kolayca salgın kaynağını belirleyebilir, rutin faaliyetleri izlemede kullanılabilir ve enfeksiyon kontrol potansiyelini artırabilir. REP-PCR ile çıkarılan DNA parmakizi, bulaşıcı ve virulant bakteri suşlarının hızlı bir şekilde tanımlanması için bir araç olarak teklif edilebilir (DelVecchio ve ark., 1995). *Staphylococcus* suşlarının analizinde REP-PCR tiplendirme metodunun, AP-PCR (Arbitrarily primed-Polimeraz zincir reaksiyonu) ve PFGE kadar ayırt edici olduğu bildirilmiştir. AP-PCR ile kıyaslandığında REP-PCR, ilaveten bir kromozomal DNA saflaştırma basamağı gerektirdiği için AP-PCR'ın performansı REP-PCR'ın performansından biraz hızlıdır. Ancak, epidemiyolojik amaçlar için kullanıldığı zaman son derece önemli olan REP-PCR'ın tekrarlanabilirliği AP-PCR'a göre mükemmel bulunmuştur. PFGE ile karşılaştırılacak olursa, REP-PCR'ın en önemli avantajı kolay ve hızlı performansa sahip olmasıdır. Ancak PFGE ile aynı tekrarlanabilirliği vardır (Tenover ve ark., 1994; Van Belkum ve ark., 1995). Diğer bir PCR'a dayalı tiplendirme metodu, tekraralanabilirlik ve performansın kolay olması bakımından en iyi REP-PCR ile kıyaslanan Deplano ve ark. (1997) tarafından tanımlanan Inter-IS256 PCR metodudur. Inter-IS256 PCR ile analiz edilmiş 36 *Staphylococcus* suşu arasında 3 farklı tip teşhis edilirken, aynı suşların REP-PCR tiplendirmesi ile 5 farklı tip tanımlanmıştır. REP-PCR tiplendirme aynı zamanda, her ikisininde orta derecede ayırt edebilme yeteneği olan Tn916-16S rRNA gen bölgesi ve inter-16S-23S rRNA gen bölgesinin çoğaltımları gibi diğer tekraralanan dizilere dayalı PCR metotları ile benzemektedir (Cuny ve Witte 1996, Gürtler ve Barrie 1995, Kumari ve ark. 1997).

Sonuç olarak; Konya Bölgesindeki ineklerde mastitise sebep olan *S. aureus* suşlarının, genetik açıdan değerlendirilmeleri ile birbirine yakın suşlar olduğu ve gelecekteki aşı çalışmaları için kullanılabilecekleri düşünülmektedir. Doğru suş ya da suşların seçiminin yapılabilmesi için bu verilerin başarılı bir şekilde kullanılması

gerekir. REP-PCR metoduna ilaveten ERIC-PCR ve BOX-PCR metotlarının da uygulanması, *staphylococ* izolatların sınıflandırılmasında, tanımlanmasında ve tiplendirilmesinde daha güvenilir sonuçlar sağlayacağı kanısındayız.

5.KAYNAKLAR

Akan, M., Kökçü, L., Öncel, T., Eken, H.S. 2001. Mastitislerden izole edilen Stafilokok suşlarının beta laktamaz aktivitesi ve bazı antibiyotiklere duyarlılıkları. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Dergisi, 1(2): 31-34.

Alaçam, E., Tekeli, T., Sezen, Y., Erganiş, O. 1986. Sütçü İneklerin SubklinikMastitislerinde Cefoperazone'un Etkisi Üzerinde Çalışma. S.Ü. Vet. Fak.Dergisi 1(2):65–74.

Alaçam, E., Dinç, D.A., Erganiş, O., Tekeli, T. Uçan, U.S. 1994. Sağlıklı ve subklinik mastitisli ineklerde kuru dönemde antibiyotik uygulamalarının etkisi.Tr. J. of Vet. and Anim. Sci. 18:241-250.

