T. C.

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ

KOORDİNASYON BİRİMİ

MASTİTİSLİ İNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *Staphylococcus aureus* İZOLATLARININ VİRÜLENS FAKTÖRLERİ VE ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN MOLEKÜLER ANALİZİ

Proje No: TSD-08-316

EUBAP

SONUÇ RAPORU

Proje Yöneticisi: Prof. Dr. Hüseyin KILIÇ

Tıp Fakültesi/ Mikrobiyoloji ABD.

Araştırmacılar: Tuba İÇA

ONAY

Bu projenin kabulü Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunun …… tarih ve …….. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

..... /…… / …….

EÜBAP Komisyonu Başkanı

Mühür ve İmza

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu projenin yürütülmesinde yardımcı olan Veteriner Hekim Okan Doğan ve Yard. Doç. Dr. Tuba İça'ya, projenin başlangıcından bitimine kadar ellerinden gelen yardımı gösteren Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi çalışanlarına, Bu projeye maddi destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Komisyon Başkanlığı'na teşekkür ederim.

MASTİTİSLİ İNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *Staphylococcus aureus* İZOLATLARININ VİRÜLENS FAKTÖRLERİ VE ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN MOLEKÜLER ANALİZİ

Bu çalışmada subklinik mastitisli süt ineklerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* izolatlarının bazı virülans faktörleri ile metisilin direnç genleri yönünden karekterizasyonunun yapılması amaçlandı.

İncelenecek süt numunelerinin belirlenmesi amacıyla California Mastitis Testi (CMT) yapıldı. Test sonucuna göre Trace(n=132), +1(n=408), +2(n=330), +3(n=30) olan toplam 900 süt numunesi bakteriyel etkenler yönünden incelendi. 240(%26.6) süt numunesinden toplam 252 etken izolasyonu yapıldı. Bazı süt örneklerinden birden fazla etken izolasyonu yapıldı. İzole edilen etkenlerin %51'i *Staphylococcus aureus*, %23'ü Koagulaz Negatif Stafilokok(KNS), %13'ü *Esherichia coli*, %8'i *Streptecoccus agalactia*, %4'ü *Steptecoccus spp.*, %0,5'i *Klebsiella spp.*, %0,5'i *Alcaligenes spp.* olarak identifiye edildi.

İzole edilen 128 *Staphylococcus aureus* izolatında *mecA, femA, eta ve etb* genlerinin varlığı multipleks polimeraz zincir reaksiyonu m(PZR) ile incelendi. İzolatların 9(%7)'unda *mecA* geni saptandı. İzolatların tamamı *femA* geni yönünüden pozitif bulundu. İzolatların hiçbirinde *eta* ve *etb* genleri tespit edilemedi.

Sonuç olarak; (1) Subklinik mastitis etiyolojisinde rol oynayan en önemli etkenin *S.aureus* olduğu, (2) CMT testinin duyarlılığının diğer çalışmalardaki verilere göre daha düşük olduğu, (3) Sığır mastitislerinden izole edilen *S.aureus*'lar arasında metisilin dirençli suşların sayısının giderek arttığı, (4) *femA* geninin *S.aureus* için internal pozitif kontrol olarak kullanılabileceği, (5) eksfoliatif toksinin mastitis etiyolojisinde görev almadığı sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Mastitis, inek, Staphylococcus aureus, *mecA*, *femA*, *eta, etb*

THE MOLECULER ANALYSİS OF VİRULENCE FACTORS AND ANTİBİOTİC RESİSTANCE OF *Staphylococcus aureus* İSOLATES FROM MİLK WİTH MASTİTİS FROM CATTLE

In this study, it was aimed that *Staphylococcus aureus izolates izolated from* diary cattle with subclinic mastiis was characterized in terms of some virulans factors and resistance genes of metilisin.

CMT test was done in order to determine the milk samples to be examined. According to test result, totally 900 milk samples with Trace(n=132), +1(n=408), +2(n=330), +3(n=30) were examined in terms of bacterial factors. A of total 252 bacteria was isolated from 240(%26.6) milk sample. More than one izolation was made to some milk samples. It was idenditified that the isolated bacteria were 52 % *Staphylococcus aureus*, 23 % Koagulaz Negatif Stafilokok(KNS), 13 %*Esherichia coli*, 8 % *Streptecoccus agalactia*, 4 %*Steptecoccus spp.*, %0,5'i *Klebsiella spp.*, %0,5'i *Alcaligenes spp*.

128 *Staphylococcus aureus* was examined, the existance of *mecA, femA, eta and etb* genes by multipleks polymeraz chain reaction m(PZR). *mecA gen was determined at* seven percent (9) of izolates. All of the isolated were found positive in terms of femA gen. Both eta and etb was determined none of the isolates.

As a result, it was concluded that (1) *S.aureus* is the most important agent in subclinic mastitis (2) The sensitivity of CMT test is lower than the data of other stduies (3) the number of metilisin resistant isolates is increased progressivly among the *S.aureus* isolated from cow mastitis (4) *femA* gen can be used for internal positive control for *S.aureus* (5) exfoliative toxin can not play a role at etiyology of mastitis.

Keywords: Mastitis, dairy, Staphylococcus aureus, mecA, femA, eta, etb

İÇİNDEKİLER

Dış kapak..... İ

Onay Sayfası..... ii

Önsöz..... iii

Özet……..... iv

Abstract…….. v

İçindekiler…….. vi

Kısaltmalar ve simgeler……. x

Tablolar listesi…… xi

Şekiller Listesi…… xii

1. Giriş…… xiii

2. Genel Bilgiler……. 2

2.1. Mastitisinin Tanımı …….. 2

2.2. Mastitisin Önemi …… 2

2.3. Mastitis Etiyolojisi ve Oluşumunda Rol Oynayan Önemli Faktörler…… 4

2.4. Mastitisin Tanısı ve Tanıda Kullanılan Testler ……... 6

2.4.1. California Mastitis Testi (CMT):…… 6

2.4.2. Somatik Hücre Sayısı (SHS)……... 7

2.4.3. Süt Sodyum Miktarının Ölçülmesi……. 8

2.4.4. Elektirksel Konduktivite…….. 8

2.4.5. Süt Kültürü…….. 8

2.4.6. Flow Stometri Yöntemi…… 9

2.4.7. Moleküler Yöntemler……... 9

2.5. *Staphylococcus aureus*'un Fenotipik Özellikleri……..... 10

2.6. Mastitis Etiyolojisinde *Staphylococcus aureus*'un Önemi …….. 12

2.7. *Staphylococcus aureus* Mastitislerinin Patogenezi…….. 13

2.8. *Staphylococcus aureus* Mastitislerinin Tedavisi……... 14

2.9. *Staphylococcus aureus* Mastitislerinden Korunma Yöntemleri……..... 15

2.10. *Staphylococcus aureus*'da Metisilin Direnci…….. 16

2.11. Oksasilin (Metisilin) Direncinin Belirlenmesi…….. 20

2.12. Stafilokoklarda *fem* Geni…….. 22

2.13. *Staphylococcus aureus*'ların Önemli Virülens Faktörleri……... 24

2.13.1. Hücre Duvar Yapısında Bulunan Virülans Faktörleri ……... 26

2.13.1.1. Kapsüler polisakkarit…….. 26

2.13.1.2. Protein A…….. 27

2.13.1.3. Koagulaz ve Pıhtılaştırma Faktörleri…… 28

2.13.2.Ekstrasellüler toksin ve enzimler …… 28

2.13.2.1. PTSAg ailesi…… 28

2.13.2.1.1. TSST-1……. 29

2.13.2.1.2. Stafilokokal Enterotoksinler ……..... 29

2.13.2.2. Eksfoliatif toksin……. 30

2.13.2.3. Hemolizinler 31

2.13.2.3.1. Alfa hemolizin…….. 31

2.13.2.3.2. Beta hemolizinler……. 32

2.13.2.3.3. Gama hemolizin- PV- lökosidin……... 33

2.13.2.3.4. Delta hemolizin…… 33

2.13.2.4. Staphylokinaz…….. 34

2.13.2.5. Diğer Ekstrasellüler Enzimler……..... 34

2.13.2.6. Biofilm……. 34

3. Materyal veMetod……..... 36

3.1. Materyal……. 36

3.1.1. Numuneler……... 36

3.1.2. Besi yerleri……. 36

3.1.3. Supplementler…….. 39

3.1.4. Ayıraçlar…….. 39

3.1.5 Testlerde Kullanılan Cihaz Ekipmanlar …….. 39

3.1.6. Referans suş…… 40

3.2. Metot……. 45

3.2.1.California Mastitis Testi…… 45

3.2.2. Sığır Süt Örneklerinden *S. aureus* İzolasyonu…….. 45

3.2.3. Biyokimyasal testler……..... 45

3.2.3.1 Karbonhidrat Fermantasyon Testi……. 45

3.2.3.2. Üre Testi……... 46

3.2.3.3. İndol Testi……..... 46

3.2.3.4 Metil Red Testi……. 46

3.2.3.5 Hidrojen Sülfür Testi……. 47

3.2.3.6. Lisin Dekarboksilaz Testi…… 47

3.2.3.7. Sitrat Kullanım Testi…… 47

3.2.3.8. CAMP Testi……... 47

3.2.4.Moleküler İdentifikasyon…….. 48

3.2.4.1.DNA Ekstraksiyonu…….. 48

3.2.4.2.Multipleks PCR……. 48

3.2.4.3. Agaroz Jel Elektroforezi…….. 49

4.Bulgular……... 50

4.1.California Mastitis Testi…….. 50

4.2. Mikroskobik Muayene Sonuçları……... 50

4.3. Biyokimyasal Test Sonuçları…….. 51

4.4. Süt Numunelerinde *Staphylococcus* spp'nin Prevalansı…… 52

4.5. Süt Numunelerinden İzole Edilen Bakterilerin Prevalansı……. 52

4.6. Multipleks PCR Sonuçları…….. 53

5. Tartışma- Sonuç……. 55

Kaynaklar 63

KISALTMALAR VE SİMGELER

CNS: Koagulaz negatif stafilokok

CP: Capsular polysaccharide

IDF: İnternational Dairy Federation

IFN-γ: İnterferon gama

IL-6: İnterlökin 6

m(PZR): Multipleks polimeraz zincir reaksiyonu

MRSA: Methicillin Resistance *Staphylococcus aureus*

PBP: Penisilin Bağlayan Protein

DNA: Deoksiribonükleikasit

ET: Eksfoliatif Toksin

TABLOLAR LİSTESİ **Sayfa No**

Tablo 2.1. Mastitisin sütün bileşiminde meydana getirdiği değişiklikler 3

Tablo 2.2. Farklı çalışmalarda mastitis olgularından izole edilen bakteriyel etkenlerin dağılımı 6

