

Mastitisli Sütlerden İzole Edilen Bakterilerin Virulens Faktörlerinin Konvansiyel ve Moleküler Yöntemlerle Saptanması

Mehmet Akan, Müjgan İzgür, Zafer Cantekin, Gökçen Tosun, Seyda Çetin

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 06110 Dışkapı-Ankara

Özet: Çalışma kapsamında incelenen 1135 adet süt örneğinden 178 (%15.7) *Staphylococcus* spp, 99 (8.7%) *E.coli* ve 65 (%7.7) *Streptococcus* spp. izole edildi. Stafilokok suşlarının 126 (%70.8)'sı *S.aureus* olarak tanımlandı. İzole edilen 65 adet Streptokok suşunun 35 (%53.9)'i *S.uberis*, 16 (%24.6)'sı *S.agalactiae* ve 14 (%21.5)'ü *S.dysgalactiae* olarak ayrıldı.

İncelenen 178 stafilokok suşunun 126 (%70.8)'si koagülaz, 122 (%68.5)'si clumping faktör, 133 (%74.7)'ü hemoliz, 121 (%68)'i DNaz, 68 (%38.2)'i hemagglütinasyon ve 154 (86.5)'ü slime faktör yönünden pozitif bulundu. İzole edilen 99 *E.coli* suşunun 10 (%10.1)'ü hemoliz ve 4 (%4)'ü MSHA yönünden pozitif olduğu saptandı. Hemoliz özelliği yönünden test edilen 65 suşun 43 (%66.1)'ü alfa hemolitik, 12 (18.5)'si beta hemolitik ve 10 (%15.4)'ü gama hemolitik olarak belirlendi.

Antibiyotik duyarlılık testleri sonucunda, *Staphylococcus* spp. suşlarında, incelenen 178 suşun 108 (%60.1)'i amoksisiline, 153 (%86)'ü amoksisilin+klavulonik asite, 76 (%42.7)'sı ampisiline, 108 (%60.1)'i ampisilin+sulbaktama, 86 (%48.3)'ü eritromisine, 148 (%83.1)'i kloksasiline, 88 (%49.4)'i oksitetrasikline, 131 (%73.6)'i sefoperazona, 128 (%72)'i trimetoprim, 152 (%85.4)'ü trimetoprim+sülfametoksazol duyarlı bulundu. İncelenen 178 suşun 160 (%89.9)'i metisiline duyarlı bulundu. İzole edilen 99 *E.coli* suşunun 74 (%74.7)'ü amoksisiline, 82 (%82.8)'si amoksisilin+klavulonik asite, 70 (%70.7)'i ampisiline, 75 (%75.8)'i ampisilin+sulbaktama, 71 (%71.7)'i oksitetrasikline ve 81 (%81.8)'i trimetoprim+sülfametoksazol duyarlı bulundu. İncelenen 65 *Streptococcus* spp. suşunun 58 (%89.2)'i amoksisiline, 62 (%95.4)'si amoksisilin+klavulonik asite, 59 (%90.8)'ü ampisiline, 61 (%93.8)'i ampisilin+sulbaktama, 52 (%80)'si eritromisine, 60 (%92.3)'ü kloksasiline, 48 (%73.8)'i oksitetrasikline 59 (%90.8)'ü trimetoprim+sülfametoksazol duyarlı bulundu.

Suşların moleküler tekniklerle cins ve tür düzeyinde (*S.aureus*) tanımlanması için yapılan 16S-23S rRNA PCR ve multipleks PCR (*femA*)'da, konvansiyonel olarak *S.aureus* olarak tanımlanmış tüm suşlar pozitif bant verdi. Ayrıca 16S rDNA spesifik primerlerle yapılan multipleks PCR ile Stafilokok suşlarının cins düzeyinde moleküler doğrulaması gerçekleştirildi. Suşların metisilin direnci *mecA* multipleks PCR ile moleküler olarak doğrulandı ve sonuçlar antibiyotik duyarlılık test sonuçları ile uyumlu bulundu. İzole edilen suşların moleküler tiplendirilmesi amacıyla RAPD-PCR ve PCR-RFLP teknikleri kullanıldı. Bu çalışmalar sonrasında suşlar farklı gruplara ayrıldı ve aynı işletmelerden izole edilen suşlar, işletme düzeyinde benzer bant profilleri gösterdikleri belirlendi.

Sonuç olarak, bu çalışma ile moleküler yöntemlerin stafilokokların tanımlanmasında, virulens özelliklerinin belirlenmesinde ve genotiplendirilmesinde kullanılabileceği ortaya kondu.

Anahtar kelimeler: Stafilokok, *E.coli*, Streptokok, virulens faktörleri, PCR, moleküler tiplendirme, sığır mastitis.

Detection of virulence factors of bacterial strains isolated from bovine mastitis by conventional and molecular methods

Mehmet Akan, Müjgan İzgür, Zafer Cantekin, Gökçen Tosun, Seyda Çetin

Ankara University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Ankara

Summary: In the study, *Staphylococcus* spp, *E.coli* and *Streptococcus* spp. were isolated from 178 (15.7%), 99 (8.7%) and 65 (7.7%) of 1135 milk samples, respectively. Amongst *Staphylococcus* spp. isolates 126 (70.8%) were identified as *S.aureus*. The most commonly identified streptococcal species were *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, and *Streptococcus dysgalactiae* which were detected in 35 (53.9%), 16 (24.6%), and 14 (21.5%) of 65 strains, respectively.

In the study, 126 (70.8%) and 122 (68.5%) out of 178 strains were identified as coagulase positive and clumping factor positive, respectively. One hundred and thirty three (74.7%) out of 178 strains were determined to show haemolysis, and 121 (68%) were determined as DNase positive. In the haemagglutination tests 68 (38.2%) strains were detected to haemagglutinate the erythrocytes and 154 (86.5%) out of 178 strains were detected to be positive slime factor. Ten (10.1%) strains out of *E.coli* strains were determined to show haemolysis, and 4 (4%) were found as MSHA. In the haemolytic activity tests 43 (66.1%), 12 (18.5%) and 10 (15.4%) out of 65 *Streptococcus* spp. strains were determined to show alpha haemolytic, beta haemolytic and gamma haemolytic, respectively.

Following the antibiotic resistance tests, susceptibilities to antibiotics for *Staphylococcus* spp. were as follows: 108 (60.1%) to amoxicillin, 153 (86%) to amoxicillin+clavulonic acid, 76 (42.7%) to ampicillin, 108 (60.1%) to ampicillin+sulbactam, 86 (48.7%) erythromycin, 148 (83.1%) to cloxacillin, 88 (49.4%) to oxytetracyclin, 131 (73.6%) to cephaperazone, 128 (72%) to trimethoprim and 152 (85.4%) to trimethoprim+sulphamethoxazole. 160 (89.9%) out of 178 strains were detected to be sensitive to methicilline. Sensitivities of *E.coli* strains against amoxicillin, amoxicillin+clavulonic acid, ampicillin, ampicillin+sulbactam, oxytetracyclin and trimethoprim+sulphamethoxazole were found to be 74 (%74.7), 82 (%82.8), 70 (%70.7), 75 (%75.8), 71 (%71.7) and 81 (%81.8), respectively. Susceptibilities to antibiotics for streptococci were as follows: 58 (%89.2) to amoxicillin, 62 (%95.4) to amoxicillin+clavulonic acid, 59 (%90.8) to ampicillin, 61 (%93.8) to ampicillin+sulbactam, 52 (%80) to eritromycin, 60 (%92.3) to cloxacillin, 48 (%73.8) to oxytetracyclin 59 (%90.8) to trimethoprim+sulphamethoxazole.

All strains identified as *S.aureus* in conventional tests gave positive bands in the molecular techniques such as 16S-23S rRNA PCR and multiplex PCR (detection of femA gene) respectively used for genus and species specific identification of staphylococci. Also these strains were confirmed to belong to *Staphylococcus* genus following multiplex PCR tests using 16SrDNA primers specific to staphylococci. Methicillin resistance were detected with mecA multiplex PCR and the results were in concordance with the antibiotic susceptibility tests. For the molecular characterization of the strains, RAPD-PCR and PCR-RFLP analysis with different enzymes following specific amplification of the gene sequences were performed. Strains were classified into different groups following these studies and identical band patterns were detected in the same facilities.

As a conclusion, this study showed that molecular techniques could be used for identification of staphylococci, determination of virulence characteristics and genotyping of strains, as well.

Keywords: *Staphylococcus*, *E.coli*, streptococci, virulence factors, PCR, molecular characterization, bovine mastitis

II. Amaç ve Kapsam

Mastitis, süt yönlü yetiştiriciliğin en önemli problemidir. İneklerde mastitis, modern işletmeler de dahil olmak üzere tüm işletmelerde görülen bir enfeksiyondur ve önemli ekonomik kayıplara neden olur. Mastitislere neden olan etkenlerin başında *Staphylococcus aureus* ve diğer stafilokok türleri, *Streptococcus spp* ve *E.coli*'ler gelmektedir. Gelişmiş ülkeler ile ülkemizdeki durum karşılaştırıldığında mastitis etiyojisi olarak büyük bir benzerlik bulunmaktadır. Stafilokok türleri, hem akut seyirli hem de subklinik seyirli mastitise neden olmaktadır. İneklerde subklinik mastitislere şekillenen ekonomik kayıpların, klinik mastitislere göre daha fazla olduğu ortaya konmuştur. Mastitis, verim ve ürün kayıpları ile tedavi masrafları birlikte değerlendirildiğinde süt yönlü yetiştiricilikte en fazla ekonomik kayba neden olan sorunların başında gelmektedir. Özellikle modern intansif yetiştiricilikte %40'a varan oranlarda mastitis sıklığı gözlenebilmektedir. Tüm hijyenik uygulamalara rağmen, mastitis probleminin sürmesi, medikal koruma yollarını gündeme getirmiş ve aşuların da dahil olduğu kontrol programlarının geliştirilmesini zorunlu kılmıştır. Ancak bir enfeksiyona karşı etkili bir mücadele yürütmek için, kesin etiopatogenezinin ve bununla ilişkili epidemiyolojinin, bölge hatta sürü bazında bilinmesi gerekmektedir.

Projenin temel amacı, sığır mastitislerinin etiyojilerinin belirlenmesi ve koruma programları oluşturmada gerekli olan temel bilgilerin sağlanmasıdır. Bu temel amaca ulaşmak için mastitise neden olan ve kesin identifikasyonları yapılan Stafilokok, *E.coli* ve Streptokok suşlarının virulens faktörlerinin fenotipik ve genetik düzeyde belirlenmesi, genotiplendirilmesi ve enfeksiyon epidemiyolojisi ile ilişkisinin saptanması konuları da alt hedefler olarak belirlenmiştir.

Proje kapsamında yapılan çalışmalar sonucunda, farklı sürülerden sağlanan mastitis ile ilgili suşların en geniş anlamda patogenetik profili çıkarılmış ve mastitis patogenezindeki rolleri incelenmiştir. Böylece, özellikle son yıllarda gündeme gelen ve ülkemizde de kullanılmaya başlayan stafilokokal mastitis aşularında ve yine pazarda yer alan *E.coli* mastitislerine yönelik kullanılan aşılarda hangi virulens faktörlerine ait antijenlerin bulunması gerektiği de ortaya konmuştur. Projeden sağlanan bilgilerin kullanılması, daha geniş kapsamlı aşı çalışmalarına ve özellikle mastitis koruma programlarının düzenlenmesine katkı sağlayacak niteliktedir. Mastitise yol açan etkenlerin, insan sağlığı için potansiyel patojen olmaları nedeniyle incelenen virulens özelliklerin insan orijinli suşlarla karşılaştırılması açısından temel bilgi sağlama potansiyeli taşımaktadır. Ayrıca çalışma kapsamında izole edilen suşların antibiyotik dirençlilikleri de saptanmış olması, izole edilen etkenlerin antibiyotik direnç profilleri hakkında bilgi vermesi bakımından önemlidir.

