

***Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus intermedius* Suşlarının REP-PZR Metodu ile Tiplendirilmesi**

Emine ARSLAN^{*}, Kuddisi ERTUĞRUL, Ali İhsan ALBAYRAK

Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 42031, Konya.

Özet: Mastitis sütçülük işletmelerinde giderlerin artması ve süt veriminin azalması gibi sonuçlara yol açarak önemli ekonomik kayıplara sebep olan yangısal bir bozukluktur. *Staphylococcus aureus*, mastitise sebep olan etken organizmalar arasında ilk sırada yer almaktadır. Bu çalışmada Konya Bölgesi'ndeki mastitisli ineklerden izole edilen 43 *S. aureus* 6 *S. intermedius* suşunun akrabalık derecelerinin REP-PZR yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır. REP-PZR sonucunda 500-~3000 bp büyüklüklerinde ve 2-6 arasında değişen sayılarda bantlar gözlemlenmiştir. Bu REP profillerinden elde edilen dendrograma göre *S. aureus* ve *S. intermedius* suşları arasındaki en yüksek akrabalık derecesi %82 oranında olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Mastitis, *S. aureus*, *S. intermedius*, REP, PZR

Typing of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius* Strains with Repetitive Sequence-Based PCR (REP-PCR) Method

Abstract: Mastitis is an inflammatory anomaly which results in important economic losses causing consequences like increase in prices at small dairies and decrease in milk production. *Staphylococcus aureus* is the first of the most effective factors which cause mastitis disease. The aim of this study was to determine of the relationship degree by REP-PCR between 43 *S. aureus* and six *S. intermedius* strains isolated from bovines mastitis in Konya region. As a result, 2-6 bands sized 500-~3000 bp were observed. According to obtaining a dendrogram from these REP profiles, it was determined that the most high relationship degree between *S. aureus* and *S. intermedius* strains was 82% rate.

Key words: Mastitis, *S. aureus*, *S. intermedius*, REP, PCR

Giriş

Mastitis, sütçülük işletmelerinde giderleri arttırarak ve süt veriminde belirgin bir azalmaya sebep olarak önemli ekonomik kayıplara neden olan bir problemdir [1, 2, 3]. Mastitisten izole edilen etkenlerin içerisinde *S. aureus* tüm dünyada sütçülük işletmelerindeki en sık görülen ve kontrolü en zor olan enfeksiyon etkeni olarak bildirilmektedir [4]. 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 [5].

S. aureus'un sebep olduğu mastitisin kontrolü için çok çeşitli metotlara ihtiyaç duyulmaktadır [6]. Fenotipik teknikler (faj tiplendirme, serotiplendirme, biyotiplendirme, antibiyogramlar) inek orijinli *Staphylococcus*'lar için genellikle düşük tiplendirme yeteneğine

*aarslan@selcuk.edu.tr

sahiptirler [6, 7]. Son günlerde moleküler epidemiyolojinin DNA`ya dayalı metotları iyi sonuçlar vermiştir [8, 9]. Bu tip çalışmalar insan ve hayvan kaynaklı *S. aureus* suşları arasında genotipik farklılıklar olduğunu göstermiştir [10, 11, 12, 13, 14, 15].

Hızlı epidemiyolojik tiplendirme, kaynağın identifikasyonu için çok önemlidir ve enfeksiyonun yayılmasında bakterinin gelişimi için detaylı bilginin edinilmesini sağlamıştır [16]. *S. aureus* suşlarının tiplendirilmesinde kullanılan metodun; hızlı, kolay, güvenilir ve yüksek ayırım gücüne sahip olması gerekir. Yapılan çalışmalarda REP-PZR yönteminin güvenilir bir yöntem olduğu kanaatine varılmıştır [16]. REP-PZR metodu, bakteri kökenlerinin, kodlanmış tekrar dizileri ile hızlı olarak tanımlanmasında kullanılmıştır. Bu dizilerin boyutları her bakteri suşu için spesifiktir [17]. Bu tekrarlanan elementler birçok bakteri genlerinin bulunduğu ortamda farklı genlerin bulunduğu bölgeler oluşturmaktadır [18, 19, 20]. Bakteriyel izolatlar içinde klonal akrabalıkların DNA`ya dayalı epidemiyolojik değerlendirmesinde REP-PZR ile yapılan parmak izi kullanışlı bir yöntemdir. Birkaç saat içinde örneklerden izolatların karakterize edilmesini sağlar [21, 22, 23].

