

## MASTITİSLİ İNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *S. AUREUS* VE *S. INTERMEDIUS* SUŞLARININ RAPD-PCR İLE AKRABALIK DERECELERİNİN BELİRLENMESİ

Emine Arslan<sup>1</sup>@

Leyla Açık<sup>2</sup>

U. Sait Uçan<sup>3</sup>

### Determination by RAPD-PCR of Relationship Degrees of *S. aureus* and *S. intermedius* Strains Isolated from Bovine Mastitis

**Özet:** Bu çalışmanın amacı, mastitisli ineklerden izole edilen 23 *S. aureus* ve 7 *S. intermedius* suşlarının RAPD-PCR (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemi ile akrabalık derecelerinin belirlenmesidir. RAPD-PCR sonuçları ile elde edilen dendrogram, 10 rastgele primer ile analiz edildiğinde bütün izolatlar % 30'tan daha az genetik benzerlikte 4 ana küme oluşturduğunu göstermiştir. En yüksek akrabalık derecesi %91.30 iken en düşük akrabalık derecesi %0.44 olarak bulunmuştur. Bu çalışma, rastgele primerler ile yapılmış olan RAPD-PCR'in mastitisli ineklerden izole edilmiş *S. aureus* ve *S. intermedius* suşlarının genetik akrabalığını belirlemek için başarılı bir şekilde uygulanabileceğini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** RAPD-PCR, Stafilokok, mastitis, inek

**Abstract:** The aim of this study was to determine of relationship degree with RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction) method of 23 of *S.aureus* and 7 of *S.intermedius* strains isolated from bovine mastitis. Dendrogram obtained by RAPD results showed that all the isolates clustered in to four-main groups at a genetic similarity of less than 30% when analyzed with 10 random primers. While the highest relationship degree was 91.30%, the lowest relationship degree was found as 0.44%. This study shows that RAPD-PCR assayed with random primers can be successfully applied to assess the genetic relationship of *S. aureus* and *S. intermedius* strains isolated from bovine mastitis.

**Key Words:** RAPD-PCR, Staphylococ, mastitis, bovine

### Giriş

*S. aureus*, dünya çapında çeşitli ekonomik kayıplara sebep olan kronik inek mastitisinin önemli bir patojenidir (Miles ve ark., 1992). *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 (Tenover ve ark., 1994; Matthews ve ark., 1992). Son günlerde moleküler epidemiolojinin 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 and Marsalek, 1971; Kapur

ve ark., 1995; Musser ve Kapur, 1992). Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA polimeraz zincir reaksiyonu (RAPD-PCR) *S. aureus* izolatlarının ayrılmasında uygulanmıştır (Tenover ve ark., 1994; Saulnier ve ark., 1993; van Belkum ve ark., 1995). Hızlı ve ayırıcı bir yöntem olan RAPD-PCR, *S. aureus* suşlarını içeren pekçok bakterial türlerinin genetik parmakizini çıkarmak için başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Maslow ve ark., 1993; Matthews ve ark., 1994; van Belkum ve ark., 1995).

Türkiye'de de *S. aureus* suşlarının izolasyonu, tanımlanması ve karakterizasyonu konusunda birçok çalışmalar yürütülmektedir (Gündüz ve Ok, 2000; Hadimli ve ark., 2001; Rişvanlı ve Kalkan, 2002; Berber ve ark., 2003). *S. aureus* suşlarının tanımlanması ve karakterizasyonu endüstriyel ve bilimsel açıdan git-

tikçe daha fazla önem kazanmakta ve son yıllarda bu amaçla kullanılmaya başlanan DNA'ya dayalı moleküler yöntemler son derece güvenilir, basit ve pahalı olmayan yöntemler olarak değerlendirilmektedir. Geleneksel yöntemlerle yapılan çalışmaların yanı sıra moleküler düzeyde yapılan araştırma sonuçlarının endüstriye yansıtılma çabaları da sürmektedir (Matthews ve ark., 1994, Tenover ve ark., 1994).

Bu çalışmanın amacı mastitisli ineklerden izole edilen *S. aureus* ve *S. intermedius* suşları arasındaki genetik uzaklıkların RAPD-PCR yöntemi ile belirlenmesidir.

### Materyal ve Metot

Stafilokok suşları: Çalışmada, daha önce Konya Bölgesinden mastitisli inek sütlerinden izole ve identifiye edilen ve -20 °C'de saklanan 23 *S. aureus* suşu ve 7 *S. intermedius* suşu kullanıldı. Suşların saflık kontrolleri % 7 koyun kanlı agarda (Blood Agar Base, Oxoid) yapıldı.