III. Materyal ve Yöntem

Materyal

Proje kapsamında 11 aile ve 6 ticari işletmeden sağlanan mastitis şüpheli toplam 1135 süt örneği bakteriyolojik olarak incelendi. İncelenen süt örneklerinin orijinleri Tablo 1. de sunulmuştur. Ayrıca çalışmada, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan bakteri suş koleksiyonundan sağlanan standart suşlar da kullanılmıştır.

Tablo 1. Çalışmada incelenen süt örneklerinin orijini

İşletme	Toplanan Örnek sayısı
Aile işletmesi (11 adet)	17
İşletme-1	194
İşletme-2	284
İşletme-3	16
İşletme-4	100
İşletme-5	416
İşletme-6	108
Toplam	1135

Metot

A- İzolasyon ve İdentifikasyon: İşletmelerden steril koşullarda toplanan süt örnekleri soğuk zincirde laboratuvara ulaştırıldı. Laboratuvarda, süt örneklerinden koyun kanlı (%5-7) agara, Mac Conkey agara ve Edward's mediuma ekimler gerçekleştirildi. Tüm besiyerleri 37°C'de 24-72 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyona bırakılan besiyerleri her gün üreyen koloniler yönünden değerlendirildi. Üreyen koloniler makroskopik ve mikroskopik özellikleri değerlendirilerek biyokimyasal özelliklerine göre tanımlanıldı (Quinn ve ark., 2002; Ossmer, 1993). Staphylococcus spp., E.coli ve Streptococcus spp. olarak tanımlanılan mikroorganizmaların saf kültürleri yapılarak ileri analizler için -20 C'de gliserinli brusella buyyonda saklandı.

B- Virulens özelliklerinin belirlenmesi: Çalışma kapsamında izole edilen stafilokok, E.coli ve streptokok suşlarının bazı virulens özellikleri belirlendi. Bu özelliklerin belirlenmesinde fenotipik ve/veya moleküler teknikler kullanıldı. Çalışmada incelenen virulens özellikleri ile ilgili testler aşağıda verilmiştir.

1- Stafilokok suşlarının fenotipik özelliklerinin belirlenmesi

a- Koagülaz: Gram pozitif kok, katalaz pozitif, oksidaz negatif ve O/F testinde fermantatif özellik gösteren tüm suşlara, koagülaz testi yapıldı. Steril küçük test tüplerindeki 0.5 ml tavşan plazması üzerine, test edilecek suşların bir gecelik taze kültürlerinden 0,1 ml ilave edildi ve 37 °C'de inkube edildi. Test tüpleri 24 saate kadar izlendi ve plazmada oluşan koagülasyon pozitif olarak değerlendirildi (Arda, 2000).

b- Clumping faktör: Gram pozitif kok, katalaz pozitif, oksidaz negatif ve O/F testinde fermantatif özellik gösteren tüm suşlar, lam üzerinde steril distile su içinde süspanse edildi ve üzerine eşit miktarda sulandırılmamış tavşan plazması ilave edildi. 1-2 dakika içinde görülen koagülasyon pozitif olarak değerlendirildi (Arda, 2000).

c- Hemoliz: Suşların hemoliz özellikleri koyun kanlı agarda incelendi. Kanlı agara (%5 koyun kanı) ekilen suşlar, 37 °C de 24 saat inkube edildi ve bu süre sonrasında koloni etrafında oluşan hemoliz alanları kaydedildi. Bu değerlendirmeyi takiben besiyerleri 4 °C'e kaldırıldı ve 24 saat sonra yeniden hemoliz durumları yeniden değerlendirildi. Koloni çevresinde hemolitik alanlar görülmesi pozitif olarak değerlendirildi.

d- DNase: Gram pozitif kok, katalaz pozitif, oksidaz negatif ve O/F testinde fermantatif özellik gösteren tüm suşların DNase aktivitesi, DNase agarda belirlendi. Agara spot olarak ekilen suşlar, 48 saat 37 °C'de inkube edildi ve bu süre sonunda 1 N HCl ilave edildi ve koloni etrafında oluşan geniş açık alan pozitif olarak değerlendirildi (Arda, 2000).

e- Hemagglütinasyon (HA): Bakteriler bir gece TSB'de üretildikten sonra PBS ile 3 kez yıkandı. Elde edilen bakteri peleti yaklaşık olarak 10⁸ bakteri/ml (MacFarland No:3) olacak şekilde ayarlandı. Test 96'lık U tabanlı mikropleytlerde gerçekleştirildi. 1/10 oranında PBS ile sulandırılan bakteri süspansiyonu mikropleytte her gözde toplam 50 µl olacak şekilde kondu ve her çukura %1 olarak hazırlanan eritrositten (insan O grubu) eşit miktarda ilave edildi. Pleytler çalkalandıktan sonra üzerleri kapatıldı ve oda derecesinde 2 saat bekletildi. Bekleme sonrasında eritrositlerin dipte düğme şeklinde çökmesi negatif, pleytin tabanında dağınık olarak çökmesi pozitif olarak değerlendirildi (Rupp ve Archer, 1992).

f- Slime faktör: Stafilokok suşlarının slime üretiminin belirlenmesi amacıyla standart tüp (Christensen ve ark., 1985) ve kongo red agar (Nourizadeh ve Sultan, 1993) yöntemleri kullanıldı. İki yöntemden birinde pozitif sonuç alınan suşlar pozitif olarak değerlendirildi.

Standart tüp yönteminde, test edilecek stafilokok suşları TSB buyyona ekildi ve 37 °C'de 18 saat inkube edildi. Bu süre sonunda buyyonlar boşaltıldı ve PBS ile yıkandı. Yıkama işlemini takiben %1 safranin solüsyonu ilave edilerek oda derecesinde 30 dakika beklendi. Bu süre sonunda boya solüsyonu boşaltılarak tüpler iki defa PBS ile yıkandı ve tüpler ters çevrilerek kurumaya bırakıldı. Kurumayı takiben tüpün yüzeyinde oluşan boyalı film tabakası pozitif olarak değerlendirildi.

Kongo red agar yönteminde, test edilecek suşlar Kongo red boyası (0.8 g/l) ve sakkaroz (50 g/l) içeren brain heart infusion (BHI) agara tek koloni düşecek şekilde ekildi ve 37 °C'de 24 saat inkubasyona bırakıldı. Bu süre sonunda siyah renkli koloniler pozitif pembe renkli koloniler negatif olarak değerlendirildi.

2- E.coli suşlarının fenotipik özelliklerinin belirlenmesi

a-Hemoliz Testi: Morfolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre E.coli olarak tanımlanmış suşların hemoliz özellikleri, % 5 koyun kanı içeren Kanlı Agarda incelendi. Test edilecek suşlar kanlı agara ekildikten sonra 37°C de 18-24 saat inkube edildi ve koloniler etrafında oluşan hemoliz göre sonuçlar değerlendirildi (Siitonen,1992).

b- Hemagglütinasyon: İzole edilen E.coli suşlarının hemagglütinasyon özellikleri koyun kanı ile incelendi. Koyundan antikoagulantlı olarak alınan kan 3 kez PBS ile yıkandı ve eritrositler PBS ile %2 oranında sulandırıldı. Eritrosit süspansiyonları iki bölüme ayrılarak bir tüpe D-mannoz (%3) ilave edildi. Nutrient buyyonda üretilen *E.coli* suşlarının taze kültürlerinden 100 µl ile 50 µl mikropleytte karıştırıldı ve 37°C'de 18 saat inkube edildi. Bu sürenin sonunda dantela şeklinde çöküntü MSHA ve MRHA hemagglütinasyon pozitif olarak değerlendirildi (Wray ve ark., 1983; Sanchez-Carlo ve ark.,1984a).

3- Streptokok suşlarının fenotipik özelliklerinin belirlenmesi

a- Hemoliz: İzole edilen streptokok kolonileri, %5-7 koyun kanı içeren kanlı agara saf kültür olarak ekildi. 37 °C de 48 saat aerobik koşullarda inkube edildi ve sonuçlar oluşan

hemoliz durumuna göre alfa hemoliz, beta-hemoliz ve gama-hemoliz şeklinde değerlendirildi (Winn ve ark., 2006).

b- Hemagglütinasyon: İzole edilen streptokok suşları, Todd-Hewitt buyyonda üretildikten sonra üç kez PBS ile yıkandı ve PBS ile yeniden sulandırıldı. Hemagglütinasyon testi %2'lik tavşan eritrositleri ile lam üzerinde gerçekleştirildi. Eşit miktarda mikroorganizma ile eritrositler karıştırıldı ve 30 saniye içinde aglütinasyon oluşup oluşmamasına göre değerlendirildi. Aglütinasyon görülmesi pozitif olarak kaydedildi (Wibawan ve ark., 1993; Korhonen and Finne, 1985).

c- CAMP testi: İzole edilen tüm streptokok suşları için gerçekleştirildi. Bu test aynı zamanda identifikasyon amacıyla kullanıldı (Arda, 2000).

d- Lateks aglütinasyon: İzole edilen etkenlerin Lancefield sınıflandırması için lateks aglütinasyon testi ticari kitleriyle (BD BBL Strep Grouping Kits) gerçekleştirildi.

C- Antibiyotik Duyarlılık Testi

Proje kapsamında virulens özellikleri incelenen suşların farklı antibiyotiklere duyarlılıkları, ticari disklerin (Oxoid) kullanıldığı Diagnostic Sensitivity Test Agarda (Oxoid) disk difüzyon yöntemi ile belirlendi. Bu testte suşların, amoksisilin (10 µg), amoksisilin+klavulonik asit (30 µg), ampisilin (10 µg), ampisilin+sulbaktam (20 µg), eritromisin (10 µg), kloksasilin (5 µg), oksitetrasiklin (10 µg), sefoperazon (30 µg), trimethoprim (50 µg) ve trimethoprim+sülfametaksazol (25 µg) duyarlılıkları incelendi. Suşların metisilin duyarlılıklarının belirlenmesinde oksasilin (5 µg) diski kullanıldı.

D- Moleküler analiz

Proje kapsamında izole edilen ve fenotipik özelliklerine göre seçilen suşların bazı virulens özellikleri, farklı primerler kullanılarak PCR temelli tekniklerle incelendi. Bu çalışmalarda, ilk aşamada tüm analizlerde kullanılmak üzere genomik DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Suşların moleküler analiz çalışmalarında, PCR, multipleks PCR, RAPD ve farklı RE'lerin kullanıldığı PCR-RFLP teknikleri kullanıldı. Bu testlere ilave olarak, seçilen suşların tüm hücre proteinleri SDS-PAGE ile analiz edildi.

I- PCR analizi

PCR işlemi, genomik DNA ekstaksiyonunu takiben, amplifikasyon, elektroforez ve görüntüleme olmak üzere temel olarak üç aşamada gerçekleştirildi. Amplifikasyon işlemi, termocyclerda (Biometa T1 ve Techne), elektroforez işlemi elektroforez ünitesinde (Elite 300 plus, Wealtec; Mini gel unite, Hooper) ve elde edilen görüntülerin resimlendirilmesi bilgisayar destekli görüntüleme analiz sistemi (Bio Imaging Sytem; Syngene) kullanıldı. Tüm PCR testlerinde primerler ticari olarak sentezletirildi. Oligonukleotid dizileri Tablo 2. de sunulmuştur. Proje kapsamında yapılan tüm PCR işlemlerinde, Taq DNA polimeraz (Fermentas), dNTP (Fermentas), PCR buffer (Fermentas), MgCl₂ (Fermentas) kullanıldı. Agaroz jel hazırlanmasında ise agaroz (Basica Le Prona) ve etidium bromidden (Sigma) yararlanıldı.