Tablo 2.3. *S.aureus*'un bilimsel sınıflandırılması 10

Tablo 2.4. *S. aureus*'un biyokimyasal özellikleri 11

Tablo 2.5. Koagulaz pozitif stafilokokların identifikasyonu 11

Tablo 2.6. Metisilin direncinden sorumlu bazı kromozamal faktörler 23

Tablo 2.7. *S. aureus*'un sahip olduğu virülens faktörlerinin sınıflandırılması 25

Tablo 2.8. Bazı virülens faktörleri ve salındıkları büyüme fazları 26

Tablo 3. 1. *S.aureus* suşlarının m-PCR ile incelenmesinde kullanılan primerlerin dizilimi 43

Tablo 4.1. California Mastitis Test Sonuçları 50

Tablo 4.2. Süt Numunelerinden Elde Edilen *Staphylococcus* spp.'lerin Fenotipik Özellikleri 52

Tablo 4.3. Süt numunlerindeki *Staphylococcus* Türlerinin Prevalansı 52

Tablo 4.4. Süt numunelerinden izole edilen etkenlerin prevelansı 53

ŞEKİLLER LİSTESİ **Sayfa No**

Şekil 2.1. 2007 ylılnda Avrupa invazif *S.aureus* izolatları içerisinde oksasilin direncine sahip suşların oranı 20

Şekil 2.2. Peptidoglikan prekürsörlerinin oluşumuna Fem geninin etkisi 24

Sekil 4.1. Baird Parker Medium'da pozitif (*S.aureus pozitif*) kültürlerin görünümü. 51

Şekil 4.2**.** Sahadan izole edilen şüpheli suşlara uygulanan m-PCR sonuçları. M. Marker (100 bp Vivantis), 1, 5, 8, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 132 bp'de sadece *femA* pozitifliği görülen izolatlar, hem *mecA*(163 bp) hemde *fema* pozitif bulunan izolatlar (2, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 11, 13) 54

1. GİRİŞ

Dünyada ve ülkemizde kaliteli ve sağlıklı gıda maddelerine ulaşmak giderek daha zor bir hal almaktadır. Beslenme zincirinde özellikle çocuklar için önemli bir yeri olan süt ve süt ürünlerinin sağlıklı üretilmesi oldukça önemlidir. Süt ve süt ürünleri ile insanlara Brusella, Tüberkuloz basili ve listeriya gibi önemli bakteriler bulaşabilir. Bu hastalıkların önlenebilmesi için süt üretimininin başlangıcında gerekli hijyenik tedbirlerin alınması gerekir.

Sürü sağlığını etkileyen en önemli mikroorganizmalardan biri *S.aureus*'tur. *Staphylococcus aureus*'lar süt ineklerinde kronik mastitise neden olarak süt ineklerinin immun sistemini zayıflatmakta ve zoonotik hastalıklara karşı duyarlı hale getirmektedir. *Staphylococcus aureus*'ların bir diğer önemli özelliği de tedavide kullanılan antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesidir. Sahip olduğu antibiyotik direnci ile hem insan hemde hayvan sağlığını etkilemektedir. Direnç geliştirdiği antibiyotiklerden biriside metisilindir. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*(MRSA) hastane infeksiyonlarının en önemli nedenidir. oluşturduğu enfeksiyon tablosunun düzeltilmesi çoğu zaman mümkün olmamakta ve ölümle sonuçlanmaktadır. Etkenin epidemiyolojisinin ve sahip olduğu antibiyotik direnç profilinin bilnmesi etiyolojisinde rol oynadığı hastalıklarla mücadelede önemli avantajlar sağlayacaktır.

Bir bakterinin hastalık oluşturmasını engelleyebilmenin en önemli şartlarından biri de etkenin sahip olduğu virülens faktörlerinin bilinmesidir.

Çalışmamızda süt sığırı yetiştiriciliği yapılan işletmelerde *S.aureus*'un mastitis etiyolojisindeki yerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca MRSA varlığının ve metisilin direncinde önemli rol oynayan *femA* geninin varlığı moleküler yöntemlerle tespit edilmeye çalışılmıştır. Çalışma kapsamında izole edilen *S.aureus*'ların eksfoliatif toksin genlerine sahip olup olmadığı belirlenmeye çalışıldı.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Mastitisinin Tanımı

Memedeki patolojik değişikliklere bağlı olarak ortaya çıkan; sütün kimyasal kompozisyonunda ve memenin fiziksel görünümünde değişikliklerle karakterize meme dokusunun iltihabına mastitis denir (1, 2)**.** Mastitis; inflamasyonun klasik bulguları olan kızarıklık, şişlik, ağrı ve ısı artışı ile karakterizedir. Klinik olarak meme dokusunun sert ve kırmızı olduğu ayrıca ısısının yükseldiği görülür (3). Sığır mastitisleri farklı özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır. Mastitis birçok formda karşımıza çıkmasına rağmen % 95 oranında subklinik formda görülür. Subklinik mastitiste ineklerde herhangi bir klinik bulgu yoktur. Ancak süt kompozisyonunda ve süt üretiminde değişikliklere yol açar (4).

Meme sağlığı kontrol programı uygulanmayan sürülerin % 50'sinde subklinik mastitis problemi mevcuttur (5). Ibstisam ve ark. 2006 Subklinik mastitislerin görülme sıklığının klinik mastitislere oranla daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca subklinik mastitislerin görülme sıklığının kış aylarında daha fazla olmasına karşın klinik mastitislerin daha çok yaz aylarında arttığını bildirmişlerdir.

2.2. Mastitisin Önemi

Mastitis ülkemiz hayvancılık ekonomisinde büyük bir paya sahip olan süt ineği yetiştiriciliği için önemli bir problemdir. Mastitis sağmal ve kurudaki ineklerin memelerine zarar vererek süt verimini azaltmakta veya ortadan kaldırmaktadır (3).

2008 yılı sonu itibariyle toplam büyükbaş hayvan sayısı bir önceki yıla göre % 1,58 azalış göstererek 10.946. 239 baş olarak gerçekleşmiştir. Büyükbaş hayvanlar arasında

yer alan sığır sayısı % 1,60 azalarak 10. 859. 942 baş olurken manda sayısı % 1,88 artarak 86. 297 baş olarak gerçekleşmiştir. (6) Türkiye'de yılda toplam 9,7 milyon ton çiğ süt üretilmektedir. Ülkemizde üretilen sütün % 40'lık bölümünün üretildiği ilk kaynakta tüketildiği geri kalan % 60'ının ise pazara sunulduğu belirtilmektedir. Tüketime sunulan bu sütlerin büyük bölümü çiğ ve hijyenik olmayan şartlarda satılmaktadır (7). Bu nedenle sığır mastitisleri halk sağlığı açısından da büyük öneme sahiptir. Shwimmer ve ark. 2007 İsrail'de yaptıkları çalışmada 9 inekte görülen mastitis olgularından insanlarda mezenterik lenfadenite neden olan *Yersinia pseudotuberculosis* izole ettiklerini bildirmişleridir. Rawool ve ark. 2007 243 İnekten aldıkları süt örneklerinden 12 tanesinde *Listeria monocytogenes* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Zadoks ve ark. 2000 İnsan ve sığır kökenli *S. aureus'*ların Pulse field gel electrophoresis ile akrabalık derecelerini inceledikleri çalışmada 5 insan ve 16 sığır kökenli etkenin % 90-95 benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir.

Hastalanan ineklerin hastalığı ahırda bulunan diğer ineklere bulaştırması, tedavi sırasında kullanılan ilaçlar ekonomik temellere dayalı olan süt sığırı yetiştiriciliği için büyük problemlere neden olmaktadır (11, 12)**.** Mastitis sonucu ortaya çıkan ekonomik kaybın nedenleri süt veriminde azalma (% 65), mastitisli sütlerin imhası (% 13), sürünün yenilenmesi (% 9), satış değerinin azalması (% 6), ilaç masrafları (% 4), veteriner hizmetleri (% 2) ve laboratuvar masrafları (% 1) olarak sıralanabilir (5).

Ekonomik kayıp bölgesel olarak farklılık gösterse de inek başına yaklaşık 90- 250 Amerikan Doları olduğu tahmin edilmektedir (13). Huijps ve ark 2008 Klinik mastitis olgularında ekonomik kaybın olgu başına yaklaşık 210 euro olduğunu bu değerin hasta hayvanın bulunduğu laktasyon dönemine göre farklılık gösterebileceğini belirtmişlerdir. Rajala-Schutz ve ark. 1999 Mastitis nedeniyle meydana gelen kaybın ortalama 164-235 euro arasında olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada mastitisli bir ineğin çoğu zaman mastitis olmadan önceki süt verimine bir daha ulaşamadığı belirtilmektedir. Kossaibati ve Esslemont 1997 İneklerdeki sağlık problemleri nedeniyle bir sürüde yıllık 6300 sterlin kayıp meydana geldiğini ve bu kaybın % 38'inin mastitis kaynaklı olduğunu bildirmiştir. Mastitis süt kaybı dışında ineklerde abort oranınıda arttırmaktadır (17)**.** Rısco ve ark. 1999 Gebeliğin ilk 45 gününe kadar mastitis olan ineklerin ilk 90 günlük periyotta mastitis olmayan ineklere göre aborta daha duyarlı olduğunu bildirmiştir. Schrick ve ark. 2001 Kilinik ve subkilinik mastitsli ineklerin reprodüktif

parametrelerinin oldukça olumsuz etkilendiğini bildirmişlerdir. Mastitisin önemli sonuçlarından biride memedeki inflamasyona bağlı olarak sütün kompozisyonunda meydana gelen değişikliklerdir. Mastitisli ineklerin sütlerinin yağ, protein ve iyon içerikleri değişebilir (19, 20). Sütteki somatik hücre sayısı ile sütün laktoz ve yağ miktarı arasında negatif bir ilişki mevcuttur. Aynı zamanda sütteki üre nitrojen ile protein ve yağ oranı arasında da negatif etkileşim mevcuttur (21). Mastitisin sütün bileşiminde neden olduğu değişiklikler tablo. 2. 1'de gösterilmektedir.