Bu çalışmada, diğer birçok moleküler yöntemlere göre daha spesifik olan REP-PZR metodu ile mastitis etkeni *S. aureus* ve *S. intermedius* suşlarının tiplendirilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bakteri Örnekleri

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

Bakteriden Genomik DNA izolasyonu

Bakteriden DNA izolasyonu Ausubel [24]`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) süspansiyon 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 süspansiyon edilmiştir.

REP-PZR uygulaması

REP-PZR uygulaması için 25 µl çözelti hazırlanmıştır. Her reaksiyon karışımı için, 75 pikomol RW3A primeri (5'-TCGCTCAAACAACGACACC-3') [16], 10X PZR tamponu (50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH=9, %0.1 TritonX-100), 3mM MgCl₂, 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 94°C`ta 3 dakika, 94°C`ta 1 dakika, 54°C`ta 1 dakika ve 72°C`ta 2 dakika`ya 30 döngü yapılması için programlanmıştır. Son olarak program bittiğinde 72°C`ta 5 dakikalık uzantı basamağı eklenerek ve hazırlanan tüpler thermo-cycler cihazına yerleştirilip çoğaltım yapılmıştır.

REP-PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

REP-PZR ürünleri değerlendirilmek için %2`lik agaroz jel elektroforezinde 90 voltta yürütülmüştür [25]. U.V. transilluminatörde görüntülenen fotoğraf bilgisayara aktarılmıştır. Bio 1 D ++ bilgisayar programı ile dendrogramları çıkarılmıştır.

Sonuç ve Tartışma

REP-PZR sonucu ile elde edilen fotoğrafta (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 %30-50 oranında genetik olarak uzak bulunurken, bu suşlara Standart *S. aureus* suşunun

yaklaşık %70 oranında uzak olduğu gözlenmiştir. Birinci alt gruba %86 oranında uzak olan ikinci alt grupta ise birbiri ile tamamen aynı olan *S. aureus* suşlarının (48-53, 86-87 no`lu suşlar) yanısıra en yakın benzerlik oranıyla (%80-83) 97-118 ve 109 nolu *S. aureus* suşları bu grubun üyelerini oluşturmuştur. 15 ve 77 nolu suşları birbirine %75 oranında benzerken 33 nolu diğer *S. intermedius* suşunun %74 oranında 48 ve 53 nolu *S. aureus* suşlarına yakın olduğu görülmüştür. Bununla birlikte diğer *S. aureus* suşları %50 ve %65 arasında değişen genetik uzaklıklarda yer almıştır.