Tablo 2. Projede kullanılan primerlerin hedef bölgeleri, oligonükleotit dizileri ve bant büyüklükleri

Test	Bakteri	Hedef gen bölgesi	Oligonükleotit dizileri (5'-3')	Bant büyüklüğü (bp)	Referans
PCR	Stafilokok	16S-23S rRNA	TCTTCAGAAGATGCGGAATA	430-458	Forsman ve ark., 1997; Annemuller ve ark., 1999.
			TAAGTCAAACGTTAACATACG		
PCR	Stafilokok	Protein A (spa)	CAAAGATCAACAAAGCGCC	622 bp	Schwarzkopf ve ark., 1993
			CGAAGGATCGTCTTTAAGGC		
Multipleks PCR	Stafilokok	clfA	GCAAAAATCCAGCACAAACAGGAAACGA	638	Mason ve ark., 2001
			CTTGATCTCCAGCCATAATTGGTGG		
		mecA	TCCAGGAATGCAGAAAAGACCAAAGC	499	
			GACACGATAGCCATCTTCATGTTGG		
Multipleks PCR	Stafilokok	mecA	CCTAGTAAAGCTCCGGAA	314	Choi ve ark., 2003
			CTAGTCCATTCGGTCCA		
		16S rDNA	CAGCTCGTGTCTGAGATGT	420	
			AATCATTGTCCACCTTCG		
		femA	CTTACTTACTGCTGTACCTG	684	
			ATCTCGCTTGTATGTGC		
RAPD	Stafilokok	D11344	AGTGAATTCGCGGTGAGATGCCA		Fitzgerald ve ark., 1997
PCR-RFLP	Stafilokok	aroA	AAGGGCGAAATAGAAGTGCCGGGC	1153	Marcos ve ark., 99
			CACAAGCAACTGCAAGCAT		
PCR-RFLP	Stafilokok	coa	CGAGACCAAGATTCAACAAG	740-900	Van Belkum ve ark., 1997
			AAAGAAAACCACTCACATCA		
PCR-RFLP	Stafilokok	agr	GTTCACTGTGTCGATAATCC	3094	Hayakawa ve ark., 2001; Novick ve ark., 1995.
			AACGTTTCTACCGATGCAT		
PCR	E.coli	papE-F	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT	336 bp	Yamamoto ve ark., 1995
			AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA		
PCR	E.coli	hlyA	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	1177 bp	Yamamoto ve ark., 1995
			ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA		
PCR	E.coli	iucD	TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT	602 bp	Yamamoto ve ark., 1995
			AATATCTTCCCTCCAGTCCGGAGAAG		
PCR	E.coli	cnfI	AAGATGGAGTTTCCCTATGCAGGAG	498 bp	Yamamoto ve ark., 1995
			CATTGAGAGTCTGCCCTCATTATT		
PCR	E.coli	fimH	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG	508 bp	Johnson ve ark., 2000.
			GCAGTCACCTGCCCTCCGTGG		
PCR	E.coli	traT	GATGGCTGAACCGTGGTTATG	307 bp	Kaipainen ve ark., 2002
			CACACGGGTCTGGTATTATGTC		
RAPD	Streptokok	OPE-04	GTGACATGCC		Gillespie et al., 1997
PCR-RFLP	Streptokok	16S-23S	ACGATGAGTGCTAGGTGTTAGG	670-1590	McDonald et al., 2005
			CTCACGGTACTGGTTCATAT		

1- Stafilokok suşlarının PCR analizi

a- Genomik DNA izolasyonu: Genomik DNA izolasyonunda iki farklı yöntem kullanıldı. İlk yöntemde (Fitzgerald ve ark., 1997), izole edilen ve virulens özelliklerinin belirlenmesi amacıyla seçilen stafilokok suşları, triptik soy brotta (TSB) bir gece kültüre edildikten sonra santrifüj edildi ve oluşan pelet (1 ml), 200 µl TE buffer (10 mM Tris-HCl- 1 mM-EDTA, pH 7.5) ile yıkandı. Yıkama sonrasında hücreler 50 ml sukroz içeren (%25) 50 mM Tris-HCl bufferla (pH 8) yeniden süspansiyon edildi. Sonra 50 mM Tris bufferda hazırlanan (pH 8; 1 mg/ml) 10 µl lizostafin ilavesi yapıldı ve karışım 37 °C'lik su banyosunda 20 dakika beklendi. İnkubasyondan sonra karışıma 20 µl proteinaz K (20 mg/ml olacak şekilde 10 mM Tris-HCl bufferde hazırlanan, pH 8) ilavesi yapıldı ve karışım 50 °C'de 1 saat inkübe edildi. Bu aşamadan sonra 20 µl 0.5 M EDTA ve daha sonra 20 µl %10'luk sodyum N-lauroyl sarcosine ilave edildi ve karışım iyice karıştırılarak buzda 1 saat beklendi. Bu karışım 55 °C'de 1 saat inkübe edildikten sonra TE bufferdan 400 µl ilave edildi ve bu karışıma 100 µl 5 M NaCl eklendi. NaCl (0.7 M) solusyonu içinde %10'luk hazırlanan cetyltrimethylammoniumbromide solusyonundan 80 µl ilavesinden sonra elde edilen karışım, 65 °C'de 10 dakika beklendi. Bu aşamadan sonra elde edilen karışım chloroform:isoamyl alcohol

(24:1) ve sonra phenol: chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) ile ekstrakte edildi ve bunu takiben isopropanol ile nükleik asit presipite edildi. Elde edilen DNA, TE bufferla yeniden sulandırılarak, tüm testlerde template DNA olarak kullanıldı.

İkinci yöntemde ise, DNA izolasyonu için ticari kit (Genomic DNA Purification Kit, Fermentas) kullanıldı. Triptik soy brotta (TSB) bir gece kültüre edilen stafilocok suşları santrifüj edildi ve oluşan peletten üretici firmanın protokolüne göre işlemler gerçekleştirildi. Her iki yöntem sonrasında elde edilen sonuçlar karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

b- S.aureus spesifik 16S-23S rRNA PCR: Morfolojik ve biyokimyasal testlerle identifiye edilen stafilocok suşları, öncelikle S.aureus yönünden genotipik olarak da belirlendi. Bu amaçla S.aureus spesifik 16S-23S rRNA gen bölgesi Forsman ve ark. (1997) tarafından tanımlanan primerler (Tablo 2) kullanılarak amplifiye edildi. PCR karışımı, 1 µl primer 1, 1 µl primer 2, 0.6 µl dNTP, 3 µl buffer, 1,8 µl MgCl₂, 0.2 µl Taq DNA polimerase ve 21,4 µl distile su konularak hazırlandı ve bu karışıma son olarak 1 µl template DNA ilave edildi. Tüpler 92 °C'de 2 dakika ön siklutan sonra 25 siklus olarak 95 °C de 30 s, 56 °C de 30 s ve 72 °C'de 30 s olarak gerçekleştirildi ve son zincir uzama 72 °C'de 5 dakika olarak tamamlandı. PCR amplifikasyonundan sonra örnekler, %1,5 agaroz gelde elektroforeze tabi tutuldu ve sonuçlar görüntüleme sisteminde değerlendirildi.

c- Protein A (spa) PCR: Stafilocok suşlarında Protein A gen bölgesinin saptanmasında Schwarzkopf ve ark. (1993) tarafından bildirilen yöntem kullanıldı. Bu işlem için kullanılan primerler (Tablo 2), ticari olarak sentezletirildi ve PCR karışımı 1 µl primer 1, 1 µl primer 2, 0.6 µl dNTP, 3 µl buffer, 1,8 µl MgCl₂, 0.2 µl Taq DNA polimerase ve 21,4 µl distile su konularak hazırlandı ve bu karışıma son olarak 1 µl template DNA ilave edildi. Tüpler 94 °C'de 2 dakika ön siklutan sonra 30 siklus olarak 95 °C de 60 s, 54 °C de 60 s ve 72 °C'de 60 s olarak gerçekleştirildi ve son zincir uzama 72 °C'de 5 dakika olarak tamamlandı. PCR amplifikasyonundan sonra örnekler, %1,5 agaroz gelde elektroforeze tabi tutuldu ve sonuçlar görüntüleme sisteminde değerlendirildi.

d- Multipleks PCR

i- 16S rDNA, femA, mecA PCR: Bu testle izole edilen stafilocok suşlarında üç özellik farklı primerler (Tablo 2) kullanılarak aynı anda değerlendirildi. Bu primerlerden 16S rDNA, stafilocok suşlarını cins düzeyinde, femA S.aureus spesifik ve mecA metisilin dirençliliğini belirlemek için kullanıldı. PCR karışımı, 0,4 µM primerler, 200 µM dNTP, 3 µM MgCl₂, 0.2 µl Taq DNA polimerase, 2 µl template DNA ve distile su ile 25 µl'e tamamlanarak hazırlandı. Tüpler 95 °C'de 1 dakika ön siklutan sonra 30 siklus olarak 95 °C de 2 dakika, 54 °C de 60 s ve 72 °C'de 60 s olarak gerçekleştirildi ve son zincir uzama 72 °C'de 7 dakika olarak tamamlandı. PCR amplifikasyonundan sonra örnekler, %1,5 agaroz gelde elektroforeze tabi tutuldu ve sonuçlar görüntüleme sisteminde değerlendirildi.

ii- mec ve clfA PCR: Bu spesifik gen bölgeleri Mason ve ark. (2001) tarafından bildirilen iki farklı primer setinin kullanıldığı (Tablo 2) multipleks PCR yöntemi ile belirlendi. PCR karışımı, 1 µl stok primer, 5 µl dNTP, 5 µl buffer, 1.5 µl MgCl₂, 0.25 µl Taq DNA polimerase ve 34.25 µl distile su konularak hazırlandı ve bu karışıma son olarak 1 µl template DNA ilave edildi. Tüpler 94 °C'de 3 dakika ön siklutan sonra 36 siklus olarak 94 °C de 90 s, 55 °C de 60 s ve 72 °C'de 60 s olarak gerçekleştirildi ve son zincir uzama 72 °C'de 10 dakika olarak tamamlandı. PCR amplifikasyonundan sonra örnekler, 0,5 µg etidium bromid içeren %1 agaroz gelde elektroforeze tabi tutuldu ve sonuçlar görüntüleme sisteminde değerlendirildi.

f- RAPD-PCR: Fitzgerald ve ark (1997), tanımladığı yöntem kullanıldı. Karışım hazırlandıktan sonra iki aşamada PCR gerçekleştirildi. İlk aşama 4 siklus olarak 94 °C'de 5 dakika, 36 °C'de 5 dakika ve 72 °C'de 5 dakika olarak gerçekleştirildi. Bu aşamadan sonra 30 siklus olarak 94 °C'de 1 dakika, 36 °C'de 1 dakika ve 72 °C'de 2 dakika olarak gerçekleştirildi ve son aşamada 72 °C'de 10 dakika ile işlem tamamlandı. Amplifikasyon işleminden sonra örnekler, %1,5 agaroz gelde elektroforeze tabi tutuldu ve sonuçlar görüntüleme sisteminde değerlendirildi.

g- PCR-RFLP

i- aroA geni amplifikasyonu için aroA gen bölgesine spesifik primerler (Tablo 2) kullanıldı ve test Marcos ve ark. (1999) tarafından bildirilen yöntemle göre gerçekleştirildi. PCR karışımı, 5 µl DNA template, 1,25 µl Tag DNA polimeraz, 5 µl 10xPCR buffer, 0,6 µl her primerden, 0,5 mM dNTP ve distile su ile 50 µl tamamlanarak hazırlandı. Karışım 94 °C'de 2 dakika denatüre edildi. Daha sonra 40 siklus olarak 92 °C de 1 dak., 58 °C de 1 dak., 72 °C de 1,5 dakika amplifiye edildi. Son siklustan sonra 72 °C de 10 dakika tutuldu. Örnekler %3 agaroz jelde elektroforeze tabii tutuldu. RFLP için *TagI* ve *RsaI* endonükleazla muamele edildikten sonra işlemler tamamlandı.