Amorena, B., Baselga, R., Aguilar, B. 1990. Factors influencing the degree of in vitro bacterial adhesion to ovine mammary gland epithelial cells. Vet. Microbiol, 24:43-53

Arda, M., İstanbulluoğlu, E. 1979. Mastitislere neden olan aerobik, mikroaerofilik, anaerobik bakterilerin izolasyon ve identifikasyonu üzerindeçalışmalar. TÜBİTAK VHAG-304, Kesin Rapor.

Arslan, E., Açık, L., Uçan, U.S. 2005. Mastitisli ineklerden izole edilen *S. aureus* ve *S. intermedius* suşlarının RAPD-PCR ile akrabalık derecelerinin belirlenmesi. Vet. Bil. Derg. (2005), 21, 1-2:65-69.

Arslan, E., Uçan, U.S. 2005. Mastitisli ineklerden izole edilen *S. aureus* ve *S. intermedius* suşlarının slime üretiminin araştırılması. Vet. Bil. Derg. 21, 1-2: 61-63

Ausubel, F.M., Kingston, R.E., Brent, R., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. 1991. Current protocols in molecular biology. Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, New York.

Bademkıran, S., Yeşilmen, S., Gürbulak, K. 2005. Sütçü İneklerde Günlük Sağım Sayısının Klinik Mastitis ve Süt Verimi Üzerine Etkisi. Y.Y.Ü. Vet Fak. Derg., 16 (2):17-21

Baselga, R., Albizu, I., De La Cryz, M., Del Cacho, E., Barberan, M., Amorena, B. 1993. Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus* implications in colonization and virulence. Infect. Immun., 61:4857-4862

Baştan, A. 2002. İneklerde Meme Hastalıkları (ISBN: 975–8322–15-X) Şahin Matbaası Ankara.

Biggadike, H. 2001. Enviromental Mastitis: Causes and Prevalence. ADAS/IGER/ University of Bristol 211–220.

Cuny, C, and Witte, W. 1996. Typing of *Staphylococcus aureus* by PCR for DNAsequences flanked by transposon TnP/6 target region and ribosomal binding site. J. Clin. Microbiol. 34:1502 1505.

de Bruijn, F.J. 1992 Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerasechain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. Applied and Environmental Microbiology 58, 2180—2187.

Deighton, M.A., Franklin, J.C., Spicer, W.J., Balkau, B. 1988. Species identification, antibiotic sensivity and slime production of coagulase-negative Staphylococci isolated from clinical specimens. Epiderm. Inf. 101:99-113

De Oliviera, A.P., Watts, J.L., Salmon, S.A., Aerestrup, F. 2000. Antibacterialsusceptibility of S*taphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europa and the United States. J. Dair. Sci. 83:855-862

Del Vecchio, V.G., Petroziello, J.M., Gress, M.J., McClesky, F.K., Melcher, G.P., Crouch, H.K. and Lupski, J.R. 1995. Molecular genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via flu-orophore enhanced repetitive sequence VCR. Journal of Clinical Microbiology 33, 2141-2144.

Deplano, A., Vaneechoutte, M., Verschraegen, G. and Struclens, M.J. 1997. Typing of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Strains by PCR Analysis of inter-IS256 spacer length polymorphism. J. Clin. Microbiol. 35:2580-2587.

Deveci, H., Apaydın, A.M., Kalkan, C., Öcal, H. 1994. Evcil Hayvanlarda Meme Hastalıkları I. Baskı (ISBN:975–394–005) F.Ü. Basımevi Elazığ.

Devriese, L.A. 1984. A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species. J. Appl. Bacteriol. 56,215-220

Dijkshoorn, I.H., Aucken, M.L., Gerner-Smidt, P., Janssen, P., Kaufman, M.E., Garaizar, J. Ursing, J. and Pitt, T.L. 1993. Comparison of outbreak and

nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypicmethods. J. Clin. Microbiol. 34:1519-1525.