Tablo. 2.1. Mastitisin Sütün Bileşiminde Meydana Getirdiği Değişiklikler (22)

Azalan Parametreler	**Değişim Oranları**	**Artan Parametreler**	**Değişim Oranları**
Süt üretimi	- (--)	Somatik Hücre Sayısı	+++
Kuru madde	-	Whey proteini	+++
Laktoz	-	Sığır serum albümini	+
Yağ	-	İmmunglobulinler	+++
Uzun zincirli yağ asitleri	-	Kapa Kazein	+(+)
Total Kazein	- -	Proteos peptonları	++
αS1 Kazein	- -	Serbest yağ asitleri	++
β casein	- - -	Sodyum	++
α-laktoalbumin	-	Klor	++
Beta laktoglobulin	- - -	Laktat	+++
Kalsiyum	- - -	Enzim aktivitesi	
Magnezyum	- - -	Lipaz	++
Fosfat	- - -	Lizozim	+++
Çinko	-	NAGase	+++
Potasyum	-	Beta glukronidaz	+++
		Kısa Zincirli Yağ Asitleri	+
		Plazmin	+++

(+): Artış oranı (-): Azalma oranı

2.3. Mastitis Etiyolojisi ve Oluşumunda Rol Oynayan Önemli Faktörler

Mastitisin etiyolojisinde rol oynayan mikroorganizmaların ve diğer çevresel faktörlerin belirlenmesi hastalığın tanısı ve tedavisinde oldukça önemlidir. Hastalık oluşumunda rol oynayan faktörler; çevresel, konağa ve mikroorganizmaya ait olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. Bunların dışında bakım, beslenme, genetik, hijyen ve kontrol programlarının yeterli uygulanıp uygulanmaması da hastalık oluşumunda rol oynamaktadır (23). Mastitisin etiyolojisinde bakteriyel, viral, mikotik etkenler, meme travması ve kimyasal maddeler önemli yer tutmaktadır (24, 25). En sık karşılaşılan mastitis şekli mikrobiyal kaynaklı olanlardır (24). Farklı çalışmalarda mastitis olgularından izole edilen etkenlerin dağılımı tablo2.2'de görülmektedir. Mastitis etiyolojisinde rol oynayan mikroorganizmalar farklı şekillerde sınıflandırılmaktadır. Bunlardan en önemlileri kontagiyöz mikroorganizmalar olarak tanımlanan *S.aureus* ve *Streptecoccus agalactia'*dır (24, 26). Bu iki mikroorganizma arasında mastitis etiyolojisinde en fazla rol oynayan *S.aureus*'tur (27, 29). Rişvanlı 2001 1249 ineğe ait 4996 meme lobunu inceledikleri çalışmada *S.aureus* (% 57,08) ve *Staphylococcus epidermidis* (% 23,37)'in mastitis etiyolojisinde rol oynayan en önemli mikroorganizmalar olduğunu bildirmiştir. Etiyolojide rol oynayan diğer bir grup ise çevresel mikroorganizmalardır. Bu grup içersinde; *Streptecoccus uberis*, *Streptecoccus dysgalactiae* ve koliform grubu bakteriler yer almaktadır(30, 5). Fırsatçı bakterilerde mastitis oluşumunda rol oynayabilir. Bu grubun en önemli üyesi *S.aureus* dışındaki stafilokoklardır. *S.aureus* dışındaki stafilokoklardan başka Pseudomonas, Nocardia ve mayalarda mastitis etiyolojisinde rol oynar (25). Etiyolojide rol alan mikroorganizmalar aynı zamanda endojen ve ekzojen etkenler şeklinde sınıflandırılabilir. Endojen kaynaklı etkenler konağın meme başında, inguinal ve anal bölgesinde bulunan mikroorganizmalardır ve immun sisteminin baskılanması sonucu hastalık yaparlar (31). Haveri ve ark. 2008 Sığır mastitislerinden izole ettikleri etkenlerin meme kanalından ve meme başından izole ettikleri etkenler arasında benzerlik olduğunu bildirmişlerdir. Endojen etkenlerin hastalık yapma potansiyelleri daha düşük olduğu gibi tedavi edilmeleri ekzojen etkenlere oranla daha kolaydır (11). Ekzojen kaynaklı etkenler ise ahır zemininde, duvarında, yemlik ve suluklarda bulunan mikroorganizmalardır. Endojen ve ekzojen etkenlerin dağılımı mevsimsel ve coğrafik farklılıklara göre değişkenlik göstermektedir (11, 33, 34). Hastalığın oluşmasında ahırlardaki altlıklar ve

toprak, iyi temizlenmemiş süt sağım makinaları, kontamine olmuş yıkama suları önemli rol oynamaktadır(29, 35, 36). Elle sağım yapılması ve ahırlardaki temizliğinin tam olarak yapılmaması hastalık oluşumundan sorumlu diğer faktörlerdir (29). Meme yaralanmalarında mastitis oluşumunda önemli rol oynamaktadır (37, 38, 39). İnekler özellikle kuru ve laktasyon dönemleri arasındaki geçişlerde, doğum öncesi ve sonrası dönemlerde mastitise karşı oldukça hassastır (40). Memenin anatomik yapısında mikroorganizmaların meme içine girmesini engelleyecek doğal savunma sistemleri vardır. Bunlardan en önemlileri meme kanalı sfinkteri, laktoferrin ve meme içinde bulunan esterleşmiş ve esterleşmemiş yağ asitleridir. Memenin anatomik yapısı bozulmadığı sürece mikroorganizmaların meme kanalı sfinkterini geçmesi oldukça zordur (41). Makineli sağımda uygun vakum düzeyinin kullanılmaması, ineklerin yaşı ve laktasyon sayısı arttığında bu sfinkter hasar görür ve bakteriler meme kanalı içerisine kolaylıkla geçebilir.(39, 41-43). Meme kanalında bulunan keratin maddesine bağlı katyonik proteinlerde meme dokusunun önemli bir savunma aracıdır. Bu maddeler bakterilerin hücre duvarına yapışarak bakterilerin osmotik basınca olan duyarlılığını arttırmaktadır. Memenin doğal savunma sistemleri arasında bulunan laktoferrin ortamdaki demiri bağlayarak bakterilerin hücre duvarına zarar verir ve nötrofillerin aktivitesini düzenler. Ayrıca *S.aureus*'ların beta laktamaz aktivitesini de baskılar. Laktoferrinin tek başına antibakteriyel etkinliği düşüktür ancak düşük konsantrasyonlarda ve antibiyotiklerle kombine edildiğinde etkinliği artmaktadır. Laktoferrin beta laktamaz geninin transkripsiyonunu önemli ölçüde azaltır (44, 45). Meme dokusunun diğer bir savunma sistemi de sellüer ve hücresel immun sistemdir. Özellikle nötrofiller ve makrofajlar meme dokusunun savunmasında önemli görevler üstlenirler. Bu hücreler meme dokusuna giren mikroorganizmaları fagositozla öldürmektedir. Meme dokusu tarafından ve sistemik olarak salgılanan antikorlarda meme dokusunu mastitise karşı korumaktadır (46).

Tablo 2.2. Farklı Çalışmalarda Mastitis Olgularından İzole Edilen Bakteriyel Etkenlerin Dağılımı

Bakteriyel Etken	Waage 1999(47)	Pitkala ve ark. 2004(48)	Ferguson ve ark. 2007(49)	Sargeant ve ark. 1998(50)	Khan 2005(51)	Watts ve ark. 1986(52)
S.aureus	44.3	10.17	20.6	6.7	45	7.1
Streptecoccus	18.2	0.14	-	-	-	-
CNS	12.8	49.63	22.6	28.7	-	26.9
Escherichia coli	6.7	-	2.9	17.2	18	-
Streptecoccus	1.8	-	-	-	-	-
Streptococcus	0.1	11.1	-	14.1	23	-

CNS: Coagulase-negative staphylococci

2.4. Mastitisin Tanısı ve Tanıda Kullanılan Testler

Sığır mastitislerin tanısı klinik ve laboratuvar testleri ile konabilir. Mastitisin laboratuvar tanısı California Mastitis Testi(CMT), Somatik Hücre Sayısının (SHS) tespiti ve sütteki N asetil B-D- glukozaminidaz, laktat dehidrogenaz, glutamat-oksalasetat transaminaz, aril esteraz, sığır serum albumin düzeylerine bakılarak konulabilir (22, 53). Ayrıca bakteriyolojik kültür ve biyokimyasal testler mastitis tanısında kullanılan yöntemlerdir (54)**.** Bu yöntemler dışında moleküler ve serolojik yöntemlerle ultrasonografide mastitis tanısında kullanılmaktadır (55, 56). Watts ve Owens 1988 Lateks aglütİnasyon hızlı test kitinin *S.aureus*'un neden olduğu mastitislerin tanısında kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Mastitis tanısında kullanılan önemli testler;

2.4.1. California Mastitis Testi (CMT):

California Mastitis Testi testi ilk olarak 1957 yılında anormal sütlerin değerlendirilebilmesi için geliştirilmiş bir tarama testtidir. California Mastitis Testi

basit, ucuz, hızlı ve fazla beceriye gerek duymayan bir tanı aracıdır. 50 yılı aşkın süredir CMT testi mastitis tanısının konulması amacıyla kullanılmaktadır (58). Subklinik mastitislerin saptanmasında yaygın olarak kullanılan bir testtir. Test lökosit ve epitelyum hücrelerinin parçalanması ile serbest kalan DNA ve RNA 'ların aril alkil sülfonat ile birleşerek presipitasyon oluşturması esasına dayanmaktadır(25). Younan ve ark. 2001 CMT testinin sensivitesinin *S.aureus* ve *Str. agalactia* için sırasıyla % 68 ve % 77 olduğunu spesifitesinin ise her iki bakteri için % 91 olduğunu bildirmiştir. Mastitis şüpheli hayvanların memelerinden sağılan sütlere direk uygulanabildiği gibi tank sütüne de uygulanabilir ancak tank sütünün ineklerin memelerinden alınan sütten daha dilüe olması ve birçok sütün karışımından meydana gelmesi nedeniyle tank sütlerine uygulanan CMT sağlıklı sonuç vermeyebilir (58). California Mastitis Testinin sonucuna göre sütteki somatik hücre sayısı tahmin edilebilir. Bu test sayesinde sürü taraması yapılarak mastitisin sürünün tamamına yayılmasına engel olunabilir (60).