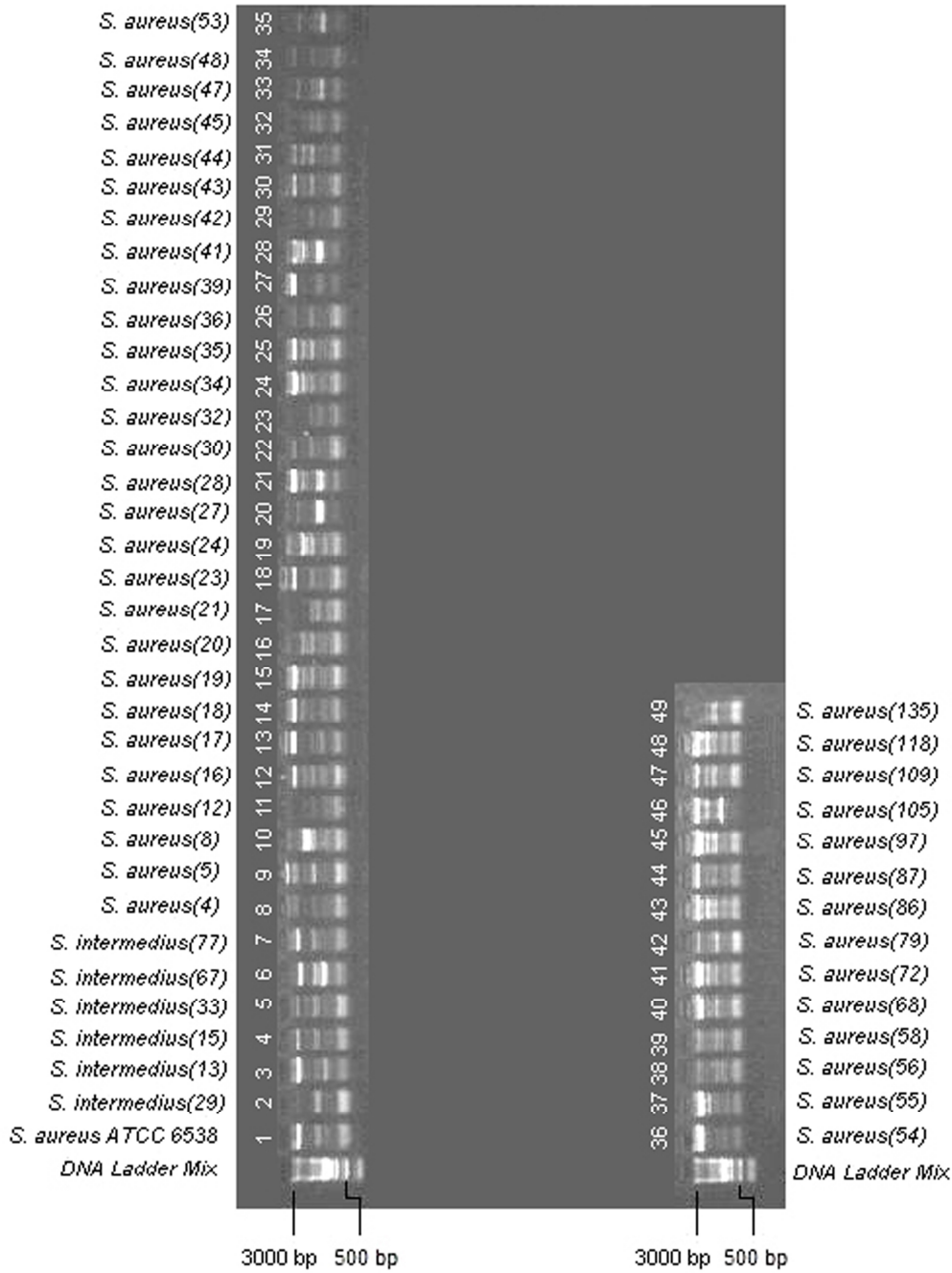
İkinci ana grup kendi içinde 2 alt gruba ayrılmış ve bu grup üyelerini *S. aureus* suşları oluşturmuştur. Birinci alt grupta %86 oranında uzak iki küçük küme meydana gelirken, iki küçük kümenin *S. aureus* suşları %82`den %40`a kadar değişen genetik benzerlikler göstermiştir. İkinci alt grubu oluşturan *S. aureus* suşlarından bazıları genetik açıdan birbirinin aynısı bulunurken (21-45, 68-72 ve 56-58 no`lu suşlar) diğer *S. aureus* suşları yaklaşık %80 ile %38 oranında değişen genetik açıdan birbirlerine oldukça benzer olduğu tespit edilmiştir.

Genel olarak bakıldığında *S. aureus* ve *S. intermedius* suşları %9-82 oranında birbirlerine yakındır. REP primerleri ile yapılan PZR 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. 500 bp`lık bant 46 nolu örnek dışında bütün *S. aureus* ve *S. intermedius* suşlarında ortakken, 3000 bp`lık bant hem *S. aureus* suşlarında hemde *S. intermedius* suşlarında çoğunlukla bulunmaktadır.