Dinç, D.A., Erganiş, O., Güler, M., Uçan, U.S. 1991. İneklerin subklinikmastitislerinde Baytril`in Etkisi. Hay. Araş. Derg. 1(1): 12-15

Erganiş, O., Kuyucuoğlu, Y., Ok, Ü. 1995. İnek ve koyun mastitislerine sebep olankoagülaz negatif ve pozitif *Staphylokok*ların biyotiplendirilmesi. Veterinarium, 6(1-2): 23-27.

Falkiner, F.R. 1988. Epidemiological typing: a user's view. J. Hosp. Infect. 11:303-309.

Frènay, H.M.E. , Theelen, J.P.G., Schouls, L.M., Vanderbroucke- Grauls,C. M. J. E., Verhoef, J., Van leeuwen, V.J. and Mooi, F. R. 1994. Discrimination of epidemic and nonepidemic methicillian-resistant Staphylococcus aureus strains on the basis of protein A gene polymorphism. J. Clin. Microbiol. 32:846-847

Georghiou, P., Wright, C., Versalovic, J., Koeuth, T., Watson, D., Hamill, R. and Lupski, J. 1992. Program Abstr. 32nd lntersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. 1415.

Georghiou, P.R., Doggett, A.M., Kielhofner, M.A., Stout, J.E., Watson, D.A., Lupski, J.R. and Hamill, RJ. 1994. Molecular fingerprinting of Legionella species with repetitive element PCR. Journal of Clinical Microbiology 32, 2989-2994.

Georghiou, P.R., Hamill, R.J., Wright, C.E., Versalovic, J., Koeuth, T., Watson, D.A. and Lupski, J.R. 1995. Molecular epidemiology of infections due to Enterobacter aerogenes: identification of hospital-associated strains by molecular techniques. Clin. Infect. Dis. 20:84-94.

Gilson, E., Clement, J. M., Brutlag, D. and Hofnung, D. 1984. A family of interspersed extragenic palindromic DNA sequences in E. coli. EMBO J. 3:1417-1421.

Griffin, T. K., Morant, S. V. & Dodd, F. H. 1987. Bovine mastitis. Definition and guidelines fordiagnosis. *Bulletin of the International Dairy Federation (IDF)* No. 211**,** 2-24.

Gürtler, V. and Barrie, H.D. 1995. Typing of *Staphylococcus aureus* strains by PCR-amplification of variable-length 16S-23S rDNA spacer regions: characterization of spacer sequences. Microbiology 141:1255-1265

Hacek, D. M., Suriano, T., Noskin, G. A., Kruszynski, J., Reisberg, B. and Peterson, L. R.. 1999. Medical and economic benefit of a comprehensive infection control program that includes routine determination of microbial clonality. Am. J. Clin. Pathol. 111:647-654.

Hajek, V., Marsalek, E. 1971. The differentiation of pathogenic staphylococci and a suggestion for their taxonomic classification. Zenralbl. Bakteriol. Abt. l. Orig.A217-176-182

Hadimli, H.H., Ateş, M., Güler, L., Kav, K., Öncel, T. 2001. Mastitisli süt ineklerinden izole edilen Stafilokokların beta-laktamaz aktiviteleri ve antibiyotiklere duyarlılıkları. *Vet. Bil Derg.,* 17(4): 21-25.

Hamill, R.J., Houston, E.D., Georghiou, P.R., Wright, C. E., Koza, M.A., Cadle, R.M., Goepfert, P.A., Lewis, D.A., Zenon, G.J. and Clarridge, J. E. 1995. An outbreak of Burkholderia (formerly Pseudomonas) cepacia respiratory tract colonization and infection associated with nebulized albuterol therapy. Ann. Intern. Med. 122:762-766.

Harvey, B.S., Koeuth, T., Versalovic, J., Woods, C.R. and Lupski. J.R. 1995. Vertical transmission of Citrobacter diversus documented by DNA finger-printing. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 16:564-569.

Hulton, C.S.J., Pliggins, C.F., Sharp, P.M. 1991. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and other enterobacteria. Molecular Microbiology 5, 825-34.