ii- Koagülaz gen (coa) bölgesinin saptanmasında Schwarzkopf ve ark (1993) tarafından bildirilen yöntem kullanıldı. Bu işlem için kullanılan primerler (coa), ticari olarak sentezletirildi (Tablo 2). PCR karışımı, 1 µl primer 1, 1 µl primer 2, 0,6 µl dNTP, 3 µl PCR buffer, 1,8 µl MgCl₂, 0,2 µl Taq DNA polimerase ve 21,4 µl distile su konularak hazırlandı ve bu karışıma son olarak 1 µl DNA ilave edildi. Tüpler 94 °C'de 4 dakika ön siklustan sonra 25 siklus olarak 94 °C de 60 s, 58 °C de 60 s ve 72 °C'de 60 s olarak gerçekleştirildi ve son zincir uzama 72 °C'de 5 dakika olarak tamamlandı. PCR amplifikasyonundan sonra örnekler, %1,5 agaroz gelde elektroforeze tabii tutuldu ve sonuçlar görüntüleme sisteminde belirlendi. Yukarıda tanımlanan yöntemle göre gerçekleştirilen Coa geni PCR amplifikasyonundan sonra elde edilen amplikonlara, AluI (10 U, Fermentas) ile RFLP analizi uygulandı. Bu amaç için 12,5 µl PCR ürünü, 1 µl enzim ve 1,5 µl restriksiyon buffer karıştırıldı ve 37 C de 2 saat inkubasyona bırakıldı. Bu işlem sonrasında ürün elektroforeze tabii tutuldu.

iii. agr lokus: Novick ve ark (1995) tarafından bildirilen yöntemle göre gerçekleştirildi. PCR karışımı, 5 µl DNA template, 1,25 µl Tag DNA polimeraz, 5 µl 10xPCR buffer, 0,6 µl her primerden, 0,5 mM dNTP ve distile su ile 50 µl tamamlandı. Karışım 94 °C'de 2 dakika denatüre edildi. Daha sonra 30 siklus olarak 94 °C de 1 dak., 56 °C de 1 dak., 72 °C de 1 dakika amplifiye edildi. Amplifikasyondan sonra, PCR ürünleri %1,5 agaroz jelde elektroforeze tabii tutuldu. RFLP için MboI endonükleazla muamele edildikten sonra işlemler tamamlandı.

2- E.coli suşlarının PCR analizi

a- Genomik DNA izolasyonu: Genomik DNA izolasyonu için ticari kit (Genomic DNA Purification Kit, Fermentas) kullanıldı. E.coli suşlarının bir gecelik taze buyyon kültürleri santrifüj edildi ve oluşan peletten üretici firmanın protokolüne göre işlemler gerçekleştirildi.

b- PCR: İzole edilen ve genomik DNA'ları ekstrakte edilen suşların bazı virulens özellikleri PCR ile analiz edildi. Bu özellikler arasında sidereforlar (iucD), fimbria (papE-F), alfa hemoliz (hlyA) ve sitotoksik nekrotizan faktör (cnf1), tip 1 fimria (fimH) ve serum direnci (traT) spesifik primerler (Tablo 2) kullanılarak incelendi.

Siderofor (iucD), fimbria (papE-F), hemoliz (hlyA) ve sitotoksik nekrotizan faktör (cnf1) özelliklerinin belirlenmesinde Yamamoto ve ark (1995) bildirdikleri multipleks PCR yöntemi modifiye edilerek kullanıldı. PCR karışımı hazırlandıktan sonra 94°C'de 3 dakika ön

denatürasyon yapıldı. Bu aşamadan sonra test, 30 siklus olarak 94°C'de 60 s, 63°C'de 60 s, 72°C'de 120 s gerçekleştirildi ve son aşamada aşamada 72°C'de 7 dakika bekletilerek reaksiyon tamamlandı.

Tip 1 fimria (fimH) gen bölgesinin belirlenmesinde Johnson ve Stell (2000)'in bildirdikleri PCR yöntemi kullanıldı. PCR karışımı hazırlandıktan sonra 94°C'de 3 dakika ön denatürasyon yapıldı. Bu aşamadan sonra test, 30 siklus olarak 94°C'de 60 s, 63°C'de 60 s, 72°C'de 120 s gerçekleştirildi ve son aşamada aşamada 72°C'de 7 dakika bekletilerek reaksiyon tamamlandı.

Serum direnci (traT) gen bölgesinin saptanması amacıyla Kaipainen ve ark.,(2002)'nın belirttiği protokol modifiye edilerek uygulandı. Bu işlemde 94°C'de 3 dakika ön denatürasyon yapıldı. Bu aşamadan sonra test, 30 siklus olarak 94°C'de 60 s, 60°C'de 60 s, 72°C'de 120 s gerçekleştirildi. En son aşamada 72°C'de 7 dakika bekletilerek reaksiyon tamamlandı.

Tüm PCR işlemlerinden sonra örnekler %1,5'luk agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutuldu ve sonuçlar PCR bantlarının varlığı göre değerlendirildi.

3- Streptokok suşlarının PCR analizi

a- Genomik DNA izolasyonu: Genomik DNA izolasyonu için ticari kit (Genomic DNA Purification Kit, Fermentas) kullanıldı. Triptik soy brotta (TSB) bir gece kültüre edilen streptokok suşları santrifüj edildi ve oluşan peletten üretici firmanın protokolüne göre işlemler gerçekleştirildi.

b- RAPD-PCR: Gillespie ve ark. (1997) tarafından bildirilen yöntem kullanıldı. Karışım hazırlandıktan sonra PCR işlemi 94.5 °C de 120 s denaturasyon işlemi takiben 35 siklus olarak 94.5 °C'de 70 s, 33 °C'de 35 s ve 72 °C'de 130 s gerçekleştirildi ve son aşamada 94.5 °C'de 150 s ve 33 °C'de 165 s ile işlem tamamlandı. Amplifikasyon işleminden sonra örnekler, %2 agaroz gelde elektroforeze tabi tutuldu ve sonuçlar görüntüleme sisteminde değerlendirildi.

c- PCR-RFLP: Streptococcus spp. 16-23S ribozomal DNA gen amplifikasyonu için spesifik primerler (Tablo 2) kullanıldı ve McDonald ve Deighton (2005) (1999) tarafından bildirilen yöntemle göre gerçekleştirildi. PCR karışımı hazırlandıktan sonra 95 °C'de 15 dakika denatüre edildi. Daha sonra 35 siklus olarak 94 °C de 1 dak., 50 °C de 1 dak., 72 °C de 2 dakika amplifiye edildi. Son siklustan sonra 72 °C de 10 dakika tutuldu. Bu aşamadan sonra RFLP için *AluI* ve *RsaI* endonükleaz enzimleri ile muamele edildikten sonra örnekler %4 agaroz jelde elektroforeze tabii tutuldu ve sonuçlar görüntüleme sisteminde değerlendirildi.

II. SDS-PAGE analizi

İzole edilen suşların tüm hücre proteinlerinin SDS-PAGE analizi, denatüre koşullarda, kademeli sistemde vertikal slab jel ünitesinde (Hoefler SE-600 vertical slab gel unit) yapıldı (Laemmli, 1970). Elektroforez işlemlerinde sabit amper/sabit voltaj veren güç kaynağından (Shandon Southern, Vokam) yararlanıldı. SDS-PAGE işleminde dizici jel (%4) ve ayıcı jel (%10) kullanıldı. Stafilokok ve streptokok suşları katı besiyerinde üretildikten sonra, PBS içinde süspanse edildikten sonra sonikasyon ve kaynatma işlemi uygulanırken E.coli suşları süspanse edildikten sonra direkt olarak kaynatıldı. Bu aşamalardan sonra izci boya (%0.1 bromfenol blue) içeren lizis buffer içinde süspanse edildi ve her çukura önce tank buffer sonra belirli miktarda örnek (20 µl) mikroenjektör ile yüklendi. Her jelin bir gözüne aynı şekilde işlenmiş protein molekül ağırlık standardı (Sigma; bovine albumin MA 66.000, egg albumin MA 45.000, gliseraldehid 3 fosfat dehidrogenaz MA 36.000, karbonik anhidraz MA 29.000,

tripsinogen MA 24.000, tripsin inhibitor MA 20.100, α laktalbumin MA 14.200) yerleřtirildi.

Cihazın parçaları birleştirildikten sonra alt ve üst tanklara tank buffer dolduruldu. Jelin yerleştirilmesini takiben elektrik kaynağı 30 mA sabit akıma ayarlandı. Soğutma sistemi çalıştırılarak işleme başlandı ve izci boya jelin ucuna ulaşınca kadar devam edildi. Elektroforez işlemi bittikten sonra jel cam sandviçlerden ayrılarak fiksatif-boya (metanol, asetik asit, coomasie blue R-250) solusyonunda 2-4 saat bekletildi. Dekolerasyon amacıyla jel 1.boya giderici solusyonunda 1 saat, 2.boya giderici solusyonunda zemin rengi şeffaflaşınca kadar bekletildi. Suşlara ait protein profillerinin moleküler ağırlıkları, moleküler ağırlık standartları kullanılarak hesaplandı.

IV. Analiz ve Bulgular

A-İzolasyon ve identifikasyon bulguları: Proje kapsamında aile ve ticari işletmelerden toplanan 1135 adet süt örneğinin mikrobiyolojik incelemesi sonrasında, 178 (%15.7) *Staphylococcus* spp., 99 (%8.7) *E.coli* ve 65 (%5.7) *Streptococcus* spp izole edildi. İzole edilen 178 adet stafilokok suşunun 126 (%70.8)'i *S.aureus* olarak tanımlandı. Streptokok suşlarının identifikasyonu sonucunda incelenen 65 suşun 35 (%53.9)'i *S.uberis*, 16 (%24.6)'sı *S.agalactiae*, 14 (%21.5)'ü *S.dysgalactiae* olarak tanımlandı.

B-Virulens özelliklerinin belirlenmesi: Çalışma kapsamında incelenen Stafilokok suşlarının virulens özellikleri Tablo 3'te sunulmuştur. İncelenen 178 stafilokok suşunun 126 (%70.8)'sı koagülaz, 122 (%68.5)'si clumping faktör, 133 (%74.7)'ü hemoliz, 121 (%68)'i DNaz, 68 (%38.2)'i hemagglütinasyon ve 154 (86.5)'ü slime faktör yönünden pozitif bulundu.

Tablo 3. Proje kapsamında incelen suşların virulens özellikleri

Özellik	Pozitif suş sayısı (%)	Negatif suş sayısı (%)
Koagülaz (n=178)	126 (70.8)	52 (29.2)
Clumping faktör (n=178)	122 (68.5)	56 (31.5)
Hemoliz (n=178)	133 (74.7)	45 (25.3)
DNaz (n=178)	121 (68)	57 (32)
Hemagglütinasyon (n=178)	68 (38.2)	110 (61.8)
Slime faktör (n=178)	154 (86.5)	24 (13.5)

İncelenen 99 *E.coli* suşunun 10 (%10.1)'u hemoliz ve 4 (%4)'ü MSHA yönünden pozitif bulundu. *E.coli* suşlarının hiçbirinde MRHA özelliğine rastlanmadı.

Hemoliz özelliği yönünden test edilen 65 streptokok suşunun 43 (%66.1)'ü alfa hemolitik, 12 (18.5)'si beta hemolitik ve 10 (%15.4)'ü gama hemolitik olarak belirlendi. CAMP testinde pozitif olan suşlar *S.agalactiae* olarak tanımlandı ve biyokimyasal testlerle identifikasyonda ilave test olarak kullanıldı. Lancefield gruplandırmasına göre lateks agglütinasyon testi ile *S.agalactiae* suşları B ve *S. dysgalactiae* suşları ise C grubunda belirlendi. *S. uberis* suşları bu test ile gruplanamadı. Hemagglütinasyon sonuçlarına göre Grup B olarak tanımlanan 16 suşun 3 (%18.8)'ü hemagglütinasyon testinde pozitif bulundu.