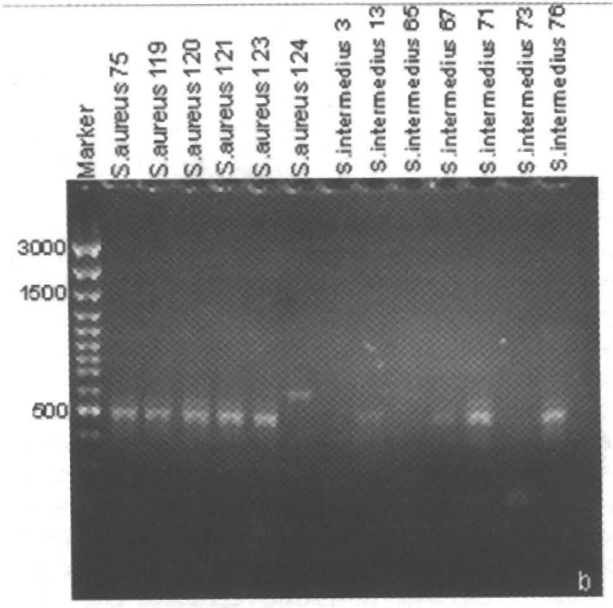
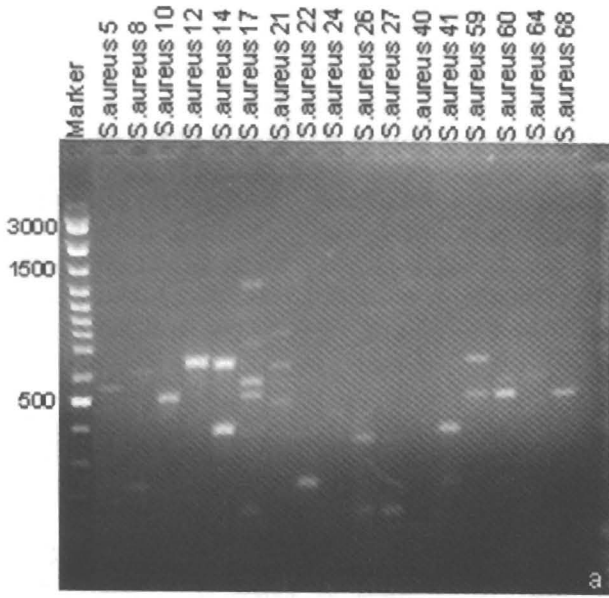
RAPD-PCR Analizi: *S. aureus* ve *S. intermedius* suşlarının toplam DNA izolasyonları Coates ve ark. (1991)'a göre yapılmıştır. Elde edilen DNA'lar rastgele primerler (OPERON teknolojiler) kullanılarak RAPD-PCR işlemlerine tabi tutulmuştur (Açık ve ark., 1997). Elde edilen PCR ürünlerinin analizleri %2'lik agaroz jel elektroforezi ile gerçekleştirilmiştir (Maniatis ve ark., 1982).

Genetik Uzaklık Analizi: Elde edilen PCR ürünlerine ait jeller üzerinde her bir suşa ait DNA bantları birbirleriyle karşılaştırılarak bantların varlığı ve yok-

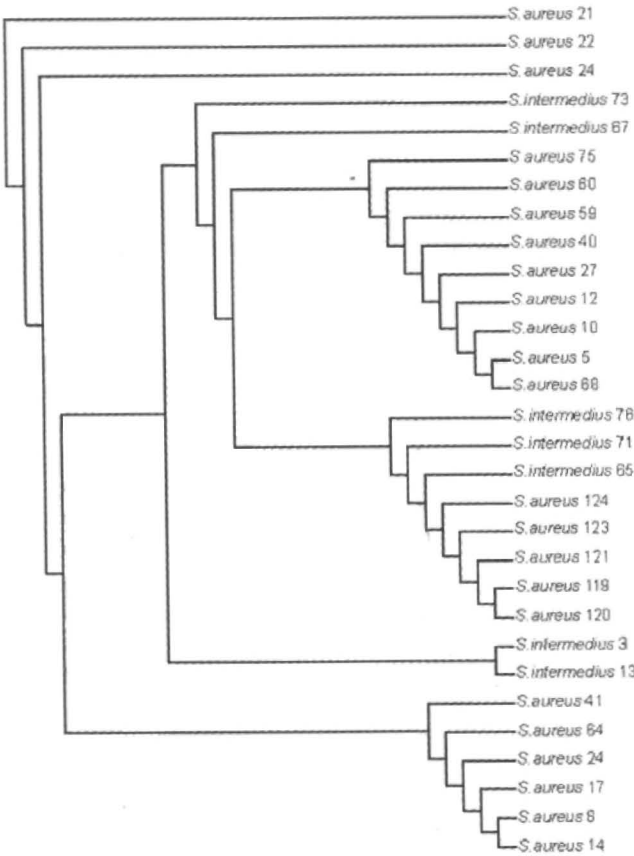
luğuna göre, sırasıyla 1 ve 0 olarak sayılmıştır. POP-GEN bilgisayar programı kullanılarak suşlar arasındaki genetik uzaklıklar hesaplanmış ve genetik uzaklık dendrogramı yapılmıştır (Nei, 1972)