Itturalde, M., Aguilar, B., Baselga, R., Amorena, B. 1993. Adhesion of ruminant mastitis *Staphylococcus aureus* strain to epithelial cells from ovine mammary gland primary culture and from a rat intestinal cell line. Vet. Microbiol. 38:115-127

İntaş, K.S. 1997. Meme Hastalıkları, Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Ders Notları, Bursa

Kapur, V, Sischo, W., Greer, R., Whittam, T, Musser, J. 1995. Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. J. Clin. Microbiol. 33, 376-380.

Kumari, D.N.P., Peer, V., Hawkey, P.M., Parnell, P., Joseph, N., Richardson, J.F. and Cookson, B. 1997. Comparison and application of ribosome spacer DNA amplicon polymorphisms and pulsed-field gel electrophoresis for differentiation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. J. Clin. Microbiol. 35:881-885.

Kuyucuoğlu, Y., Uçar, M. 2001. Afyon bölgesi süt ineklerinde subklinik ve klinik mastitislerin görülme oranları ve etkili antibiyotiklerin tespiti. Vet. Hek. Mik. Derg. 1(1): 19-25

Kwon, D.H., El-Zaatari, F.A.K., Woo, J.S., Perng, C.L., Graham, D.Y. and Goo, M.F. 1998. REP-PCR fragments as biomarkers for differentiating gastroduodenal disease-specific *Helicobacter pylori*. Dig. Dis. Sci. 43:980-987.

Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T., De Bruijn, F.J. 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic Xantho-monas and *Pseudomonas pathovars* and strains, generated with repetitive sequences and PCR. Applied and Environmental Microbiology 60, 2286-95.

Maniatis, R., Fritsh, E.F., Sambrook, J. 1982. In Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbos, New York.

Martin, B., Humbert, O., Camara, M., Guenzi, E., Walker, J., Mitchell, T., Andrew, P., Prudhomme, M., Alloing, G., Hackenbeck, R., Morrison, D.A., Boulnois, G.J., Claverys, J.P. 1992. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. Nucleic Acids Research 20, 3479-83.

Maslow, J.N., Mulligan, M.E., Arbeit, R.D. 1993. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. Clin. InfectDise. 17: 153-164.

Matthews, K.R., Jayarao, B.M., Oliver, S.P. 1992. Plasmid pattern analysis of *Staphylococcus* species isolated from bovine mammary secretions. J. Dairy Sci. 75(12):3318-23

Morrison V (2003): Once Daily Milking. Greenmount College Technical Note.

Murry, M.A., Zhang, D., Schneider, M. and de Bruijn, F.J. 1995. Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction (REP-PCR) to fingerprint the genomes of Prankia isolates. Symbiosis 19, 223-240.

Musser, J., Kapur, V., 1992. Clonal analysis of methicillin resistant Staphylococcus aureus strains from intercontinental sources: association of the mec gene with divergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination. J. Clin. Microbiol. 30,2058-2063

Muto, C.A., Jernigan, J.A., Ostrowsky, B.E., Richet, H.M., Jarvis, W.R., Boyce, J.M. and Fair. B.M. 2003. SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus*. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 24:362-386.

Nazer, A.H.K., Tavakoli, A.H. 1994. Pervelance of antibiotic resistance and beta-lactamase production by bacteria isolated from cases of bovine mastitis. J. Appl. Anim. Res. 6: 167-176

Olive, D.M., Bean, P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organism. *J. Clin. Mikrobiol.* 37: 1661-9.

Opdebeeck, J.P., Frost, A.J., O`Boyle, D. 1988. Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to bovine udder epithelial cells. Vet. Microbiol. 16:77-86

Parker, M.T. 1978. Hospital-acquired infections: guidelines to laboratory methods. WHO Reg. Publ. Eur. Ser. 4:35-39.

Peles, F., Wagner, M., Varga, L., Hein, I., Rieck, P., Gutser, K., Keresztúri, P., Kardos, G., Turcsányi, I., Béri, B., Szabó, A. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary, International Journal of Food Microbiology Volume 118, Issue 2, 15 September 2007, Pages 186-193

Poh, C.L., Ramachandran, V. and Tasall, J.W. 1996. Genetic diversity of *Neisseria gonorrhoeae* IB-2 and IB-6 isolates revealed through whole-cell repetitive element sequence-based PCR. J. Clin. Microbiol. 34:292-295.