2.4.2. Somatik Hücre Sayısı (SHS):

Sütteki somatik hücre sayısının artışı ineklerde mastitisin indikatörü olarak kullanılmaktadır (53). International Dairy Federation (IDF)'e göre mastitis tanısının meme bezindeki bakteriyolojik duruma ve sütteki somatik hücre sayısına göre konulabileceği belirtilmektedir (20). Sütte bulunan lökositler ve meme epitelyum hücrelerine genel olarak somatik hücreler denmektedir (25). Sheldrake ve ark.1981 Mastitis ile somatik hücre sayısının artışı arasında bir bağlantı bulduklarını belirtmişlerdir. Kontagiyöz mikroorganizmalar ineklerin meme dokusuna girip orada yaşayabilir ve ineklerde subklinik mastitis oluşturabilir. Bu etkenler sütteki lökosit ve epitelyum hücrelerinin sayısını arttırırlar (5). Somatik hücre sayısı süt ürünlerinin işlenmesinde de bazı sorunların ortaya çıkmasına neden olabilir. Ayrıca, süt üretiminin kaybının bir göstergesi olarak yorumlanabilir (62). Bir meme lobuna ait normal somatik hücre sayısı ml'de 200.000'dir (5). Tank sütünde de somatik hücre sayısına bakılabilir ancak sütün dilüe edilmesi bu değerleri azaltacağından yanlış sonuçlar ortaya çıkabilir (58). Sütteki somatik hücre sayısı mikroskop ile sayılabildiği gibi otomatize sistemlerlede sayılabilir (63). McDougall ve ark. 2001 somatik hücre sayısının CMT' ne oranla daha duyarlı olduğunu belirtmiştir.

2.4.3. Süt Sodyum Miktarının Ölçülmesi:

Sütteki sodyum miktarının belirlenmesi mastitis tanısında kullanılmaktadır. Süt sodyum miktarı flame fotometrik yöntemle ölçülmektedir (53).

2.4.4. Elektirksel Konduktivite:

Mastitisli sütlerde meydana gelebilecek en erken belirtilerden birisi sütün elektriksel aktivitesindeki değişikliklerdir. Elektriksel konduktivite mastitis tanısında kullanılabilecek uygun bir yöntem olmasına rağmen hayvanın fenotipik ve genotipik özelliklerine göre değişkenlik gösterebilmektedir (66). Sütün elektriksel konduktivitesi ve iletkenliği içindeki erimiş haldeki elektrolitlere bağlıdır. Sütün elektrolit ve tuz miktarındaki değişme, iletkenliğini etkiler. Mastitisli sütlerde sodyum klorid oranı yüksek olduğu için geçirgenlikte buna paralel olarak artmaktadır (66, 67). Mastitisli sütler normal sütlere oranla daha fazla elektiriksel aktiviteye sahiptir. California Mastitis Testinde olduğu gibi meme dokusunda hastalık ortaya çıkmadan veya hastalık şiddeti artmadan önce mastitis tanısı konulabilir ve önlem alınabilir (67). Ancak sadece sütün elektirksel kondüktivitesine bakarak mastitis tanısı konulması mümkün değildir. Test ile ilgili en büyük problem süte ait elektriksel konduktivitenin hayvanlar arasında değişkenlik göstermesidir. Ayrıca testin spesifikliği ve sensitivitesi değişkenlik göstermesidir (53,68). Norberg ve ark. 2003 Elektriksel konduktivite yöntemini kullanarak kilinik mastitislerin % 80.6'sını subklinik mastitislerin % 45.0'inin doğru olarak sınıflandırdıklarını belirtmişleridir. Ayrıca sağlıklı sığırların ise % 74.8'ini doğru olarak tespit edebildiklerini bildirmiştir.

2.4.5. Süt Kültürü:

Mastitis olgularında tanı amacıyla kullanılan süt kültürü yönteminin spesifitesinin fazla ancak sensivitesinin değişken olabileceği sonuçlar verebileceği belirtilmektedir (69). Süt kültürü yapılırken sütün ekim yapılmadan önce inkübasyona bırakılması veya dondurulmasının sonucu etkileyebileceği belirtilmektedir (70).

2.4.6. Flow Stometri Yöntemi:

Bu yöntem sütte bulunan somatik hücrelerin ayırt edilmesini sağlamaktadır. Makrofaj ve lökosit gibi immunsistem hücrelerini birbirinden ayırabilmekte böylece subklinik mastitislerin erken tanısına olanak sağlamaktadır (71).

2.4.7. Moleküler Yöntemler:

Sığır mastitslerin tanısında moleküler yöntemler de kullanım alanı bulmuştur (72). Mastitis etiyolojisinde rol oynayan mikroorganizmaların DNA'sı kullanılarak mastitis tanısını konulabilir. Etiyolojide rol oynayan mikroorganizmaların çok çeşitli olması klasik yöntemlerle mastitis tanısını güçleştirmektedir. Süt kültüründen daha hızlı ve doğru sonuç vermektedir (24). Riffon ve ark. 2001 *E.coli, S.aureus, Str. agalactia, Str. dysgalactiae, Streptococcus parauberis* ve *Streptococcus uberis* bakterilerinin neden olduğu mastitislerinin tanısının daha hızlı konulmasını sağlaycak prob geliştirdiklerini bildirmişlerdir. Thomas ve ark. 1991 Polimeraz zincir Reaksiyon'u (PZR) klasik metodlara göre daha hassas olduğunu belirtmiştir. Etiyolojide rol oynayan etkenlerin tespit edilmesinin dışında izole edilen etkenlerin hastalık oluşumunda rol oynayan virülans faktörlerinin belirlenmesinde de moleküler yöntemler kullanılmaktadır (75). Lange ve ark. 1999 Mastitisli ineklerden izole ettikleri *S.aureus*'ların plasmid profillerini, koagulaz ve protein A'yı kodlayan gen bölgelerindeki farklılıkları inceledikleri çalışmada beş farklı yöntem denemişler ve diğer yöntemlere kıyasla moleküler yöntemlerin spesifitesi ve sensivitesinin daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Aynı zamanda moleküler yöntemler mastitis tanısında ortaya çıkabilecek zaman kaybınıda engellemektedir (24). Lee ve ark. 2008 Mastitis etiyolojisinde rol oynayan *Corynebacterium bovis, Mycoplasma bovis, S. aureus, Str. agalactiae, Str. bovis, Str. dysgalactiae ve Str. uberis* bakterilerinin m(PZR) tekniği ile hızlı teşhis edilebilmesi için bir çip geliştirdiklerini ve bu çipin mastitisin tanısında rahatlıkla kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Kubota ve ark. 2007 Kantitatif PCR'ın mastitis etiyolojisinde rol oynayan mikroorganizmaların tanısında kullanılabileceğini bildirmiştir. Ancak sütte bulunan inflamatuar somatik hücrelerin PCR'ı olumsuz etkilediğini belirtmişlerdir. Graber ve ark. 2007 Rutin bakteriyolojik yöntemlerin memnun edici sonuçlar vermediğini ve pahalı yöntemler olduğunu bildirmiştir. Bu nedenle kantitatif PCR

yönteminin *S.aureus* mastitislerinin tanısında kullanılabilecek oldukça duyarlı bir yöntem olduğunu belirtmiştir. Gillespie ve ark. 2005 Multiplex real-time PCR in sütten direkt *S. aureus, Str. agalactiae* ve *Str. uberis'i* tespit edebildiğini bu nedenle ileride mastitis tanısında kullanılabilecek değerli bir yöntem olacağını bildirmişlerdir.

2.5. *Staphylococcus aureus*'un Fenotipik Özellikleri

Staphylococcus aureus gram pozitif mikroskop altında üzüm salkımı şeklinde kümeler halinde görülen bir bakteridir. Kanlı agarda 4mm çapında altın sarısı pigment oluşturmaktadır. *S.aureus*'un bilimsel sınıflandırılması tablo2.3'te verilmiştir.

Tablo 2.3. *S.aureus*'un bilimsel sınıflandırılması (81)

Alem	**Bakteriler**
Bölüm	Firmicutes
Sınıf	Bacilli
Takım	Bacillales
Familya	Staphylococcaceae
Cins	*Staphylococcus*
Tür	***S.aureus***

Stafilokokal türler insan ve hayvanlarda kommensal olarak yaşayan mikroorganizmalardır (82). *Staphylococcus aureus*'lar ısı ve çevre koşullarına dayanıklı bakterilerdendir. Yüksek tuz konsantrasyonlarında (%10-15) üreyebilirler. Stafilokokal türlerin identifikasyonu koloni karakteristikleri, kanlı agarda meydana getirdikleri hemoliz özelliği, pigment oluşturma, aerobik koşullarda bazı şekerlerden gaz oluşturma, asetoin oluşturma, slide- tüp koagulasyon ve katalaz testleri ile yapılmaktadır (83). *Staphylococcus aureus*''un biyokimyasal özellikleri laboratuvar tanısının konmasında oldukça sık kullanılmaktır. *Staphylococcus aureus*'un biyokimyasal özellikleri tablo 2.4'te gösterilmiştir.

Tablo 2.4. *S.aureus'*un biyokimyasal özellikleri (83)

Aerop üreme	+
Anaerop üreme	+
Hemoliz	+
Koagulaz	+
DNase	+
Trehaloz-mannitol- fosfataz agar	+
Novobiosin duyarlılığı	+
Basitrasin duyarlılığı	-
Aseton oluşumu	+
Mannitol	+
Trehaloz	+
Maltoz	+
Ksiloz	-
Sükroz	+
Laktoz	+
Sellobioz	-

+= Pozitif - = Negatif

Staphylococcus aureus'un laboratuar tanısında en sık kullanılan testlerden biri koagulaz testidir. Bu nedenle koagulaz pozitif stafilokokların ve bunların birbirlerinden farklı biyokimyasal özelliklerinin bilinmesi gerekir (Tablo 2.5).

Tablo 2.5. Koagulaz pozitif stafilokokların identifikasyonu(84)

Organizma	**Tüp**	**Voges-proskauer testi**	**PYR**
S.aureus supsp. aureus	+	+	-
Staphylococcus intermedius	+	-	+
Staphylococcus hycus	V	-	-
Staphylococcus schleiferi subsp.	+	+	+

+= Pozitif - = Negatif V= Değişken

Staphylococcus aureus'un sahip olduğu virülens faktörleri insan ve hayvanlarda ciddi hastalıklar oluşturmasını sağlar. Etiyolojisinde rol aldığı hastalıklar arasında; deri enfeksiyonları, toksik şok sendromu, solunum sistemi infeksiyonları, endokardit, tromboflebit, parotit, osteomyelit, piyoartrit, metastatik stafilokok infeksiyonları, besin zehirlenmesi, sığır mastitisleri, koyunların kene piyemi, botriyomikoz yer almaktadır (82, 83).