C- Antibiyotik Duyarlılık Test Bulguları

Proje kapsamında incelenen *Staphylococcus* spp., *E.coli* ve *Streptococcus* spp. suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları Tablo 4. de sunulmuştur. *Staphylococcus* spp. suşlarında, incelenen 178 suşun 108 (%60.1)'i amoksisiline, 153 (%86)'ü amoksisilin+klavulonik asite, 76 (%42.7)'sı ampisiline, 108 (%60.1)'i ampisilin+sulbaktama, 86 (%48.3)'ü eritromisine, 148 (%83.1)'i kloksasiline, 88 (%49.4)'i oksitetrasikline, 131 (%73.6)'i sefoperazona, 128 (%72)'i trimetoprima, 152 (%85.4)'ü

trimethoprim+sulfametoksazola duyarlı bulundu. İncelenen 178 suşun 160 (%89.9)'ı metisiline duyarlı bulundu. İzole edilen 99 E.coli suşunun 74 (%74.7)'ü amoksisiline, 82 (%82.8)'si amoksisilin+klavulonik asite, 70 (%70.7)'i ampisiline, 75 (%75.8)'i ampisilin+sulbaktama, 71 (%71.7)'i oksitetrasikline ve 81 (%81.8)'i trimethoprim+sulfametoksazola duyarlı bulundu. İncelenen 65 Streptococcus spp. suşunun 58 (%89.2)'i amoksisiline, 62 (%95.4)'si amoksisilin+klavulonik asite, 59 (%90.8)'u ampisiline, 61 (%93.8)'i ampisilin+sulbaktama, 52 (%80)'si eritromisine, 60 (%92.3)'i kloksasiline, 48 (%73.8)'i oksitetrasikline 59 (%90.8)'u trimethoprim+sulfametoksazola duyarlı bulundu.

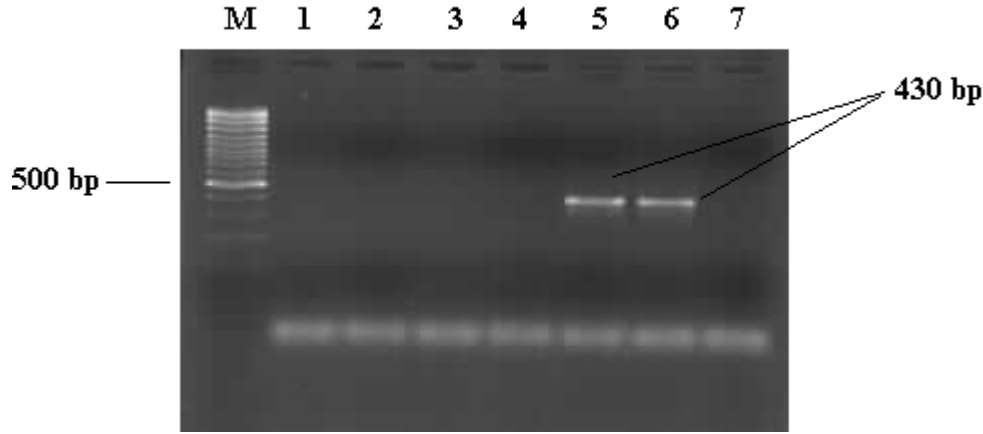
Tablo 4. Projede incelenen suşlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları

Antibiyotik / Bakteri	Stapylococcus spp. N=178		E.coli N=99		Streptococcus spp. N=65	
	Duyarlı Suş sayısı	%	Duyarlı Suş sayısı	%	Duyarlı Suş sayısı	%
Amoksisilin	108	60.1	74	74.7	58	89.2
Amoksisilin+ klavulonik asit	153	86	82	82.8	62	95.4
Ampisiline	76	42.7	70	70.7	59	90.8
Ampisilin +sulbaktam	108	60.1	75	75.8	61	93.8
Eritromisin	86	48.3	-	-	52	80
Kloksasilin	148	83.1	-	-	60	92.3
Oksitetrasiklin	88	49.4	71	71.7	48	73.8
Sefoperazon	131	73.6	-	-	-	-
Trimethoprim	128	72	-	-	-	-
Trimetoprim+sulfa metoksazol	152	85.4	81	81.8	59	90.8

D- Moleküler analiz bulguları

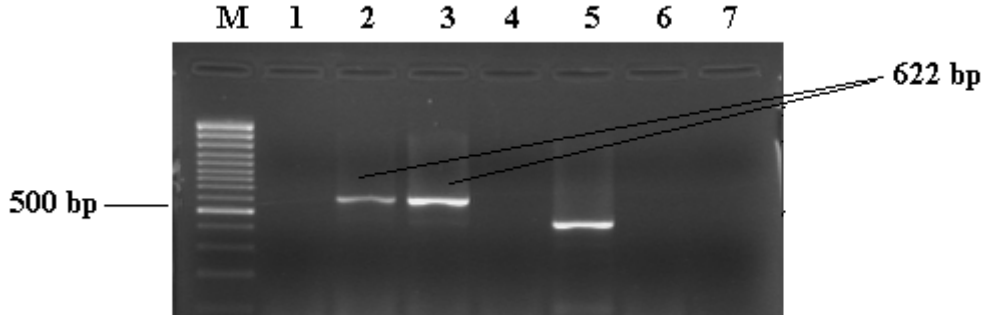
1- Stafilokok suşlarının PCR analiz bulguları

a- S.aureus spesifik 16S-23S rRNA PCR: Morfolojik ve biyokimyasal testlerle tanımlanmış stafilokok suşlarının S.aureus spesifik 16S-23S rRNA gen bölgesinin PCR işlemi sonrasında, S.aureus için spesifik bantlar 430 bp uzunluğunda saptandı (Resim 1). İncelenen 178 Stafilokok suşunun 116 (%65.2)'i S.aureus spesifik 16S-23S rRNA gen bölgesinin pozitif olduğu saptandı. Bu bulguların, klasik identifikasyon bulguları ile paralel olduğu belirlendi.



Resim 1. Staphylococcus spp. olarak tanımlanan suşların S.aureus spesifik 16S-23S rRNA primerleri kullanılarak yapılan PCR sonuçları. M: DNA ladder (Gene ruler 100 bp DNA ladder plus, Fermentas), 5-6. hatlar S.aureus pozitif bantlar.

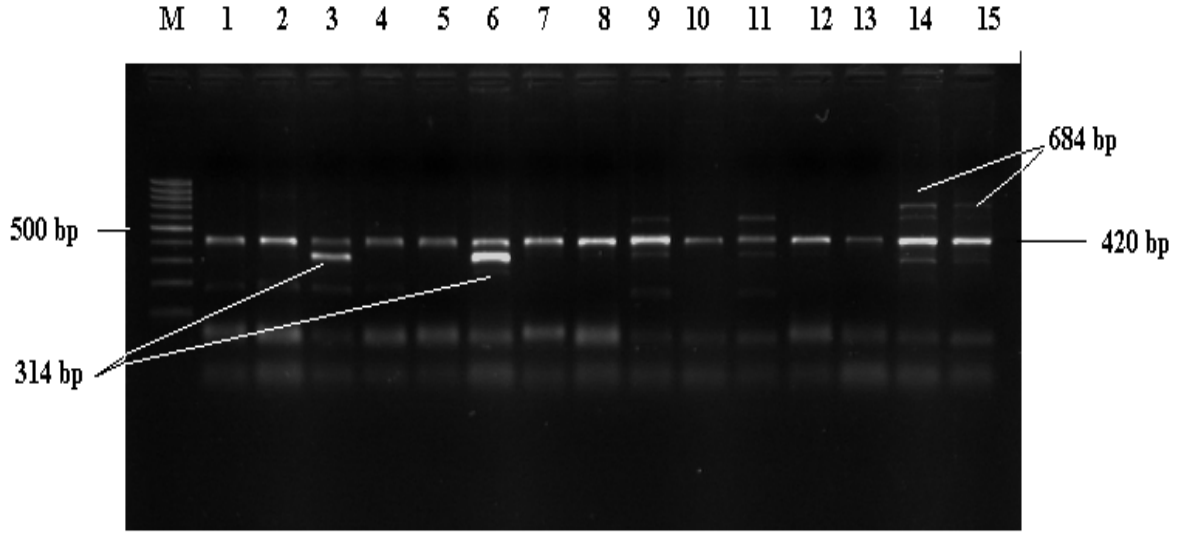
c- Protein A (*spa*) PCR: Stafilokok suşlarında Protein A gen bölgesinin saptanması amacıyla yapılan PCR sonucunda, *spa* gen bölgesine sahip suşlarda spesifik bantlar 622 bp uzunluğunda saptandı (Resim 2). İncelenen 178 suşun 106 (%59.6)'ünde protein A gen bölgesi saptandı. Bu gen bölgesi sadece S.aureus suşlarında pozitif bulundu ve bu oran S.aureus suşları arasında %91.4 olarak belirlendi.



Resim 2. Staphylococcus spp olarak tanımlanan suşların protein A (*spa*) PCR sonuçları. M: DNA ladder (Gene ruler 100 bp DNA ladder plus, Fermentas), üst sıra 2, 3 ve 5. hatlar protein A pozitif bantlar.

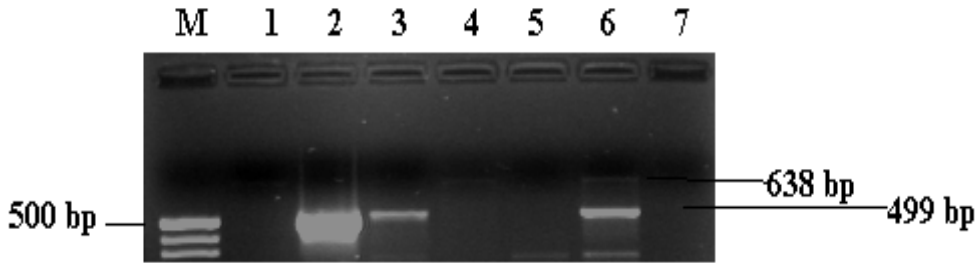
d- Multipleks PCR

1- 16S rDNA, femA, mecA PCR: Bu testle süt örneklerinden izole edilen ve biyokimyasal özelliklerine göre tanımlanmaları yapılan 178 adet stafilokok suşunun cins (16S rDNA) ve tür düzeyinde S.aureus tanımlanması (femA) ile metisilin direnç geninin (mecA) belirlenmesi için yapılan multipleks PCR'ın, bu amaca uygun olduğunu belirlendi. Bu çalışmada 16S rDNA spesifik bantlar 420 bp, femA spesifik bantlar 684 bp ve mecA spesifik bantlar 314 bp uzunluğunda saptandı (Resim 3). Bu çalışmada izole edilen tüm suşlarda 16S rDNA spesifik bantlar saptanırken, 114 suşta femA ve 18 suşta mecA geni (314 bp) belirlendi. Bu bulgular, konvansiyonel tekniklerle yapılan test sonuçları ile uyumlu bulundu. Ayrıca femA sonuçları ile S.aureus spesifik 16S-23S rRNA PCR sonuçlarının da paralel olduğu belirlendi.