Rajala-Schultz, P.J., Gröhn, Y.T., McCulloch, C.E., Guard, C.L. 1999. Effect of Clinical Mastitis on Milk Yield in Dairy Cows. J. Dairy Sci. 82: 1213–1220.

Rasmussen, M. D., Madsen, N. P. 2000. Effect of Milkline Vacuum, and Cluster Weight on Milk Yield, Teat Condition, and Udder Health. J. Dairy Sci. 83: 77–84.

Rişvanlı, A., Kalkan, C. 2002. Sütçü İneklerde Yaş ve Irkın Subklinik Mastitisli Memelerin Sütlerindeki Somatik Hücre Sayıları ile Mikrobiyolojik İzolasyon Oranlarına Etkisi. YYÜ. Vet. Fak. Derg. 13 (1–2):84–87.

Reboli, A.C., Houston, E.D., Monteforte, J.S., Wood, C.A. and Hamil, R.J. 1994. Discrimination of epidemic and sporadic isolates of Aeinetobacter baumannii by repetitive element PCR-mediated DNA fingerprinting. J. Clin. Microbiol. 2:2635-2640.

Reinoso, E., Bettera, S., Frigerio, C., DiRenzo, M., Calzolari, A., Bogni, C. 2004a. RAPD-PCR analysis of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine and human hosts. Microbiol. Res. 159, 245-255.

Reinoso, E.B., El-Sayed, A., Lämmler, C., Bogni, C., Zschöck, M. 2004b. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. Microbiol. Res.

Rodriguez-Barradas, M.C., Hamill, R.J., Houston, E.D., Georghiou, P.R., Clarridge, J.E., Regnery, R.L. and Koebler, J.E. 1995. Genomic fingerprinting of *Bartonella* species by repetitive element PCR for distinguishing species and isolates. J. Clin. Microbiol. 33:1089-1093.

Ross, T.L., Merz, W.G., Farkosh, M., Carroll, K.C. 2005. Comparison of an Automated Repetitive Sequence-Based PCR microbial typing system to Pulsed- Field Gel Electrophoresis for analysis of outbreaks of methicillin-resistant *S. aureus*. J. Microbiol. 5642-5647

Schroeder, J. W. 1997. Clinical Mastitis can Affect Reproductive Performance. North Dakota State University NDSU Extension Service. 7 (4):1–6.

Sharples, G.J., and Lloyd, R.G. 1990. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. Nucleic Acids Res. 18:6503-6508.

Shim, E.H., Shanks, R.D., Morin, D.E. 2004. Milk Loss and Treatment Costs Associated with Two Treatment Protocols for Clinical Mastitis in Dairy Cows. J Dairy Sci. 87(8):2702–2708.

Stern, M.J., Ames, G.F.L., Smith, N. H., Robinson, E. C. and Higgins, C. F. 1984. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. Cell 37:1015-1026.

Stoakes, L., John, A.M., Lannigan, R., Ramos, M. 1994. Gas-liquid chromatography of cellular fatty acids for identification of staphylococci. J Clin Mic 32:1908

Uçan, S.U., Arslan, E. 2002. İnek mastitislerinden izole edilen koagülaz pozitif stafilokok suşlarının penisilin direnci ve bazı antibiyotiklere duyarlılıkları. Vet. Bil. Derg. 18,3: 19-22

Unat, E.K. 1985. Temel Mikrobiyoloji, Beta Basımevi, İstanbul

Ülgen, M. 2002. Özel Mikrobiyoloji. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları Yayın No: 2002-2

Tenover, F.C., Arbeit, R., Archer, G., Biddle, J., Byrne, S., Goering, R., Hancock, G., Herbert, G.A., Hill, B., Hollis, R., Jarvis, W.R., Kreiswirth B., Eisner, W., Maslow, J., McDougal, L.K., Miller, J.M., Mulligan, M., Pfaller, M.A. 1994. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus. J. Clin. Microbiol.* 32:407-415.