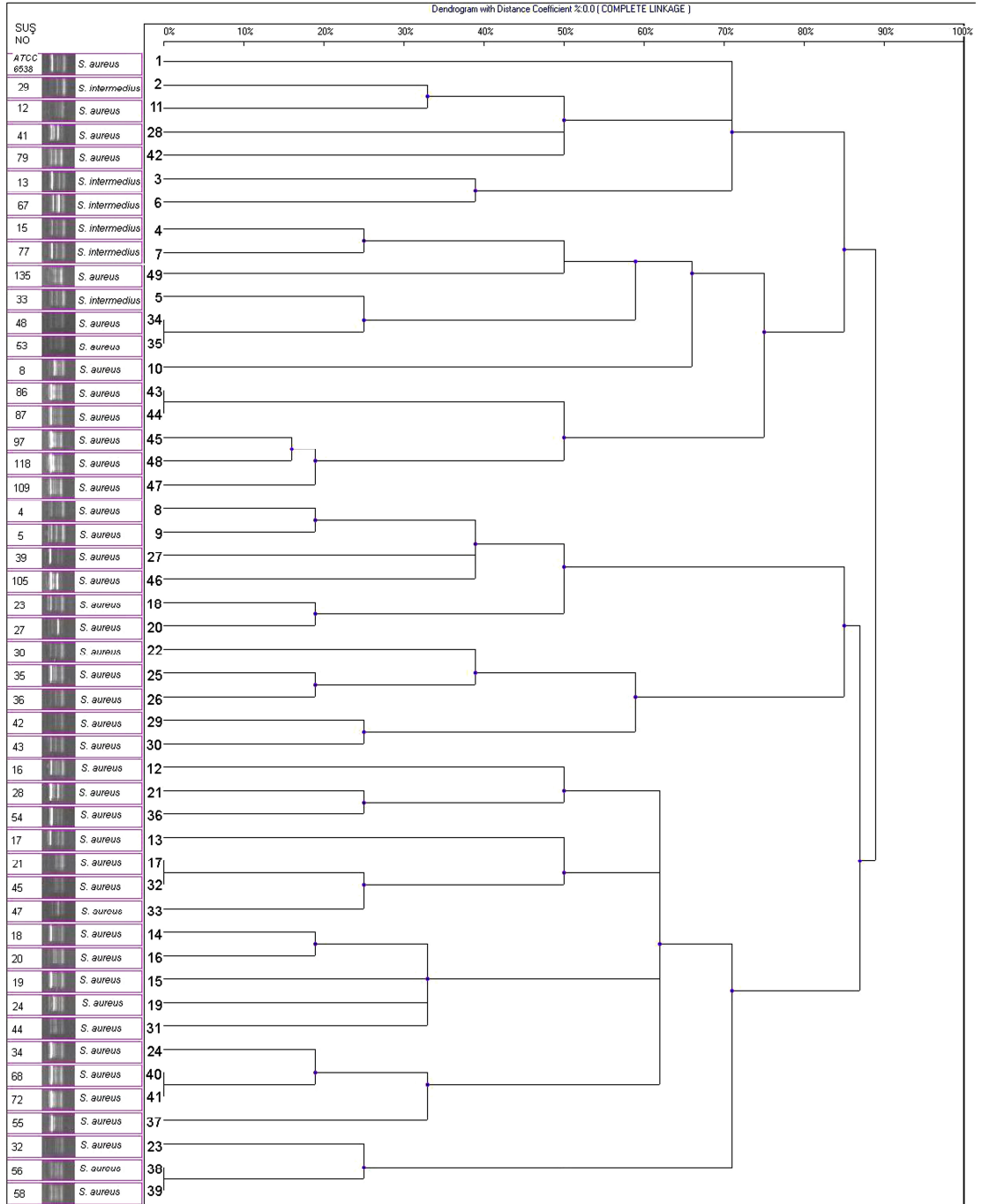
Son günlerde moleküler epidemiyolojinin DNA`ya dayalı metodları iyi sonuçlar vermiştir [8, 9]. Bu sonuçlar, insan ve hayvan kaynaklı *S. aureus* suşları arasında farklılık olduğunu göstermiştir [10, 11, 12, 13]. İnsan kaynaklı *S. aureus* ve *S. intermedius* suşları REP-PZR ile tiplendirilerek 5-15 arasında değişen sayıda bantlar elde edilmiş ve bu bantların büyüklükleri yaklaşık 300-5000 bp arasında değiştiği gözlenmiştir [26]. Del Vecchio ve ark. [16] yine insan kaynaklı *S. aureus* suşlarının REP-PZR 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. [27] mastitisli ineklerden izole ettikleri *S. aureus* suşlarının 200-1700bp büyüklükleri arasında REP-PZR 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. [28] ineklerden izole ettikleri mastitis etkeni *S. aureus* ve *S. intermedius* suşlarını RAPD-PZR metodu kullanarak en yüksek akrabalık derecesini %91.30 olarak bildirirken, Reinoso ve ark. [27] elde ettikleri REP-PZR 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. [29] PFGE (Pulsed Field Gel Elektroferez) sonuçlarına göre ise 59 *S. aureus* izolatının %86 benzerlikte olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada da tüm *Staphylococcus* 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 [6].

Metisiline dirençli *S. aureus* suşları için REP-PZR 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-PZR profilleri gözlenmektedir. Bu primerin kullanımıyla agaroz jel elektrofrezinde son derece ayırt edici PZR ürünleri meydana gelmektedir. Zahmetsiz ve ucuz donanıyla yürütülebilen bu teknik kolayca salgın kaynağını belirleyebilir, rutin faaliyetleri izlemede kullanılabilir ve enfeksiyon kontrol potansiyelini artırabilir. REP-PZR ile çıkarılan DNA parmakizi, bulaşıcı ve virulent bakteri suşlarının hızlı bir şekilde tanımlanması için bir araç olarak teklif edilebilir [16].