2.6. Mastitis Etiyolojisinde *Staphylococcus aureus*'un Önemi

Mastitis etiyolojisinde *Str. agalactia* major etiyolojik ajan olarak düşünülmekteydi ancak son yıllarda uygulanan sürü yönetim programları, süt sağımı sırasında hijyenik kurallara dikkat edilmesi, kuru dönem tedavisi *Str. agalactia*'nın görülme sıklığının azalmasına neden olmuştur. Bugün birçok sürüde *Str. agalactia* mastitisi görülmemektedir. Ancak son yıllarda kontagiyöz bir mikroorganizma olan *S.aureus*'un sığır mastitislerindeki önemi artmaktadır. Alınan birçok tedbire rağmen *S.aureus* ile istenilen düzeyde mücadele edilememektedir. Bunun nedenleri arasında etkene ait virülans faktörleri, hastalığın patogenezinin tam olarak bilinmemesi, konağın sahip olduğu defans mekanizmaları ve etkenin sahip olduğu geniş antibiyotik direnci sayılabilir (3). İneklerin meme dokusu özellikle doğum dönemlerinde ve erken laktasyon dönemlerinde mastitise oldukça duyarlıdır. Bu dönemlerde etken olarak karşımıza çıkan en önemli bakteri *S.aureus*'tur (85). Türütoğlu ve ark 1995 1126 (% 70,6) süt örneğinin 316 (% 28,1)'sından *S. aureus* ve 260 (% 23,1)'ından *S. epidermidi*s identifiye ettiklerini bildirmişlerdir. Kuyucuoğlu ve Uçar 2001 Afyon bölgesinde yaptıkları çalışmada klinik ve subklinik mastitisli 126 inekten 119'unun subklinik, 7'sinin ise klinik mastitisli olduğu bildirilmiştir. Tollersrud ve ark. 2000 Norveç'te 1998 yılında mastitis olgularının % 50'sinden *S. aureus* izole edildiği bildirilmektedir. Bu ineklerden % 40,1 oranında *S. aureus* identifiye edilmiştir. Lakew ve ark. 2009 CMT ve klinik muayene ile tespit ettikleri klinik ve subklinik mastitisli 144 inekten 133'ünün süt numunesinin kültür pozitif olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada bu sütlerden %24,1'inden *S.aureus* izole ettiklerini bildirmişlerdir.

S. aureus bir inekten diğerine kolaylıkla ve hızlı bir şekilde yayılabilen kontagiyöz bir patojendir (26). Oluşturduğu hastalık nedeniyle sütün kalitesinde de önemli kayıplara

neden olmaktadır**.** *S. aureus*'un genellikle sürüdeki iyi süt verimi olan inekleri etkilediği belirtilmektedir (90).

2.7. *Staphylococcus aureus* Mastitislerinin Patogenezi

Staphylococcus aureus piyojenik bir bakteri olduğu için genellikle süpüratif lezyonlara yol açmaktadır. Küçük bir travma ya da immunsupresyon mastitis gelişmesi için zemin hazırlar. *Staphylococcus aureus*'ların hastalık oluşturmasında virülans faktörleride oldukça etkilidir. Bunların bir kısmı *S. aureus'*ların genomunda kodlanmıştır. Bazıları ise ise plazmid veya fajlarla aktarılmıştır. *Staphylococcus aureus*'un hücre duvarında bulunan proteinler fibronektin ve firinojene bağlanmasını sağlar bu durum meme dokusuna tutunmasını kolaylaştırır. Patogenezde rol oynadığı düşünülen önemli bir virülans faktörü ise koagulazdır (82)**.** *Staphylococcus aureus* hastalığın hem klinik hem de subklinik formlarında meme dokusunun parankimine önemli ölçüde zarar vermektedir (3)**.** Gudding ve ark. 1984 *S. aureus*'un meme epitel tabakasına tutunarak meme epitelinde hasara yol açtığı ve ülseratif lezyonlar oluşturduğunu bildirmişlerdir. Nickerson ve Heald 1982 Meme dokusundaki nötrofillerin epitel tabakasında meydana gelen ülseratif lezyonlardan ve hasardan sorumlu olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada mastitise bağlı süt kayıplarının nedeninin başta nötrofil lökositler olmak üzere somatik hücreler olduğunu belirtmişlerdir.

2.8. *Staphylococcus aureus* Mastitislerinin Tedavisi

Mastitis önlenebilen ve kontrol altında tutulabilen bir hastalıktır. Subklinik ve klinik mastitisli inekler kuru veya sağmal dönemde antibiyotikle tedavi edilebilir. Genç süt ineklerinin mastitisten korunmalarını sağlayacak etkin bir sürü yönetim şekli yoktur. Bu nedenle laktasyon ve laktasyonda olmayan süt ineklerinde antibiyotik tedavisinin önemli bir yeri vardır (94)**.** Sürüdeki mastitis insidansının artmasındaki en önemli nedenlerden biri tedavideki aksaklıklardır (2). Mastitisin etkin şekilde tedavi edilebilmesi için etiyolojide rol oynayan mikroorganizmaların bilinmesi ve bu mikroorganizmaların sahip olduğu antibiyotik direncinin tespit edilmesi gerekir (95). Ebehart 1985 Etiyolojide rol oynayan mikroorganizmaların hastalığın tedavi şansını

etkilediğini belirtmektedir. *Staphylococcus aureus*'un neden olduğu mastitislerde tedavi oranı düşüktür. Bunun nedeni etkenin sahip olduğu antibiyotik direnci ve meme dokusunda oluşturduğu mikroapselerdir. Bu apseler nedeniyle antibiyotik istenilen düzeyde etki edememektedir(25). Erksine ve ark. 1994 *S. aureus* mastitislerinin antibiyotik tedavisinden sonra relaps yapabileceğini vurgulamışlardır. Bu nedenle *S.aureus* mastitislerinin antibiyotikle kesin tedavisi her zaman mümkün olmamaktadır (97). Ancak antibiyotikler kullanılarak sürüde mastitis görülme sıklığı azaltılabilir veya relapslar önlenebilir. *Staphylococcus aureus* mastitislerinin tedavisinde sadece meme içi antibiyotik uygulaması istenilen etkiyi göstermeyebilir. Meme içi antibiyotik kullanımının yanı sıra sistemik antibiyotik kullanımı tedavi şansını arttıracaktır (98). Mastitis tedavisindeki başarısızlığın önemli nedenlerinden biri de uygun antibiyotiğin kullanılmaması ve hasta ineklerin tam olarak belirlenmemesidir (99). Stafilokokal enfeksiyonların tedavisinde kullanılan önemli antibiyotikler; amoxicillin clavulanic acid, cefqiunome, tilmicosin, marbofloxacin ve pirlimycin'dir (100). Yoğun ve uzun süreli antibiyotik kullanımı sonucunda bakteriler kullanılan antibiyotiklere direnç kazanmaktadır (101, 102). Günümüzde antibiyotik direnci bakteriler arasında hızla yayılmaktadır. Bu durum halk sağlığını önemli ölçüde tehdit etmektedir. Hayvan hastalıklarında kullanılan antibiyotiklerin düzensiz ve bilinçsiz kullanılması ilerleyen yıllarda insan sağlığını da etkileyen önemli bir problem olarak karşımıza çıkacaktır (103). *Staphylococcus aureus* infeksiyonlarının tedavisinde primer olarak kullanılan ilaçlar antibiyotiklerdir. Bu nedenle mastitise neden olan *S.aureus*'ların antibiyotik direncinin bilinmesi hem tedavi başarısı için hem de antibiyotik direncinin yayılımının anlaşılabilmesi için büyük önem taşımaktadır. *Staphylococcus aureus*'un çeşitli antibiyotiklere karşı sahip olduğu direnç bölgesel farklılık gösterdiği gibi sürüden sürüye de değişkenlik göstermektedir (98, 103, 104)**.** Mastitis etiyolojisinde rol oynayan etkenler giderek kullanılan antibiyotiklere karşı direnç geliştirmektedir (105). Gentillini ve ark. 2000 Mastitis olgularından izole ettikleri *S.aureus*'ların % 40.3'ünün penisiline dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Owens ve ark. 1988 Mastitsli ineklerden izole ettikleri *S.aureus*'larda yüksek oranda penisilin direnci olduğunu bildirmişlerdir. Beta laktam grubu antibiyotiklere karşı direnç hızla yayılmaktadır. Bu nedenle bu grup antibiyotikler dikkatli kullanılmalıdır (106). Panlilo ve ark 1992 Yaptıkları çalışmada 1975 ve 1992 yılları arasında izole edilen 66.132 *S.aureus* suşunun 6986 (% 11)'inde metisilin direncine sahip olduğunu belirtmişleridir. Ayrıca MRSA'ların giderek daha büyük bir

problem olacağını tahmin etmektedirler. Bu nedenle mastitis tedavisinde beta laktam grubu antibiyotiklerin kullanımına dikkat edilmesi gerekir. Aksi takdirde hayvan orjinli MRSA'lar insan sağlığını ciddi şekilde tehdit edebilir (108). Tüm dünyada mastitis olgularından izole edilen etkenlerin antibiyotik direnci giderek artmaktadır. Bu nedenle mastitis tedavisinde kullanılabilecek alternatif antimikrobiyaller üzerinde çalışılmaktadır. Salat ve ark. 2008 Mastitis tedavisinde bilinen antibiyotikler dışında penetamatın da etkili olduğu ve bakteriyel kür sağladığını belirtmişlerdir. Ayrıca uygulamadan sonraki 2 ay içerisinde penetamat'ın somatik hücre sayısı üzerine de etkili olduğunu belirtilmişlerdir. Broadbent ve ark. 1989 Nisin maddesinin invitro olarak *S. aureus*'a karşı etkili olduğunu ve invivo denemelerinin yapılması gerektiğini bildirmiştir. Nair ve ark. 2005 Kaprilik asit ve monokaprilik asit'in mastitis tedavisinde kullanılabilecek maddeler olduğunu bildirmişlerdir. Moon ve ark. 2007 Chitosan-oligosaccharide (OCHT)'in *S. aureus*'a karşı antibakteriyel etkinliğinin olduğunu bildirmişleridir. Ayrıca OCHT'nin farelerde monosit, IFN-γ ve IL-6 miktarını arttırarak nonspesifik immun sistemi aktive ettiğini belirtmişlerdir. Bu nedenlere dayanarak OCHT'nin *S. aureus*'un neden olduğu mastitislerde kullanılabileceği sonucuna varmışlardır. Bakteriyosinlerde *S. aureus* ve *Str.* agalactia'nın neden olduğu mastitislerin tedavisinde kullanılabilir (113).