### Bulgular

Bu çalışmada RAPD-PCR, mastitisli ineklerden izole edilen 23 *S. aureus* ve 7 *S. intermedius* izolatlarının genetik akrabalığını belirlemek için bir araç olarak kullanılmıştır. 30 adet primer denenmiş ve en iyi M13 primeri polimorfizm göstermiştir. M13 primeri ve diğer 9 rastgele primer (LA13, LA12, opi18, sc1023, opb08, A2, B18, B6, B7) ile yapılan RAPD-PCR sonuçlarından (Şekil 1 a,b) elde edilen dendrograma göre (Şekil 2) 4 ana küme elde edilmiştir. Kümenin biri 6 alt gruptan oluşmuştur. Bu grubun birini *S. intermedius* 3 ve *S. intermedius* 13 suşları birlikte oluştururken, *S. intermedius* 73 ve *S. intermedius* 67 ayrı ayrı başka grupları oluşturmuştur. Diğer 3 *S. intermedius* suşu (76, 71 ve 65) ise *S. aureus* suşları ile yakın akrabalık göstererek bir grup içinde yer almışlardır. Enyüksek akrabalık derecesi % 91.30 olurken *S. aureus* 5 ve *S. aureus* 68, *S. aureus* 119 ve *S. aureus* 120, *S. intermedius* 3 ve *S. intermedius* 13, *S. aureus* 8 ve *S. aureus* 14 suşları tamamen birbiri ile aynı bulunmuştur. En düşük akrabalık derecesi ise % 0.44 olarak bulunurken *S. aureus* 21, *S. aureus* 22 ve *S. aureus* 26 diğer gruplara en uzak suşlar olarak bulunmuştur. DNA bantları 200 bp ile 1500 bp arasındaki büyüklüklerde değişmiştir. Özellikle M13 primeri ve diğer 9 primerin Stafilokok suşlarının ayırımı için ideal olduğu kanısına varılmıştır.



Şekil 1a-b : Rastgele primerler ile RAPD-PCR sonuçları (DNA Ladder plus: 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp)



Şekil 2. RAPD-PCR sonuçları ile elde edilen dendrogram

## Tartışma

Epidemiyolojik çalışmalar inek mastitislerindeki *S. aureus* suşlarının farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur. Davidson (1961), Holmberg (1974) ve Kapur ve ark. 'nın (1995) yaptığı çalışmalar sonucu fazla sayıda farklı bakteriyel tipler var olmasına rağmen çoğu enfeksiyondan sınırlı sayıda tipin sorumlu olduğu belirlenmiştir. Bir takım insan ve hayvan doğal populasyonunun yapısı ve genetik çeşitlilik üzerine çalışmalar, çoğu türün doğada klonlandığını göstermektedir. *S. aureus*'un doğal populasyonları üzerine çalışmalarda önemli derecede genetik heterojenite olduğu saptanmıştır (Selander ve Musser, 1990; Whittam, 1995). Çeşitli çalışmalarda mastitisli ineklerden çok az sayıda *S. aureus* genotipleri izole edilmiştir. Bu genotipik çeşitliliğin az olmasını da şu üç muhtemel açıklamaya bağlamıştır. En muhtemel olanı *S. aureus*'un çiftlikteki hayvanlar arasında yayılması ve patojenin bulaşıcılığı yüzünden oluşu, bir diğeri mastitise sebep olma yeteneği ve sonuncusu ise suşların bütünüyle farklı olmaması günümüzde mevcut metotları kullanarak yeterli bir şekilde ayrılabilmesidir (Matthews ve ark., 1994; Lam ve ark., 1996; Lipman ve ark., 1996).