Şekil 1. REP-PZR Profilleri.



Şekil 2. Bio 1D++ Programı sonucu elde edilen dendrogram.

Staphylococcus suşlarının analizinde REP-PZR tiplendirme metodunun, AP-PZR (Arbitrarily primed-Polimeraz zincir reaksiyonu) ve PFGE kadar ayırt edici olduğu bildirilmiştir.

AP-PZR ile kıyaslandığında REP-PZR, ilaveten bir kromozomal DNA saflaştırma basamağı gerektirdiği için AP-PZR'in performansı REP-PZR'in performansından biraz hızlıdır. Ancak, epidemiyolojik amaçlar için kullanıldığı zaman son derece önemli olan REP-PZR'in tekrarlanabilirliği AP-PZR'a göre mükemmel bulunmuştur. PFGE ile karşılaştırılacak olursa, REP-PZR'in en önemli avantajı kolay ve hızlı performansa sahip olmasıdır. Ancak PFGE ile aynı tekrarlanabilirliği vardır [7, 9]. Diğer bir PZR'a dayalı tiplendirme metodu, tekrarlanabilirlik ve performansın kolay olması bakımından en iyi REP-PZR ile kıyaslanan Deplano ve ark. [30] tarafından tanımlanan Inter-IS256 PZR metodudur. Inter-IS256 PZR ile analiz edilmiş 36 *Staphylococcus* suşu arasında 3 farklı tip teşhis edilirken, aynı suşların REP-PZR tiplendirmesi ile 5 farklı tip tanımlanmıştır. REP-PZR tiplendirme aynı zamanda, her ikisinde orta derecede ayırt edebilme yeteneği olan Tn916-16S rRNA gen bölgesi ve inter-16S-23S rRNA gen bölgesinin çoğaltımları gibi diğer tekrarlanan dizilere dayalı PZR metotları ile benzetilmektedir [31, 32, 33].

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-PZR metoduna ilaveten ERIC-PZR ve BOX-PZR metotlarının da uygulanması, *Staphylococcus* izolatlarının sınıflandırılmasında, tanımlanmasında ve tiplendirilmesinde daha güvenilir sonuçlar sağlayacağı kanısındayız.

Kaynaklar

- [1] Waterman, D.F., Harmon, R.J., Hemken, R.W., Langlois, B.E. **Milking Frequency as Related to Udder Health and Milk Production.** J Dairy Sci. 66(2):253–258 (1983).
- [2] Rajala-Schultz, P.J., Gröhn, Y.T., McCulloch, C.E., Guard, C.L. **Effect of Clinical Mastitis on Milk Yield in Dairy Cows.** J. Dairy Sci. 82: 1213–1220 (1999).
- [3] Shim, E.H., Shanks, R.D., Morin, D.E. **Milk Loss and Treatment Costs Associated with Two Treatment Protocols for Clinical Mastitis in Dairy Cows.** J Dairy Sci. 87(8):2702–2708 (2004).
- [4] Alaçam, E., Tekeli, T., Sezen, Y., Erganiş, O. **Sütçü İneklerin Subklinik Mastitislerinde Cefoperazone'un Etkisi Üzerinde Çalışma.** S.Ü. Vet. Fak. Derg. 1(2):65–74 (1986).
- [5] Bademkiran, S., Yeşilmen, S., Gürbulak, K. **Sütçü İneklerde Günlük Sağım Sayısının Klinik Mastitis ve Süt Verimi Üzerine Etkisi.** Y.Y.Ü. Vet Fak. Derg. 16 (2):17-21 (2005)
- [6] Matthews, K.R., Jayarao, B.M., Oliver, S.P. **Plasmid pattern analysis of *Staphylococcus* species isolated from bovine mammary secretions.** J. Dairy Sci. 75(12):3318-23 (1992)
- [7] 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. **Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*.** J. Clin. Microbiol. 32:407-415 (1994).
- [8] Maslow, J.N., Mulligan, M.E., Arbeit, R.D. **Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms.** Clin. Infect Dis. 17: 153-164 (1993).
- [9] van Belkum, A., Kluytman, van Leeuwen, W., Bax, R., Quint, W., Peters, E., Fluit, A., Vandenbroucke-Grauls, C., van den Brule, A., Koelman, H. **Multicenter evaluation of arbitrarily primed PCR for typing of *Staphylococcus aureus* strains.** J. Clin. Microbiol. 33:1537-1547 (1995).
- [10] Hajek, V., Marsalek, E. **The differentiation of pathogenic staphylococci and a suggestion for their taxonomic classification.** Zentrbl. Bakteriol. Abt. I. Orig. A217-176-182 (1971).
- [11] Devriese, L.A. **A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species.** J. Appl. Bacteriol. 56:215-220 (1984).
- [12] Musser, J., Kapur, V., **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 (1992).