2.9. *Staphylococcus aureus* Mastitislerinden Korunma Yöntemleri

Mastitis kontrol programları *S. aureus* mastitislerinin oluşumunu ve yayılmasını engelleyebilir. Süt sağım öncesi ve sonrası meme başında kolonize olan *S. aureus*'lar süt sağımından önce ve sonra kullanılan dezenfektanlarla ortadan kaldırılabilir. Kuru dönem tedavisi ve süt sağımı sırasında gerekli hijyenik tedbirlerin alınması mastitis kontrol programlarının hemen tamamında önemli ve etkili iki uygulama olarak karşımıza çıkmaktadır. *Staphylococcus aureus* mastitisli ineklerin sürüden çıkarılması ve sütlerinin sağımının ayrı bir yerde yapılması gerekmektedir. Bu tür önlemlerin olası *S.aureus* mastitislerinin oluşumunu engelleyeceği belirtilmektedir (3). Tüm bu önemli ve etkili tedbirler alınsa da *S.aureus* mastitislerinin önüne kesin olarak geçilmesi çok

zordur (114). Mastitis Kontrol programında yapılması gerekenler aşağıdaki gibi sıralanabilir;

1. Sağım makinelerinin bakımları düzenli olarak yaptırılmalı
2. Teat dipping yapılmalı
3. Kuru dönemin erken evrelerinde ve laktasyonun son dönemlerinde koruyucu antibiyotik kullanılmalı
4. Süt sağımında görevli personelin el temizliğine dikkat edilmeli
5. Sağımdan önce meme başları yıkanmalı
6. Teat dipping yapılan kaplar temizlenmeli
7. Hastalık çıkan inekler uygun şekilde tedavi edilmeli (3,13, 23,41).

Mastitisten korunmak için *S.aureus*'a karşı hazırlanmış aşılar kullanılmaktadır (115,116) *Staphylococcus aureus* için hazırlanan aşıların yararlılığı hakkında farklı bilgiler mevcuttur. Hadimli ve ark. 2005 koyunlarda görülen stafilokokal mastitislere karşı hazırladıkları aşının başarılı sonuç verdiğini ve hijyenik kurallara uyulması halinde bu aşıların mastitisi kontrol altına alabileceğini belirtmişlerdir. Chang 2008 ve ark. Stafilokokal enterotoksin tip C mutant aşının A,B,C ve D tipi enterotoksin salgılayan *S.aureus*'lara karşı etkili olduğunun ve mastitis oluşmasını önlediğini bildirmiştir. Pellegrino ve ark. 2008 Avirülent *S. aureus* suşlarından hazırlanmış aşının önemli ölçüde ve spesifik antikor cevabına neden olduğu ve bu antikorların etkenle karşılaşması durumunda etkili olacağını belirtmişlerdir. Leitner ve ark. 2003 *S. aureus*'a karşı hazırlanmış aşıyı 452 süt ineğinde denediklerini ve kontrol grubu ile aşı yapılan grup arasında önemli bir farka rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Ancak süt kalitesi üzerindeki etkileri göz önüne alındığında aşının yapılması gerektiğini bildirmişlerdir. Aşının etkinliğinin zayıf olduğunu belirten başka çalışmalarda mevcuttur (115). Mastitis oluşumunun önlenebilmesi için beslenmeye de dikkat edilmelidir. Düve ve yaşlı ineklerin ihtiyaç duyduğu besin madde gereksiniminin farklı olduğu göz ardı edilmemelidir. Bazı vitamin ve minarelerin mastitisin engellenmesinde etkili olabileceği

vurgulanmaktadır. Ancak beslenmenin mastitis oluşumu üzerine etkileri hala tam olarak bilinmemektedir (94).

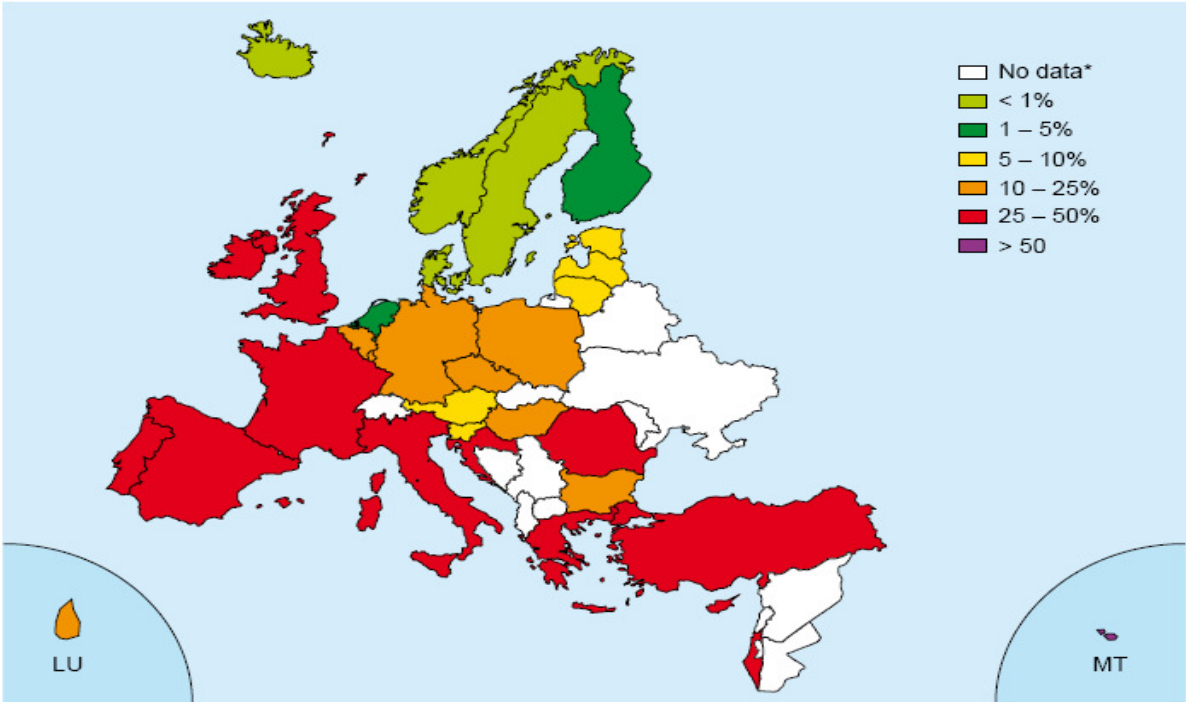
2.10. *Staphylococcus aureus*'da Metisilin Direnci

Staphylococcus aureus sağlıklı insanların derisinde ve üst solunum yollarında kolonize olabilen bir mikroorganizmadır. Tüm dünyada hasta bakım yerleri ile ilgili enfeksiyonların en sık sebebi metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)'lardır (120). Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*'lar hastaların ölümüne yol açtığı gibi hastanede kalış sürelerini de önemli ölçüde uzatmaktadır. Avrupa dışında dünyanın geri kalanlarında da en yaygın gözlenen hastane kaynaklı enfeksiyon MRSA'lardan kaynaklananlardır (121,122).

S.aureus'larda metisilin direncinden *mecA* geni sorumludur. Bu gen beta laktam grubu antibiyotiklere düşük affinite ile bağlanan PBP2a'yı kodlamaktadır. Antibiyotiklerin tedavide kullanılmadığı dönemlerede invazif *S. aureus* infeksiyonları sıklıkla ölümle sonuçlanmaktaydı. Penisilinlerin keşfedilmesi ile *S. aureus*'un neden olduğu enfeksiyonların prognozunda iyileşme kaydedildi. Fakat penisilinlerin klinikte kullanımının başlamasından birkaç yıl sonra penisiline dirençli *S. aureus*'lar ortaya çıkmıştır. Beta laktamaz üreten *S. aureus*'ların farkına varılmasından sonra bu bakteriler için metisilin ve beta laktamaz enziminden etkilenmeyen antibiyotikler geliştirildi. Zamanla metisiline de dirençli suşlar ortaya çıkarak tüm dünyaya yayılmıştır (107,123-126). *Staphylococcus aureus* penisilin grubu antibiyotiklere ilk olarak beta laktamaz adı verilen ve penisilinleri parçalayan bir enzim ile direnç geliştirmiştir. Bu nedenle *S. aureus*'ların salgıladığı β- laktamaza dirençli metisilin gibi birçok antibiyotik geliştirildi. *S. aureus*'un metisiline direnç geliştirmesinde 3 mekanizma tanımlanmaktadır. Bunlar; Beta laktamazın hiper sekresyonu, bakteride normalde var olan penisilin bağlayan proteinlerin yapısında değişiklik ve yeni bir penisilin bağlayan protein sentezlenmesi (PBP-2a)'dir. Klinik izolatlardan birçoğunun son iki mekanizmayı kullandığı belirtilmektedir(127-129). *Staphylococcus aureus*'lar 4 tane PBP taşımaktadır. Bu proteinler sitoplazmik membrana tutunmuştur. Penisilin bağlayan proteinlerin aynı zamanda bakteri hücre duvarında bulunan peptidoglikanın hücre