Myllys ve ark. (1997) mastitisli ineklerden izole edilen *S. aureus* suşlarını RAPD-PCR, ribotiplendirme ve biyotiplendirme ile karakterize etmişlerdir. Bu çalışma, *S. aureus* suşları farklı zamanlarda alınan aynı lobtan, enfekte lobdaki virülans suşların devamlılığını doğrulamak ve teşhis metotlarının ayırma gücünü karşılaştırmak amacıyla yapılmıştır. Bütün yöntemler kullanılarak (ticari diagnostic testleri hariç) *S. aureus*'un suşları tanımlanmıştır. Bunun sonucu olarak da *S. aureus* enfeksiyonlarının kronik doğası nedeniyle orjinal suşlar değişmeden kaldığı için suşların tamamen birbirinin aynı olduğu gözlenmiştir. Moleküler yöntemler de aynı sonuçları vermiştir. Moleküler yöntemlerle 40 suş 6 farklı genotipe ayrılmıştır. Biyotiplendirme kısmen RAPD ve ribotiplendirme ile aynı sonuçları vermiştir (Myllys ve ark., 1997). Lipman ve ark.'nın (1996) *S. aureus* mastitisinin epidemiyolojik çalışmasını yapmak için bir sürünün ineklerinin meme bezlerinden izole edilen *S. aureus* suşlarının ilişkilerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, inek meme bezinden izole edilen toplam 71 *S. aureus* suşu tanımlanmış ve subtiplendirilmiştir. *S. aureus* suşları arasında farklılığı belirlemek için kullanılan yöntemler, çeşitli primer kombinasyonları kullanılarak PCR ile çoğaltıldıktan sonra DNA polimorfizm örneği ve faj tiplendirmesi yapılmıştır. Sürü çalışmalarındaki *S. aureus* salgınına başlıca bir *S. aureus* suşunun sebep olduğunu bulmuşlardır (Lipman ve ark., 1996).

Farklı fenotipler genellikle, doğruluğu ve tutarlılığı zayıf morfolojik, kültürel ve biyokimyasal teknikleri kullanılarak izolatların teşhisinin ve akrabalığının genetik olarak daha az olan izolatları içermektedir (Kloos ve Schleifer, 1981). Onasanya ve ark. (2003)'ün yaptıkları çalışmada *S. aureus* suşlarındaki genetik çeşitliliğin tanımını farklı konak hücrelerindeki izolatların kökenine ve mutantların oluşuna dayandırmaktadır. RAPD markırları, *S. aureus* izolatları arasındaki konak orijini, mutasyon ve genetik varyasyon arasındaki muhtemel akrabalığı göstermiştir ve aynı zamanda parmakizi ve teşhis potansiyelini de göstermiştir. RAPD ile elde edilen DNA bantları tip, populasyon biyolojisi ve epidemiyoloji alanlarında pratik bir anlama sahip örneklerdir. Spesifik DNA bantları konak orijinleri, mutasyon ve virülans genleri ile ilişkili olmaktadır (Welsh ve McClelland, 1990).

Moleküler epidemiyolojik metotların faydası, bu metotların ayırma gücü ve çoğaltma yeteneklerine göre değerlendirilmesidir. RAPD-PCR'in ayırma gücü çok daha fazla primer uygulanarak geliştirilebilir. RAPD-PCR'in bir dezavantajı farklı laboratuvar ve farklı teknisyenlere göre çoğaltma yeteneği sonuçlarının değişiklik göstermesi ve reaksiyon şartlarındaki değişikliklere duyarlı oluşudur (Aarestrup ve ark., 1995; Williams ve ark., 1993).

Bu çalışmada bulunan sonuçlar diğer araştırmacıların bulduğu sonuçlarla uyum içerisindedir. Ancak çok daha fazla primerlerle çalışılarak stafilkokların ayırma daha iyi olacağı kanısındayız.

## Kaynaklar

- Aarestrup, F., Wegener, H., Rosdahl, V. (1995). Evaluation of phenotypic and genotypic methods for epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in Denmark. *Vet. Microbiol.* 45, 139-150.
- Açık, L., Samancı, B., Duman, H., Ünal, F. (1997). Polymorphism and phylogenetic relations among Turkish species in the genus *Stembergia* (*Amoryllidaceae*) as determined by RAPD-PCR, *Tr. J. of Botany.* 21, 265-268.
- Berber, I., Cokmus, C., Atalan, E. (2003). Characterization of *Staphylococcus* species by SDS-PAGE of whole-cell and extracellular proteins. *Microbiol.* 72: 1, 42-47.
- Coates, P.J., d'Ardenne, A.J., Khan, G., Kangro, H.O., Slavina G. (1991). Simplified procedures for applying the polymerase chain reaction to routinely fixed paraffin wax section, *J.Clin. Pathol.*, 44: 115-118.
- Davidson, I. (1961). The epidemiology of staphylococci mastitis. *Vet. Record.* 73: 1015-1018.
- Devriese, L.A. (1984). A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species. *J. Appl. Bacteriol.* 56, 215-220.
- Gündüz, K., Ok, Ü. (2000). Konya bölgesindeki klinik ve