- [13] Kapur, V, Sischo, W., Greer, R., Whittam, T, Musser, J. **Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows.** J. Clin. Microbiol. 33, 376-380 (1995).
- [14] Zadoks, R., van Leeuwen, W., Barkema, H., Sampimon, O., Verbrugh, H., Schukken, Y., van Belkum, A. **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 (2000).
- [15] Reinoso, E., Bettera, S., Frigerio, C., Di Renzo, M., Calzolari, A., Bogni, C. **RAPD-PCR analysis of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine and human hosts.** Microbiol. Res. 159, 245-255 (2004).
- [16] Del Vecchio, V.G., Petroziello, J.M., Gress, M.J., McClesky, F.K., Melcher, G.P., Crouch, H.K. and Lupski, J.R. **Molecular genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via fluorophore enhanced repetitive sequence VCR.** J. Clin. Microbiol. 33, 2141-2144 (1995).
- [17] Versalovic, J., Koeuth, T. and Lupski, J.R. **Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes.** Nucleic Acids Res. 19, 6823-6831 (1991).
- [18] Stern, M.J., Ames, G.F.L., Smith, N. H., Robinson, E. C. and Higgins, C. F. **Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome.** Cell 37:1015-1026 (1984).
- [19] Hulton, C.S.J., Pliggins, C.F., Sharp, P.M. **ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and other enterobacteria.** Mol. Microbiol. 5, 825-34 (1991).
- [20] 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. **A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*.** Nucleic Acids Res. 20, 3479-83 (1992).
- [21] Georghiou, P., Wright, C., Versalovic, J., Koeuth, T., Watson, D., Hamill, R. and Lupski, J. **Program Abstr. 32nd Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. 1415 (1992).**
- [22] Woods, C.R, Versalovic, J., Koeuth, T. and Lupski, J.R. **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 (1992).
- [23] Versalovic, J., Kapur, V., Mason, E.O., Shah, U., Koeuth, T., Lupski, J.R. and Musser, J.M. **Penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae* strains recovered in Houston, Texas: identification and molecular characterization of multiple clones.** J. Infect. Dis. 167:850-856 (1993).
- [24] Ausubel, F.M., Kingston, R.E., Brent, R., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. **Current protocols in molecular biology.** Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, New York (1991).
- [25] Maniatis, R., Fritsh, E.F., Sambrook, J. **In Molecular Cloning: A laboratory Manual,** Cold Spring Harbos, New York (1982).
- [26] van der Zee, A., Verbakel, H., van Zon, J.C., Frenay, I., van Belkum, A., Peeters, M., Butting, A., Bergmans, A. **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 (1999).
- [27] Reinoso, E.B., El-Sayed, A., Lämmler, C., Bogni, C., Zschöck, M. **Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina.** Microbiol. Res. Vol 163:3, 314-322 (2008).
- [28] Arslan, E., Açık, L., Uçan, U.S. **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 (2005).

- [29] Peles, F., Wagner, M., Varga, L., Hein, I., Rieck, P., Gutser, K., Keresztúri, P., Kardos, G., Turcsányi, I., Béri, B., Szabó, A. **Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary.** Int. J. Food Microbiol. Vol 118:2, 186-193 (2007).
- [30] Deplano, A., Vaneechoutte, M., Verschraegen, G. and Struelens, M.J. **Typing of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Strains by PCR Analysis of inter-IS256 spacer length polymorphism.** J. Clin. Microbiol. 35:2580-2587 (1997).
- [31] Cuny, C, and Witte, W. **Typing of *Staphylococcus aureus* by PCR for DNA sequences flanked by transposon TnP/6 target region and ribosomal binding site.** J. Clin. Microbiol. 34:1502-1505 (1996).
- [32] Gürtler, V. and Barrie, H.D. **Typing of *Staphylococcus aureus* strains by PCR-amplification of variable-length 16S-23S rDNA spacer regions: characterization of spacer sequences.** Microbiol. 141:1255-1265 (1995).
- [33] Kumari, D.N.P., Peer, V., Hawkey, P.M., Parnell, P., Joseph, N., Richardson, J.F. and Cookson, B. **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 (1997).