duvarı ile olan bağlantısını sağlar. Normal penisilin bağlayan proteinler serin proteaz aktivitesine ve yüksek beta laktam affinitesine sahiptir. Beta laktam grubu antibiyotikler bu proteinlere bağlandığında PBP' ler hücre duvarına bağlanamaz. Bu durum bakterinin hücre duvar yapısının bozulmasına ve ölmesine neden olur. Bununla beraber PBP-2 penisilin bağlayan protein ailesinin intrinsik bir elemanı değildir. Penisilin bağlayan protein 2 indüklenebilir ve sonradan sentezlenen 70kDa ağırlığında bir proteindir. Penisilin bağlayan protein 2 sadece metisilin dirençli *S. aureus*'lar tarafından sentezlenmektedir. Penisilin bağlayan protein 2'ya sahip *S. aureus*'lar aynı zamanda penisilin, sefalosporin, betalaktam/betalaktamaz inhibitör kombinasyonuna, monobaktamlara ve karbapenemlere de dirençlidir (130,131). Penisilin bağlayan protein 2 *mecA* geni tarafından kodlanmaktadır. Bu genin farklı türdeki bakteriler tarafından *S. aureus*'a aktarıldığı sanılmaktadır. Ancak bu bilgi kesinleştirilememiştir (130,132). Bunun nedeni MRSA'lar ile uzaktan ilişkili bazı *S. aureus*'larda da bu geninin tespit edilmesidir. *MecA* sekansı ilk olarak 1987 yılında tanımlanmıştır (133). Günümüzde bu gen bölgesinin SHS*mec* olarak bilinen hareketli bir genetik element tarafından taşındığı bulunmuştur. (134). SHS*mec*'in *mecA* dışında regültör gen bölgeleride taşıdığı bilinmektedir. Bu bölgeler IS431mec ve *ccr*'dir. IS431mec ve *ccr* SHS*mec*'in integrasyonundan ve eksizyonundan sorumludur (135). *Mec* gen bölgesi dört grup altında incelenmektedir. *Ccr* gen kompleksi ise 3 allotipe sahiptir. *Mec* ve *ccr* gen kompleksine göre SHS*mec* dörde ayrılmaktadır (SHS*mec* tip I–IV). Avusturalyada izole edilen MRSA'lardan biri tip V olarak adlandırılmıştır (132). Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*'lar bakteriyemi, pnömoni, cerrahi infeksiyonlar ve nazokomial infeksiyonlara neden olmaktadır. Amerika Birleşik Devletlerinde bulunan hastalıkları önleme ve kontrol merkezlerinin verilerine göre sağlık kuruluşlarında meydana gelen *S.aureus* infeksiyonlarının %59.5'inin MRSA'lardan kaynaklandığı belirtilmektedir(136). Antimikrobiyal sürvelans programı tüm dünyada yoğun bakım ünitelerinde MRSA vakalarının arttığını belirtmektedir(137). Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*'ların patojenitesi ve virülansı ürettikleri veya sahip oldukları enterotoksinler (A dan Q ya kadar), toksik şok sendrom toksin-1, alfa-beta hemolizin, eksfoliatif toksin, Panton Valentin toksin, protein A ve çeşitli enzimlere bağlıdır(138,139). Son yıllarda izole edilen MRSA'ların virülensinin arttığı belirtilmektedir. Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*'lar arasında toksik şok sendroma neden olan etkenlerin sayısı artmaktadır. Metisilin dirençli *Staphylococcus*

aureus'lar arasında sayısı hızla artan ve önemli bir virülans faktörü de Panton-Valentin toksinidir. Bu toksin etkisini konak hücre membranını eriterek göstermektedir. Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* ile enfekte olmuş hastalarda nekrotizan pnömoni ve nekrotizan kutanöz infeksiyonlara neden olur (140,141,142). Juhász-Kaszanyitzky 2007 yaptıkları çalışmada MRSA'ların süt sığırlarından insanlara ve insanlardan süt sığırlarına geçebileceğini belirtmişlerdir. Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*'ların sığır mastitislerinin dışında köpek ve atların lezyonlu bölgelerinden de izole edilebildiği ayrıca köpeklerin taşıyıcı olabileceğini belirtilmektedir (144). Hayvanlardan insanlara bulaşan MRSA vakaları bildirilmiştir (145) Strommenger ve ark. 2006 Pet hayvanlarının değişik enfeksiyonlarından izole ettikleri MRSA'ların aynı bölgede bulunan hastanelerden izole ettikleri MRSA'lara benzediğini belirtmişlerdir. Aynı çalışmada MRSA'ların pet hayvanları ve insanlar arasında çapraz kontaminasyona neden olabileceği belirtilmektedir. Avrupa Hastalıkları Önleme ve Kontrol Merkezi Metisilin direncinin Avrupadaki yayılımı hakkında yaptığı çalışmanın sonucu Şekil 2.1'de gösterilmeiştir. Aynı çalışmada komite 31 Avrupa ülkesinde izole edilen 31.591 invazif *S.aureus* izolatından 7.115'inin metisilin direncine sahip olduklarını bildirmişlerdir(108).



Şekil 2.1 2007 yılında Avrupada İnvazif *S.aureus* İzolatları İçerisinde Oksasilin Direncine Sahip Suşların Oranı (108)

2.11. Oksasilin (Metisilin) Direncinin Belirlenmesi

Günümüzde klinik ve laboratuar standartlar enstitüsü olarak adlandırılan ancak önceleri ulusal klinik ve laboratuvar standartları birliği olarak bilinen kuruluş MRSA'ların tespit edilmesi için birkaç standartize metod tavsiye etmiştir. Bu yöntemler arasında broth ve agar dilusyon, disk difüzyon ve agar görüntüleme metodları bulunmaktadır. Yukarıda bahsedilen bütün testler inkübasyon peryoduna ve belirli bir ısı değerine ihtiyaç duyar. Genellikle 35 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra değerlendirilmektedir (147).

MRSA'ların belirlenmesinde kullanılan yöntemler:

1- Disk Diffusion

2- E test

3- Broth Dilusyon yöntemleri (Makrodilusyon ve Mikrodilusyon)

4- Agar Dilusyon

5- Agar Görüntüleme

Disk difüzyon, broth mikrodilusyon gibi yöntemler için saf olarak üretilmiş MRSA'lara ihtiyaç vardır. *Stahpylococcus aureus*'ların sahip olduğu metisilin direncinin hızlı ve doğru belirlenmesi hem hasta için hem de bu etkenlerin yayılmalarının önüne etkin bir şekilde geçebilmesi için gereklidir. Son yıllarda *mec*A ve PBP2a 'yı hızlı teşhis edebilen bazı ticari kitler piyasaya sürülmüştür (148,149). Bu kitlerden bazıları klinik laboratuvarlarında kullanılmaktadır. Real time PCR ve diğer moleküler yöntemler MRSA'ların belirlenmesinde giderek popüler hale gelmektedir. Bu yönmtemler sayesinde nazokomial enfeksiyon riski azaltılmış olacaktır (150,151). Genetik tabanlı tanı yöntemler izolatların epidemiyoloji hakkında önemli bilgiler vermektedir. Bu durum klinikte yatan hastalar için ve enfeksiyon laboratuvarları için çok önemlidir. Bu teknikler sayesinde hastalardan izole edilen MRSA'ların tek tip olup olmadığı anlaşılacaktır. (152). Kliniklerde bu bilgiler ışığında hastadaki enfeksiyon tablosunun relapsdan mı yoksa reenfeksiyondan mı kaynaklandığı daha net anlaşılabilecektir. Günümüzde birçok klinik mikrobiyolog bakteriyofajla tipleme, serolojik yöntemler, antibiyotik duyarlılık testleri gibi fenotipik yöntemlerle MRSA'ları tiplendirmeye çalışmaktadır. Bununla birlikte MRSA'ların ayrımında antibiyotik duyarlılık testlerinin kullanılması güvenilir sonuçlar vermemektedir. Bunun nedeni MRSA'ların birçok antibiyotik grubuna dirençli olmasıdır. Bu metodlar birbirleri ile ilişkisi olan ve olmayan suşları ayırt etmekte yetersiz kalır. Fenotipik yöntemlerin ayırt ediciliklerinin düşük olması sebebiyle genotiplendirme ve DNA-tabanlı tiplendirme metodları kullanılmaya başlamıştır (148,149,150,151,152).

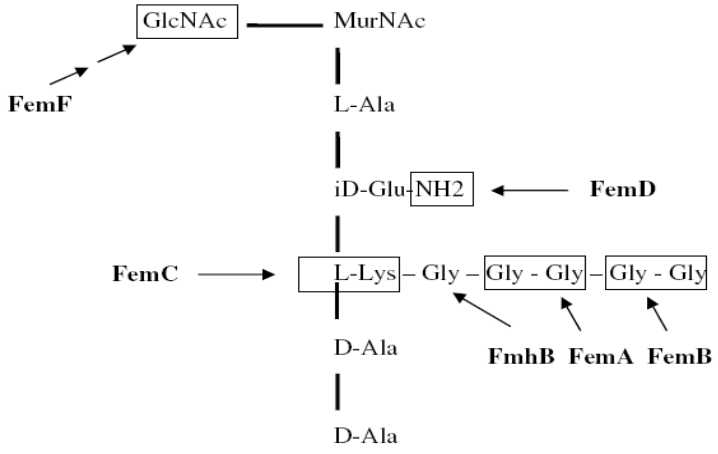
2.12. Stafilokoklarda *fem* Geni

Penisilin bağlayan protein 2 seviyeleri direnç seviyesiyle doğrudan ilişkili değildir. Bu durum metisilin direncinde etkili olan diğer faktörlerin araştırılmasına neden olmuştur (153,154,155). Kromozomal genlerin transpozon kaynaklı insersiyonal inaktivasyonu metisilin direncinden sorumlu birden fazla faktörün olduğunu belirtmektedir (155-156). *Staphylococcus aureus*'larda görülen direncin kompleks bir mekanizmayla meydana geldiği ve *aux*(auxillary), *fem*(factors essential for the expression of methicillin resistance) genlerinin bu olayda rol oynadığı belirtilmektedir(157). *Fem* geni *S.aureus*'un tüm genomu boyunca bulunur. Bu gen maksimum direnç için gereklidir (153,156,157,159). Yirmiden fazla *fem* geni tanımlanmıştır. *Fem* geni hem MRSA'larda hemde MSSA'larda bulunmaktadır. Bu genler peptidoglikan sentezinde ve geri dönüşümünde farklı aşamaları katalizleyen enzimleri düzenlemektedir. Bununla birlikte hiç birisi PBP2a ekspresyonunda etkili değildir (154). Hücre duvar prekürsörlerinin sentezinde görev alan *fem* genlerinin inaktivasyonu sonucu *S. aureus*'larda metisilin direnci azalmaktadır. Birçok *fem* geninin kodladığı proteinlerin görevi hala bilinmemektedir (160). Metisilin direncinde oldukça etkili olan genler *fmhB, femA* ve *femB* stafilokokal peptidoglikanın yapısında bulunan pentaglisin köprülerinin oluşumunu sağlamaktadır (153,161,162,163,164). *FmhB* pentaglisin köprüsündeki birinci glisin rezidülerinin inkorporasyonundan sorumludur. *FemA ve FemB* 2.-3. ve 4.-5. glisin rezidülerinin pentaglisin köprülerine eklenmesinden sorumludur (153,161, 165). Pentaglisin köprüleri PBP2a kaynaklı direncin ortaya çıkması için gereklidir. Bu köprüler beta laktam antibiyotiklere ve diğer antibiyotiklere karşı hiperduyarlılığa neden olabilen PBP2a'nın uzunluğunu değiştirerek etki eder. Antibiyotik direncinin oluşmasında *fmhB*'ninde önemli rolü vardır. *FmhB*'nin *S.aureus*'larda inaktivasyonu bakterilerin ölümüne neden olmaktadır (163). *FemC* geninin inaktive edilmesi metisilin direncinin bazal seviyesini azaltır. Ancak bu bakterilerden oluşan subgruplarda yüksek düzeyde metisilin direnci mevcuttur. *FemC* geninde meydana gelecek bir mutasyon glutamin üretimini bloke ederek izoglutamatın amidasyonunu azaltır. *Fem* genlerinin fonksiyonları ve metisilin direncindeki görevleri tablo 2. 6'da görülmektedir. Buna bağlı olarak peptidoglikan yapısındaki bağlantılar azalır ve peptidoglikan kompozisyonu bozulur (153,161). *FemD* ise gluzamin-6-fosfatın glukozamin-1 fosfata

çevrilmesinde görev alır. Bu basamak peptidoglikan prekürsörlerinin oluşumunda anahtar rol oynamaktadır (166). *FemD* geninin inhibisyonu metisilin direncinin azalmasına neden olur (167,168). Peptidoglikan prekürsörlerinin oluşumuna *fem* geninin etkisi şekil 2.2'de gösterilmiştir.