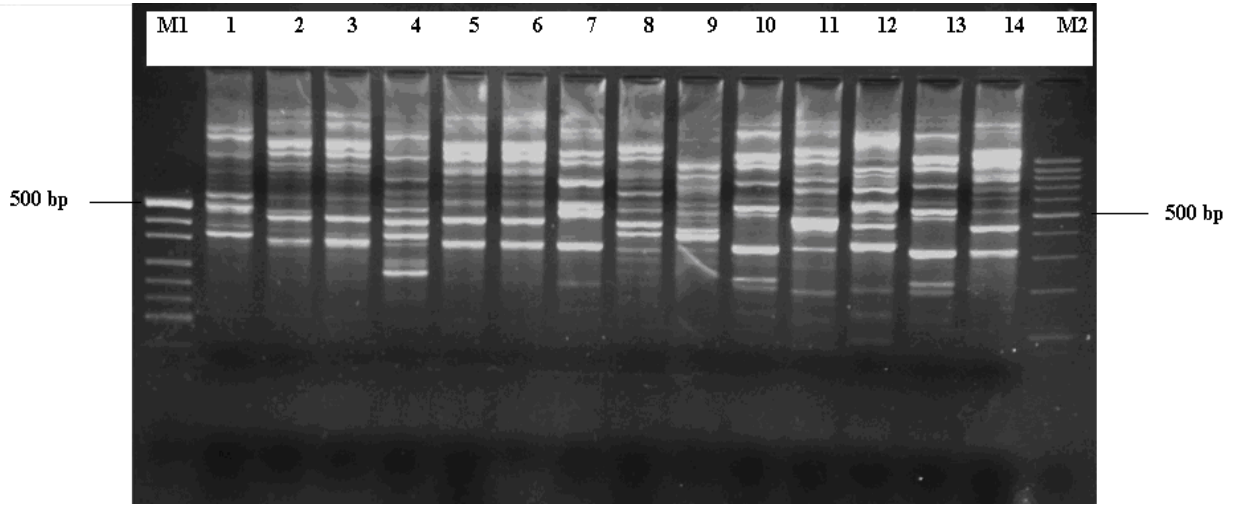
Resim 3. Stafilokok suşlarında 16S rDNA, femA ve mecA multipleks-PCR bulguları. M: DNA ladder (Gene ruler 100 bp DNA ladder plus, Fermentas), 1-15 16S rDNA pozitif, 3 ve 6 hatlar mecA pozitif, 14 ve 15.hatlar femA pozitif.

ii- mec ve clfA PCR: Bu multipleks PCR ile incelenen suşlarda bir virulens özelliği olan clumping faktör ve metisilin dirençliği birlikte saptandı. Konvansiyonel yöntemlerle pozitif bulunan 122 suşun 120 (%98.4)'sinde clumping faktör geni 638 bp ve 18 suşta mecA geni 499 bp uzunluğunda saptandı (Resim 4).



Resim 4. Stafilokok suşlarında mecA ve clfA multipleks-PCR bulguları. M: DNA ladder (pUC19 DNA/Mspl Marker, Fermentas), 2-3. hatlar mecA pozitif, 6. hat mecA ve clfA pozitif.

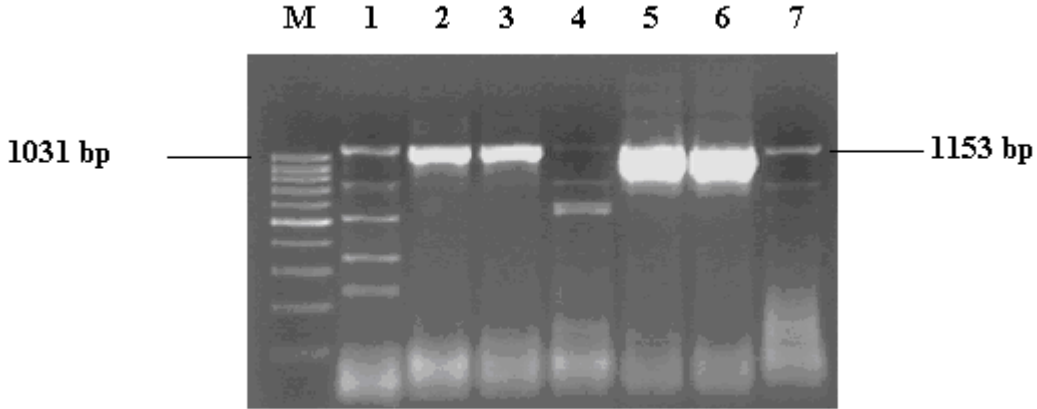
f- RAPD-PCR: Proje kapsamında izole edilen Stafilokok suşlarının D11344 primerleri ile gerçekleştirilen RAPD-PCR analizinde suşlara ait elde edilen bant profillerinin oldukça farklılık gösterdiği saptandı (Resim 5). Bu test özellikle aynı işletmeden izole edilen ve farklı band paternine sahip suşların belirlenmesine yönelik yapılabileceğini ancak farklı işletmeler arasında yapıldığında çok farklı band paternlerinin çıkması nedeniyle fazla bir yarar sağlamayacağı ortaya kondu.



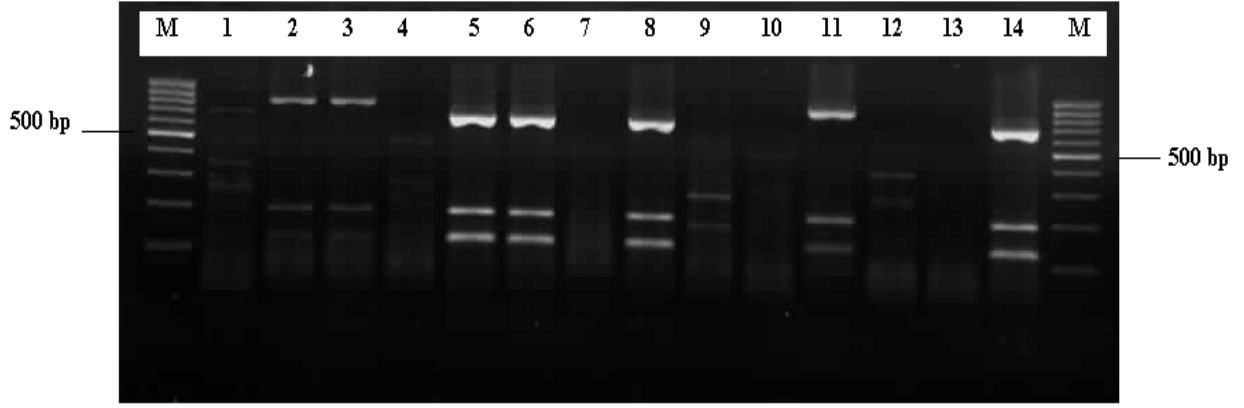
Resim 5. Stafilokok suşlarının D11344 primerleri ile gerçekleştirilen RAPD-PCR'da elde edilen bant profilleri. M1: DNA ladder (pUC19 DNA/MspI Marker, Fermentas), M2: DNA ladder (Gene ruler 100 bp DNA ladder plus, Fermentas), hatlar 1-14 suşlara ait bant profilleri.

g- PCR-RFLP

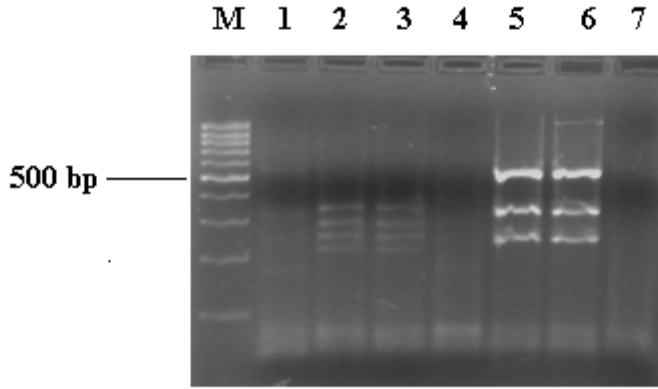
ı- *aroA* geni amplifine edildikten sonra (Resim 6) *TagI* ve *RsaI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile RFLP analizi (Resim 7 ve 8) gerçekleştirildi. Bu analizler sonrasında *RsaI* ile yapılan RPLP analizinde 6 farklı band paterni saptandı ve bu analizin özellikle işletme içinde suşların farklılıklarının konulması yararlı bulunurken *TagI* analizinin suşlarının ayırımında yeterli olmadığı ortaya kondu.



Resim 6. *aroA* spesifik bantlar. M: DNA ladder (Gene ruler 100 bp DNA ladder plus, Fermentas), hatlar 1-7 suşlara ait spesifik bantlar.

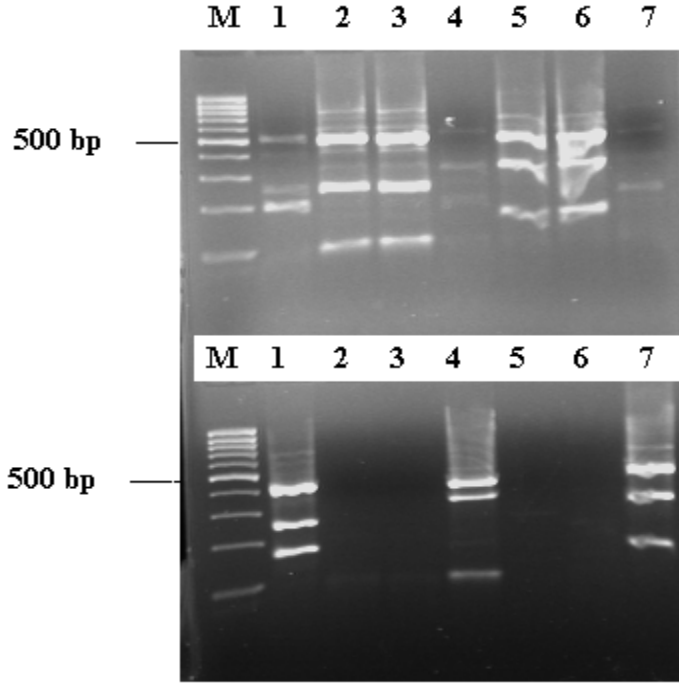


Resim 7. *RsaI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile yapılan aroA-RFLP analizi. M: DNA ladder (Gene ruler 100 bp DNA ladder plus, Fermentas), hatlar 1-14 suşlara ait bant profilleri.



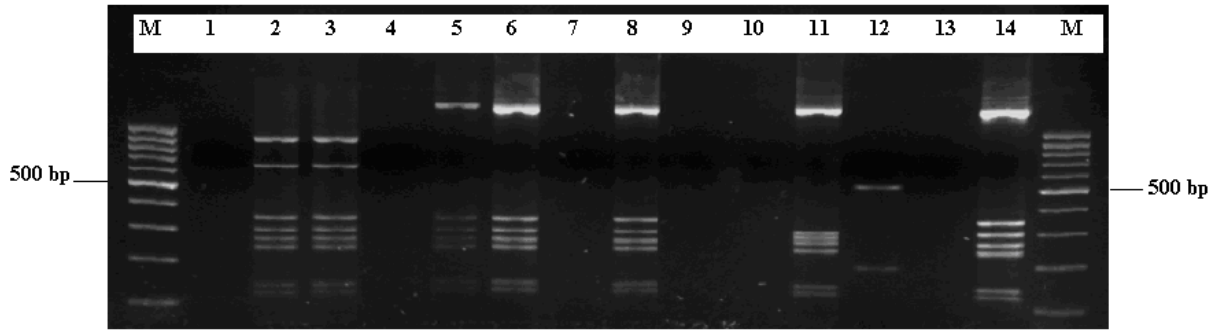
Resim 8. *TagI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile yapılan aroA-RFLP analizi. M: DNA ladder (Gene ruler 100 bp DNA ladder plus, Fermentas), hatlar 1-14 suşlara ait bant profilleri.

ii- Koagülaz gen bölgesinin amplifiye edilmesinden sonra *AluI* restriksiyon endonükleaz ile RFLP analizi gerçekleştirildi (Resim 9). Bu analiz sonrasında aynı işletmeden izole edilen suşlar en fazla 4 farklı gruba ayrılırken tüm suşlar 7 farklı gruba ayrıldı. Bu test işletme içinde suşların bu gen yapısına göre farklılaştırılması için uygun bulundu.