subklinik mastitis vakalarından mikotik etkenlerin izolasyonu, identifikasyonu ve çeşitli antimikotiklere duyarlılıklarının tesbiti. Veterinarium, 11:1-2: 25-31.

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

Hajek, V., Marsalek, E. (1971). The differentiation of pathogenic staphylococci and a suggestion for their taxonomic classification. Zentralbl. Bakteriol. Abt. I. Orig. A 217, 176-182.

Holmberg, O. (1974). Phage typing of *Staphylococcus aureus* strains isolated in Sweden from bovine milk. Acta Vet. Scan. 16: 411-412.

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

Kloos, W.E., Schleifer, K.H. (1981). The genus *staphylococcus* in the prokaryotes: A handbook on habitat, isolation and identification of bacteria. Vols. 1 and 2.

Lam, T.J.G.M., Lipman, L.J.A., Schukken, Y.H., Gaastra, W., Brand, A. (1996). Epidemiological characteristics of bovine clinical mastitis caused by *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* studied by DNA fingerprinting. Am. J. Vet. Res., 57: 39-42.

Lipman, L.J.A., de Nijs, A., Lam, T.J.G.M., Rost, J.A., van Dijk, L., Schukken, Y.H., Gaastra, W. (1996). Genotyping by PCR of *Staphylococcus aureus* strains isolated from mammary glands of cows. Vet. Microbiol. 48: 51-55.

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

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

Matthews, K.R., Kumar, S.J., O'Conner, S.A., Harmon, R.J., Pankey, J.W., Fox, L.K., Oliver, S.P. (1994). Genomic fingerprints of *Staphylococcus aureus* of bovine origin by polymerase chain reaction- based DNA fingerprinting. Epidemiol. Infect. 112:177-186.

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.

Miles, H., Lesser, W., Sears, P. (1992). The economic implications of bioengineered mastitis control. J. Dairy Sci. 75: 596-905.

Musser, J., Kapur, V., 1992. Clonal analysis of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains from intercontinental sources: association of the mec gene with di-

vergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination. J. Clin. Microbiol. 30, 2058-2063.

Myllys, V., Ridell, J., Björkoth, J., Biese, I., Pyörala, S. (1997). Persistence in bovine mastitis of *Staphylococcus aureus* clones as assessed by random amplified polymorphic DNA analysis, ribotyping and biotyping. Vet. Microbiol. 51: 245-251.

Nei, M. (1972). Genetic distance between population. The American Naturalist, 949, 283-292.

Onasanya, A., Mignouna, H.D., Thottappilly, G. (2003). Genetic fingerprinting and phylogenetic diversity of *Staphylococcus aureus* isolates from Nigeria. African J. Biotech. 2: (8), 246-250.

Rişvanlı, A., Kalkan, C. (2002). İneklerde Stafilocokkal mastitisler üzerine çalışma., Vet. Bil. Derg., 3-4: 51-56.

Saulnier, P., Bourmeix, C., Prevost, G., Andrement, A. (1993). Random amplified polymorphic DNA assay is less discriminatory than pulsed field gel electrophoresis for typing strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 31, 982-985.

Selander, R. K., Musser, J. M. (1990). Population genetics of bacterial pathogenesis. In: Iglewski, B. H., Clark, V. L., eds. Molecular basis of bacterial pathogenesis. The bacteria, Vol.XI San Diego: Academic Press Inc, 11-36.

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.

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

Welsh, J., McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 24: 7213-7218.

Whittam T. S., (1995). Genetic population structure and pathogenetics of bacteria. In: Baumberg, S., Young, J.P.W., Wellington, E. M. H., Saunders, J. R., eds. Population genetics of bacteria. Cambridge: Cambridge University Press, 45-217.

Williams, J.G., Hanafey, M.K., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1993). Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. Methods Enzymol. 218 705-740.

Zschöck, M., Sommerhauser, J., Castaneda, H. (2000). Relatedness of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mammary gland suffering from mastitis in single herd. J. Dair. Rese. 67:429-435.