Türütoğlu, H., Mudul, Ş., Öncel, T. 2001. Burdur bölgesinde mastitislerden izole edilen mikroorganizmalarda β-laktamaz varlığı. Süt İnekçiliğinde Mastitis Sempozyumu, 4-5 Mayıs, Burdur.

van Belkum, A., Kluytamans, van Leeuwen, W., Bax, R., Quint, W., Peters, E., Fluit, A., Vandenbroucke-Grauls, C., van den Brule, A., Koelman, H. 1995. Multicenter evaluation of arbitrarily primed PCR for typing of *Staplycoccus aureus* strains. J. Clin. Microbiol. 33:1537-1547

van der Zee, A., Verbakel, H., van Zon, J.C., Frenay, I., van Belkum, A., Peeters, M., Butting, A., Bergmans, A. 1999. Molecular genotyping of *Staphylococcus aureus strains*: comparison of repetitive element sequence-based PCR with various typing methods and isolation of a novel epidemicity marker. J. Clin. Microbiol. 37:342-349.

Versalovic, J., Koeuth, T. and Lupski, J.R. 1991 Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Research 19, 6823-6831.

Versalovic, J., Koeuth, T., Zhang, Y.H., McCabe, E.R.B. and Lupski, J.R. 1992. Quality control for bacterial inhibition assays: DNA fingerprinting of microorganisms by REP-PCR. Screening 1:175-183.

Versalovic, J., Kapur, V., Mason, E.O., Shah, U., Koeuth, T., Lupski, J.R. and Musser, J.M. 1993. Penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae* strains recovered in Houston, Texas: identification and molecular characterization of multiple clones. J. Infect. Dis. 167:850-856.

Versalovic, J., Swanson, D.S., Musser, J.M. 1996. Nucleic acid sequencing studies of microbial pathogens: Insights into epidemiology, virulance, drug resistance and diversity. in: Persing DH. (ed). PCR protocols for Emerging Infectious Disease, ASM Pres Washinton, DC 59-88.

Waterman, D.F., Harmon, R.J., Hemken, R.W., Langlois, B.E. 1983. Milking Frequency as Related to Udder Health and Milk Production. J Dairy Sci. 66(2):253–258.

Watts, J.L., Salmon, S.A. 1997. Activity of selected antimicrobial agents against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections that produce beta lactamase. J. Dairy. Sci. 80: 788-791

Wenzel, R., Hermann, R. 1988. Repetitive DNA sequences in Mycoplasma pneumoniae. Nucleic Acids Res. 16, 8337-8350

Wieser, M. And Busse, H.J. 2000. Rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 50:1087-1093

Woods, C.R, Versalovic, J., Koeuth, T. and Lupski, J.R. 1992. Analysis of relationships among isolates of *Citrobacter diversus* by using DNA fingerprints generated by repetitive sequence-based primers in the polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 30:2921-2929.

Woods, C.R., Koeutb, T., Estabrook, M.M. and Lupski, J.R. 1996. Rapid determination of outbreak-related strains of *Neisseria meningitidis* by

repetitive element-based polymerase chain reaction genotyping. J. Infect. Dis. 174:760-767.

Yang, Y., and Ames, G.F.L. 1988. DNA gyrase binds to the family of prokaiyotic repetitive extragenic palindromic sequences. Proa Natl. Acad. Sci. USA 85:8850-8854.

Zadoks, R., van Leeuwen, W., Barkema, H., Sampimon, O., Verbrugh, H., Schukken, Y., van 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 isolates*. J. Clin. Microbiol. 38, 1931-1939.

Zoe-Jordans, J., Paul, J., Bates, J., Beaumot, C., Kimari, J. and Gilks, C. 1995. Characterization of *Streptococcus pneumoniae* from human immunodeficiency virus-seropositive patients with acute recurrent pneumonia. J. Infect. Dis. 172-983-987.