Resim 9. *AluI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile yapılan *coa*-RFLP analizi. M: DNA ladder (Gene ruler 100 bp DNA ladder plus, Fermentas), hatlar 1-14 suşlara ait bant profilleri.

iii. agr lokus: agr lokus spesifik primerlerle yapılan PCR işlemi sonunda agr geni pozitif örnekler *MboI* restriksiyon endonükleaz ile kesilerek RFLP analizi gerçekleştirildi (Resim 10). İncelenen suşlarda 4 farklı RFLP bant paterni ortaya kondu ve bu analiz suşların ayrılmasında önemli bulundu.

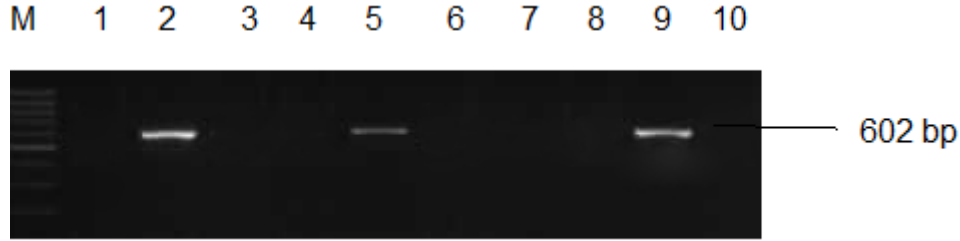


Resim 10. *MboI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile yapılan *agr*-RFLP analizi. M: DNA ladder (Gene ruler 100 bp DNA ladder plus, Fermentas), hatlar 1-14 suşlara ait bant profilleri.

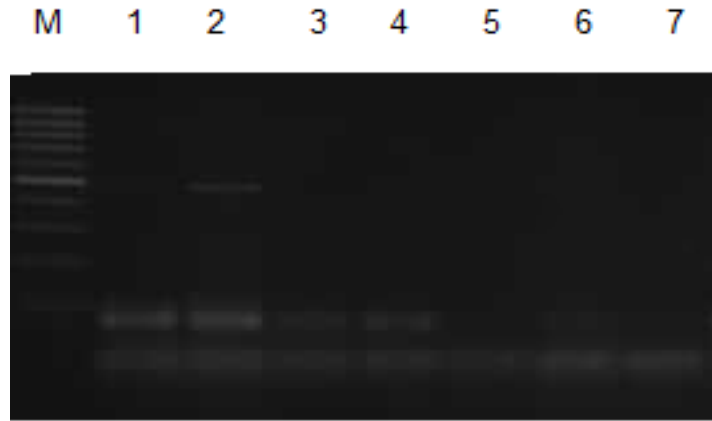
2- *E.coli* suşlarının PCR analiz bulguları

a- PCR bulguru: *E.coli* suşlarının virulens özellikleri kodlayan gen bölgeleri için PCR standardizasyonu gerçekleştirildi ve siderefor sentezi ile ilişkili gen bölgesi *iucD* 602 bp (Resim 11), sitotoksik nekrotizan faktörü kodlayan *cnf1* gen bölgesi 498 bp (Resim 12), tip 1 fimria kodlayan *fimH* gen bölgesi 508 bp (Resim 13), alfa hemoliz için *hly* gen bölgesi 1117 bp (Resim 14), fimriayı kodlayan *papE-F* gen bölgesi 336 bp (Resim 15) ve serum direncini

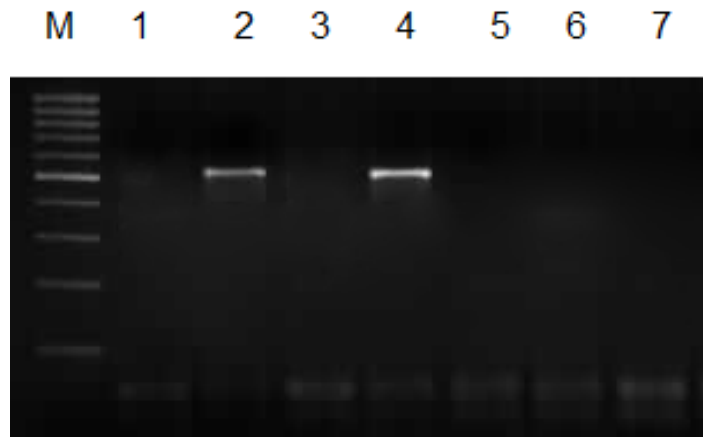
kodlayan traT gen bölgesi 307 bp (Resim 16) uzunluğunda saptandı. PCR incelemesi için farklı işletmelerden seçilen 48 suşun 1 (%2,1)'inde siderefor sentezi ile ilişkili gen bölgesi iucD, 1 (%2,1)'inde tip 1 fimria kodlayan fimH ve papE-F, 1 (%2,1)'inde alfa hemoliz için hly ve 17 (%35.1)'sinde serum direncini kodlayan traT gen bölgesi saptandı. Suşların hiçbirinde sitotoksik nekrotizan faktörü kodlayan cnf1 gen bölgesi saptanamazken sadece pozitif kontrol olarak kullanılan E.coli suşunda belirlendi.



Resim 11. iucD spesifik bantlar. M: DNA ladder (Gene ruler 100 bp DNA ladder plus, Fermentas), 2, 5 ve 9.hatlar pozitif suşlar

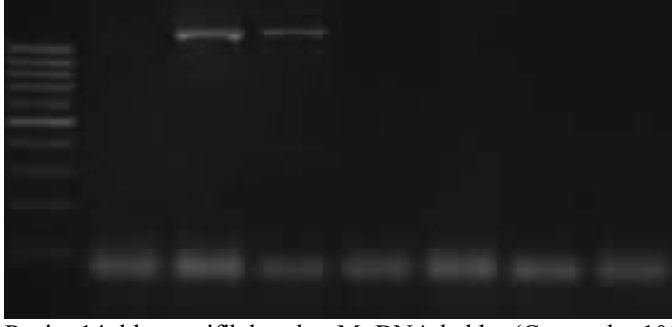


Resim 12. cnf1 spesifik bantlar. M: DNA ladder (Gene ruler 100 bp DNA ladder plus, Fermentas), 2. hat pozitif kontrol E.coli.



Resim 13. fimH spesifik bantlar. M: DNA ladder (Gene ruler 100 bp DNA ladder plus, Fermentas), 2 ve 4. hatlar pozitif suşlar

M 1 2 3 4 5 6 7



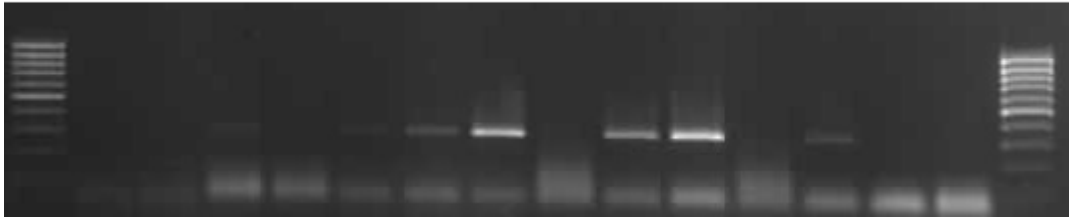
Resim 14. hly spesifik bantlar. M: DNA ladder (Gene ruler 100 bp DNA ladder plus, Fermentas), 2 ve 4. hatlar pozitif suşlar

M 1 2 3 4 5 6 7



Resim 15. papE-F spesifik bantlar. M: DNA ladder (Gene ruler 100 bp DNA ladder plus, Fermentas), 2 ve 6. hatlar pozitif suşlar

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 M

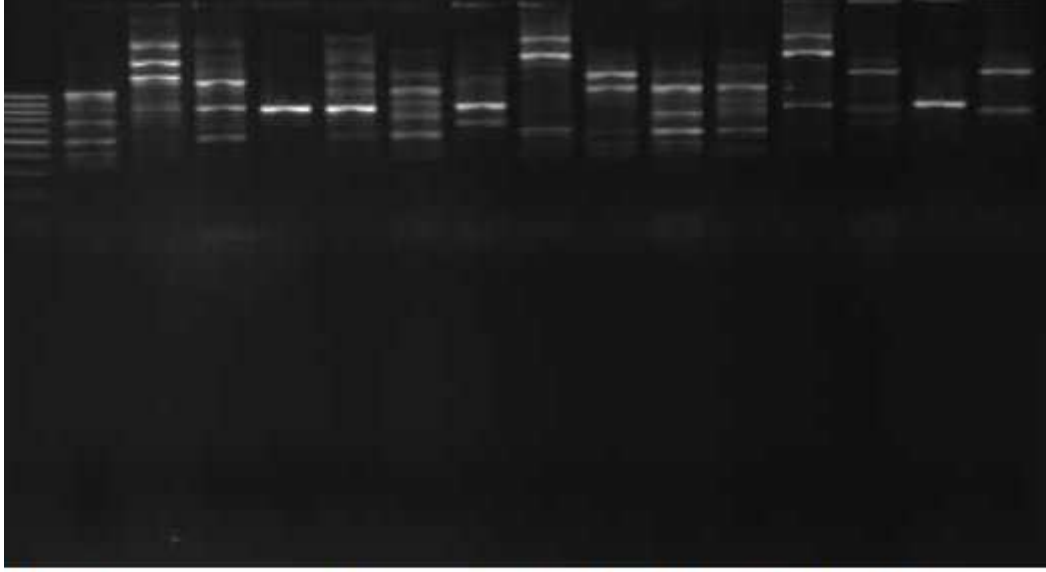


Resim 16. traT spesifik bantlar. M: DNA ladder (Gene ruler 100 bp DNA ladder plus, Fermentas), 3, 5-7, 9-10 ve 12. hatlar pozitif suşlar

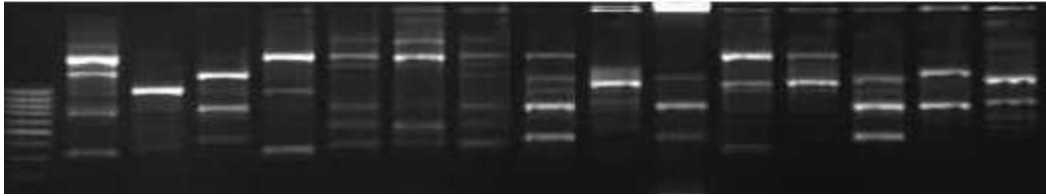
3- Streptokok suşlarının PCR analizi bulguları

a- RAPD-PCR: Proje kapsamında izole edilen Streptokok suşlarının OPE-04 primerleri ile gerçekleştirilen RAPD-PCR analizinde suşlara ait bant profillerinin oldukça farklılık gösterdiği saptandı (Resim 17). Bu test özellikle aynı işletmeden izole edilen suşların kaç farklı band paterni olduğunu belirlemeye yönelik yapılabileceğini ancak farklı işletmeler arasında yapıldığında çok farklı band paternlerinin çıkması nedeniyle fazla bir yarar sağlamayacağı ortaya kondu.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



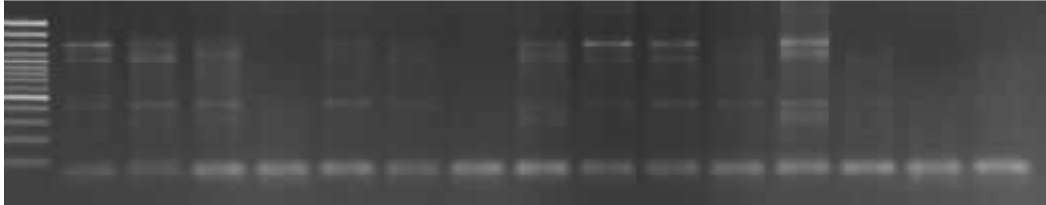
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



Resim 17. Streptokok suşlarının OPE primerleri ile gerçekleştirilen RAPD-PCR'da elde edilen bant profilleri. M: DNA ladder (pUC19 DNA/MspI Marker, Fermentas), M: DNA ladder (Gene ruler 100 bp DNA ladder plus, Fermentas), hatlar 1-15 suşlara ait bant profilleri (üst ve alt sıra).

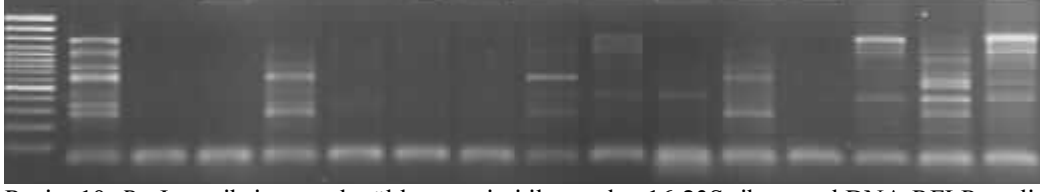
c- PCR-RFLP: Streptococcus spp. 16-23S ribozomal DNA-RFLP analizde suşların sürü içinde ayrılabilmesi nedeniyle epidemiyolojik bilgiler sağlaması açısından yararlı olduğu sonucuna varıldı (Resim 18 ve 19).

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



Resim 18. *AluI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile yapılan 16-23S ribozomal DNA-RFLP analizi. M: DNA ladder (Gene ruler 100 bp DNA ladder plus, Fermentas), hatlar 1-15 suşlara ait bant profilleri.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



Resim 19. *RsaI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile yapılan 16-23S ribozomal DNA-RFLP analizi.
M: DNA ladder (Gene ruler 100 bp DNA ladder plus, Fermentas), hatlar 1-15 suşlara ait bant profilleri.

2. SDS-PAGE

Proje kapsamında incelenen *Staphylococcus* spp, *E.coli* ve *Streptococcus* spp. tüm hücre proteinlerinin SDS-PAGE analizinde, çok sayıda protein bandlarının belirlenmesi nedeniyle farklı işletmeler arasında tam bir ayırım yapılmasının mümkün olmadığı saptandı.

V. Sonuç ve Öneriler

Bu çalışma kapsamında yapılan incelemeler sonrasında elde edilen bulguların değerlendirilmesi ile aşağıdaki sonuçlar sağlanmıştır.

1. İncelenen süt örneklerinden en yüksek oranda Staphylococcus spp. üremiştir. Bu suşlardan %70.8'i S.aureus olarak identifiye edilmiştir. Bu sonuç stafilkokların mastitis etiolojisinde en önemli mikroorganizma olduğunu ortaya koyması bakımından önemlidir. Bu mikororganizmayı E.coli ve Streptococcus spp. takip etmiştir.
2. İzolasyon sonrasında cins ve tür düzeyinde identifikasyonun zaman aldığı bir gerçektir. Bu çalışmada identifikasyon aşamasında moleküler teknikler kullanılmış ve oldukça başarılı sonuçlar alınmıştır. Bu proje bulguları değerlendirildiğinde, moleküler tekniklerin Stafilkokların cins ve tür (S.aureus) düzeyinde kısa sürede identifikasyonda kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Diğer mikroorganizmalar için bu amaca yönelik bir çalışma yapılmamıştır.
3. İzole edilen suşların farklı antibiyotiklere duyarlılıklara bakıldığında, birçok antibiyotiğe karşı suşların belirli oranlarda direnç gösterdiği ve bu durumun mastitis tedavisinde seçenekleri değerlendirilmede göz önünde tutulması gerektiği ortaya çıkmıştır. Hayvansal kaynaklı mikrororganizmalarda antibiyotik direncinin izlenmesi önem taşımaktadır. Stafilkoklarda metisilin dirençliği suşların oranı %10.1 olarak belirlenmiştir. Bu sonuç, sütlerdeki metisilin dirençliliğinin relatif olarak düşük düzeyde olmasını göstermesine karşın, özellikle insan sağlığı açısından metisilin dirençli stafilkok infeksiyonlarının potansiyel riski düşünüldüğünde değerlendirilmesi gereken bir diğer durumdur.
4. Stafilkok suşlarında metisilin dirençliliği moleküler tekniklerle saptanabileceği ortaya konulmuş ve bu teknikler ile belirlenen sonuçlar ile konvansiyel tekniklerin sonuçları uyumlu bulunmuştur.
5. Mastitisin oluşmasında önemli olan virulens özelliklerinin belirlenmesinde, konvansiyonel tekniklerin yarar sağladığı bilinmektedir. Bu işlemlerin moleküler tekniklerle de ortaya konulabileceği belirlenmiştir. Ayrıca bu özellikler kullanılarak izole edilen suşlar moleküler tekniklerle gruplandırılabilceği de belirlenmiştir.
6. Moleküler tiplendirme amaçlı yapılan çalışmalarda RAPD-PCR ve farklı gen bölgeleri ile PCR-RFLP yöntemleri kullanılmıştır. Bu tekniklerden özellikle PCR-RFLP tekniği daha standart sonuç vermesi bakımından daha üstün bulunmuştur.
7. Suşların tüm hücre proteinlerine göre SDS-PAGE yönteminin suşları gruplamada yeterince bilgi sağlamadığı ve ancak suşların protein profillerinin immunblot tekniklerinin kullanılması ile antijenik özelliklerinin değerlendirilmesinin daha yararlı sonuçlar sağlanabileceği ortaya kondu.
8. Sonuç olarak, bu çalışma ile moleküler yöntemlerin stafilkokların identifikasyonunda, stafilkok, E.coli ve streptokok suşlarının virulens özelliklerinin belirlenmesinde ve genotiplendirilmesinde kullanılabileceği ortaya kondu.

VI. Kaynaklar

1. Annemuller C, Lammler C, Zschock M. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 1999, 69:217-24.
2. Arda M, Minbay A, Leloğlu N, Aydın N, Kahraman M, Akay Ö, Ilgaz A, İzgür M, Diker KS. Özel Mikrobiyoloji. 5. Baskı, Medisan Yayınevi Ankara. 1999, s: 45-50.
3. Arda M. Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayınları, 2000.
4. Choi SM, Kim S, Kim C. Multiplex PCR for the detection of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes and methicillin resistance among *Staphylococcus* species. *J Korean Med Sci.* 2003, 18: 631-636.
5. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barret FF, Melton DM, Beachey EH. Coagulase negative *Staphylococci* to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of *Staphylococci* to medical devices. *J Clin Microbiol.* 1985, 22:996-1006.
6. Fitzgerald JR, Meaney WJ, Hartigan PJ, Smyth CJ, Kapur V. Fine-structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *Epidemiol Infect.* 1997, 119:261-9.
7. Forman P, Tilsia-Timisjarvi A, Altosava T. Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S spacer regions. *Microbiology.* 1997, 143:3491-3500.
8. Gillespie BE, Jayarao BM, Oliver SP. Identification of *Streptococcus* species by randomly amplified polymorphic deoxyribonucleic acid fingerprinting. *J Dairy Sci.* 1997, 80:471-476
9. Hayakawa Y, Hashimoto N, Imaizumi K, Kaidoh T, Takeuchi S. Genetic analysis of exfoliative toxin A-producing *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cow's milk. *Vet Microbiol.* 2001, 78:39-48.
10. Johnson JR, Stell AL, Scheutz F, O'bryan TT, Russo TA, Carlino UB, Fasching C, Kavle J, Dijk LV, Gaastra W. Analysis of the F antigen-specific *papA* alleles of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* using a novel multiplex PCR-based assay. *Infect Immun.* 2000, 68:1587-1599.
11. Kaipainen T, Pohjanvirta T, Shpigel NY, Shwimmer A, Pyörala S, Pelkonen S. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from bovine clinical mastitis. *Vet Microbiol.* 2002, 85: 37-46.
12. Korhonen TK, Finne J. Agglutination assays for detecting bacterial binding specificities. In *Enterobacterial Surface Antigens: Methods for Molecular Characterization*, 1985, pp. 301-313.
13. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature.* 1970; 227:680-5
14. Marcos JY, Soriano AC, Salazar MS, Moral CH, Ramos SS, Smeltzer MS, Carrasco GN. Rapid identification and typing of *Staphylococcus aureus* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *aroA* gene. *J Clin Microbiol.* 1999, 37:570-4.
15. Mason WJ, Blevins JS, Beenken K, Wibowo N, Ojha N, Smeltzer MS. Multiplex PCR protocol for the diagnosis of staphylococcal infection. *J Clin Microbiol.* 2001, 39:3332-8.
16. McDonald WL, Fry MA. Identification of *Streptococcus* spp. causing bovine mastitis by PCR-RFLP of 16S-23S ribosomal DNA. *Deighton Vet Microbiol.* 2005, 111:241-246.

17. Nourizadeh E, Sultan N. Stafilokoklarda slime faktör yapımının çeşitli yöntemlerle gösterilmesi. *İnfecs. Derg.* 1993. 7:31-36.
18. Novick RO, Projan SJ, Kornblum J, Ross HF, Ji G, Kreiswirth B, Vandnesch F, Moghazeh S. The agr P2 operon: an autpcatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen.* 1995, 248: 446-458
19. Nunes ELC, Santos KRN, Mondina PJJ, Bastos MCF, Marval MC. Detection of ileS-2 gene encoding mupirocin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by multiplex PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1999, 34:77-81.
20. Ossmer R. Simultaneous detection of total coliforms and *E.coli*- Fluorocult LMX-Broth. 15th. International Symposium/Food Microbiology. 1993, The International Committee on Food Microbiology and Hygiene, Bingen/Rhine.
21. Quinn P, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJC, Leonard FC. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease.* Blackwell Pub, 2002.
22. Rupp ME, Archer GL. Hemagglutination and adherence to plastic by *Staphylococcus epidermitis*. *Infect Immun.* 1992, 60:4322-4327.
23. Sanchez-Carlo V, McDonald JS, Packer RA. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from cows with acute mastitis. *Am J Vet Res.* 1984, 45: 1775-1777.
24. Schwarzkopf A, Karch H, Schmidt H, Lenz W, Heesemann J. Phenotypical and genotypical characterization of epidemic clumping factor-negative, oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 1993, 31:2281-2285.
25. Siitonen, A. *E.coli* in fecal flora of healthy adults: serotypes, P and Tip1C fimbria, Non-D Mannoze resistant adhesins and hemolytic activity. *J Infect Dis.* 1992, 166: 1058-1065.
26. Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, Witte W. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2003, 41: 4089-4094.
27. van Belkum A, Eriksen NHR, Sijmons M, vanLeeuwen W, van der Bergh M, Kluytmans J, Espersen F, Verbrugh H. Coagulase and protein A polymorphism do not contribute to persistence of nasal colonisation by *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol.* 1997:222-232.
28. Wibawan IWT, Lammler C, Seleim RS, Pasaribu FH. A haemagglutinating adhesin of group B streptococci isolated from cases of bovine mastitis mediates adherence to HeLa cells. *J Gen Microbiol.* 1993, 139: 2173-2178.
29. Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenber PC, Woods G. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology.* 2006. Lippincott Williams and Wilkins.
30. Wray C, Callow RJ, Sojka WJ. An examination of *E. coli* strains isolated from cases of bovine mastitis for possible virulence determinants. *Vet Microbiol.* 1993, 8:141-145.
31. Yamamoto S, Terai A, Yuri K, Kurazono H, Takeda Y, Yoshida O. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1995, 12: 85-90.

VII. Ekler

a) Mali Bilanço ve Açıklamaları

Proje bütçesi 73.400 YTL'dir. Proje kapsamında alınması öngörülen tüm sarf malzemeler için 56.640 YTL harcama yapılarak proje tamamlanmıştır.

b) Makine ve Teçhizatın Konumu ve İlerideki Kullanımına Dair Açıklamalar (BAP Demirbaş numaraları dahil)

Projede makine ve teçhizat bütçesi olmadığından her hangi bir alım işlemi yapılmamıştır.

c) Teknik ve Bilimsel Ayrıntılar (varsa Kesim III'de yer almayan analiz ayrıntıları)

d) Sunumlar (bildiriler ve teknik raporlar)

e) Yayınlar (hakemli bilimsel dergiler) ve tezler

Hazırlanmaktadır.