Tablo 2.6. Metisilin Direncinden Sorumlu Bazı Kromozomal Faktörler(160)

Gen	Fonksiyon	Metisilin Direncindeki Görevi
fmhB	Peptidoglikan yapısında bulunan pentaglisin köprüsüne birinci glisinin ilavesinde görevlidir.	İnaktivasyonu bakterinin ölümüne neden olur.
femA	Peptidoglikan yapısında bulunan pentaglisin köprüsüne 2. ve 3.glisinin ilavesinde görevlidir.	Mutantları metisiline duyarlıdır.
femB	Peptidoglikan yapısında bulunan pentaglisin köprüsüne 4. ve 5.glisinin ilavesinde görevlidir.	İnaktivasyonu metisilin direncini azaltır.
femC	Glutamin sentezinin represörüdür.	İnaktivasyonu metisilin direncini azaltır.
femD	Prekürsör formasyonu için fosfoglukozamin mutaz hayati role sahiptir.	İnaktivasyonu metisilin direncini azaltır.
femF	Peptidoglikan içersindeki lizinin eklenmesi	İnaktivasyonu metisilin direncini azaltır.
lytH	Otolitik enzim	İnaktivasyonu metisilin direncini azaltır.



Sekil 2.2. Peptidoglikan prekürsörlerinin oluşumuna *Fem* geninin etkisi (160)

2.13. *Staphylococcus aureus*'ların Önemli Virülens Faktörleri:

Staphylococcus aureus'un virülans faktörleri hücre duvar elemanları ve ekstrasellüler toksin ve enzimler olarak ikiye ayrılmaktadır. Ancak bu sınıflandırma dışında kalan virülens faktörleride vardır. *Staphylococcus aureus* virülans faktörlerinden hiçbiri tek başına hastalık oluşturma yeteneğine sahip değildir. Stafilokoklar hastalık oluşumunu kolaylaştıran birçok virülans faktörüne sahiptir. Bu virülens faktörlerinden sınıflandırılması tablo 2. 7'de görülmektedir. Virülans faktörlerinin tanımlanmasında farklı görüşler mevcuttur. Bazı araştırmacılar virülans faktörlerinin bakterinin invitro üreyebilmesi için gerekli olduğunu bu nedenle bakterinin yaşaması için hayati önem taşımadığını belirtmektedir. Ancak bu görüşün tam tersini savunan bilim adamları virülans faktörünü; saflaştırıldığında ve in-vitro deneme hayvanlarına verildiğinde patojenik etki oluşturan maddeler olarak tanımlamaktadır. Bu tanımın bakterilerin sahip olduğu tüm virülans faktörlerini içermediği görülmüştür. Bakterilerin salgıladığı hyalurinidaz, proteaz, lipaz gibi enzimlerin dışında kalan virülans faktörleri bu tanımın dışında kalmaktadır. Bu nedenle virülans faktörünün daha geniş bir tanımının yapılması ihtiyacı ortaya çıktı. Bu yeni tanımlamada virülan faktörü bakterinin çoğalması ve canlılığını sürdürebilmesi için gerekli veya yararlı olan, hastalık oluşturacağı

organizmada non simbiyotik olarak yaşamasını sağlayacak faktörler olarak tanımlanmaktadır (169).

Tablo 2.7. *S.aureus*'un sahip olduğu virülens faktörlerinin sınıflandırılması(169)

Hücre duvar elemanları	Ekstrasellüler toksin ve enzimler	Diğer
Kümeleştirici faktör A	PTSAg Ailesi	Biofilm
	Stafilokokal enterotoksinler(A-E, H)	
	Toksik şok sendrom toksin - 1	
Kümeleştirici faktör B	Eksfoliatif toksin A-B	
Koagulaz	Lipaz	
FibA protein	V8 proteaz	
Fibronektin bağlayıcı protein A	Panton valentin lökosidin	
Fibronektin bağlayıcı protein B	Stafilokinaz	
Kollajen bağlayan protein	Alfa hemolizin	
Elastin bağlayan protein	Beta hemolizin	
MHC analog protein	Gama hemolizin	
Polisakkarit intrasellüler adhezin	Delata hemolizin	
Protein A	Fosfolipaz	
Kapsüler polisakkarit	Hyaluronidaz	
	Elastaz	

Staphylococcus aureus'un virulans faktörlerinin bilinmesi hastalığın patogenezinin daha iyi anlaşılması ve daha etkin tedavi uygulanabilmesi için oldukça önemlidir. *S. aureus*'un sahip olduğu bazı virülans faktörlerinin salınımının bakterinin üreme

dönemine göre değişkenlik gösterdiği belirtilmektedir. Büyüme fazının virülans faktörlerinin salınımı üzerine olan etkisi tablo 2.8'da gösterilmektedir

Tablo 2.8. Bazı virülens faktörleri ve salındıkları büyüme fazları (170)

Logaritmik büyüme fazı	Post-Eksponensiyal dönem	Durağan dönem
Koagulaz	Alfa hemolizin	Enterotoksin A
Protein A	Beta hemolizin	
Clumping faktör	Delta hemolizin	
Fibronektin	Gama hemolizin-Panton	
	Eksfoliatif toksin A-B	
	V8 proteaz	
	Hyolurinidaz liyaz	
	Lipaz	
	Kapsüler polisakkarit	

Mastitis etiyolojisinde rol oynayan *S. aureus*'ların farklı virülans faktörlerinin hastalık oluşumunda rol oynadığı belirlenmiştir (171)**.** Mastitislerden izole edilen *S.aureus*'ların sahip olduğu virülans faktörleri ve bunların klinik önemi izolatlar arasında değişkenlik göstermektedir. Bu nedenle mastitis etiyolojisinde rol oynayan *S.aureus*'un mastitis için spesifik olan bir virülans faktörü veya geninden söz etmek mümkün değildir (172).

2.13.1. Hücre Duvar Yapısında Bulunan Virülans Faktörleri

2.13.1.1. Kapsüler polisakkart(CPs):

Klinik izolatlardan izole edilen *S. aureus*'ların birçoğunda kapsüler polisakkariti (CP) vardır. Ancak bu kapsüller mikrokapsül olarak kabul edilir. Kapsül yapısı diğerler bakterilerde bulunanlardan farklı olarak ışık mikroskobunda görülemez yalnızca elektron mikroskobunda görülür. Etkenler özellikle invivo ortamda bu özelliklerini

belirgin şekilde ön plana çıkarırlar (173). Kapsüler polisakkarit, *S. aureus*'un hücre duvarını saran karbonhidrat polimerlerine denir. Hastalardan izole edilmiş *S. aureus*'ların % 76-90'ında kapsüler polisakkarit vardır. *Staphylococcus aureus*'lar kapsüler polisakkarit yapılarına göre 11 tipe ayrılmaktadır. Kapsüler polisakkarit tipleri arasında CP1 ve CP2 opsonizan antikorları etkileyerek fagositoza karşı korumaktadır. Bununla birlikte CP1 ve CP2 tipi kapsüler polisakkaritler nadiren tespit edilmektedir. Bunun nedeni bakterilerin yüzeylerinde bulunabilen fibronektin ve kollagen bağlayan proteinlerin kapsüler polisakkaritlerin üzerini kapatmasıdır. Bu proteinlerin CPs'lerin eksprasyonunu engellediği düşünülmektedir. Kapsüler polisakkaritin hücre yüzey proteinleri ile engellenmesi etkenin hastalık oluşturabilme yeteneğini etkilemektedir. CP5 ve CP8 tipi küçük miktarlarda sentezlenmektedir. Bu nedenle bu tipler mikroenkapsüle tipler olarak adlandırılmaktadır. Hayvanlardan izole edilen *S. aureus*'larda CP5 ve CP8 tiplerinin varlığının bölgesel farklılıklar gösterdiği belirtilmektedir. Mastitisli sütün içerisinde bulunan *S.aureus*'larda kapsüler polisakkarit seviyesinin arttığı tespit edilmiştir (174,175). Kapsüler polisakkaritlerin antikor ve kompleman bağlı opsonizasyonu engellediği ve fagositozu inhibe ettiği belirtilmektedir. Kapsüler polisakkarite karşı oluşmuş antikorlar etkenini fagozitozunu kolaylaştırmaktadır. Ayrıca kapsüler polisakkaritlere karşı hazırlanmış aşının inekleri *S. aureus* infeksiyonlarına karşı koruduğu gösterilmiştir. Kapsüler polisakkaritlere karşı hazırlanmış aşıların bakterilerin yüzeyinde bulunan ve yapışmadan sorumlu elemanlarını inhibe ederek konak hücre ve dokularına tutunmayı inhibe ettiği ve *S. aureus*'un hastalık yapma yeteneğini azaltacağı belirtilmektedir (176).

2.13.1.2. Protein A :

Staphylococcus aureus 'un yüzeyinde bulunur ve IgG'lerin Fc kısımlarına yapışır. Yüzey proteinleridir. Etken bu protein sayesinde serumdaki opsonizasyonu ve fagositozu önlemiş olur. Protein A'ları uzaklaştırılmış mutant *S. aureus*'ların invitro ortamda fagositoza daha duyrarlı olduğu ve etkenin hastalık yapabilme yeteneğinin azaldığı görülmüşütür (177).

2.13.1.3. Koagulaz ve Pıhtılaştırma Faktörleri:

Koagulaz ekstrasellüler bir proteindir. Bu protein konaktaki protrombin ile birleşerek staphylotrombin oluşmasına neden olur. Trombinin proteaz aktivitesi bu birleşme kompleksi sayesinde aktif hale gelir buna bağlı olarak fibrinojen fibrine dönüşür. Bu olay *S.aureus*'ların neden olduğu hastalıklarda büyük önem kazanmaktadır. Etken bu sayede antibiyotiklerden ve fagositozdan kaçabilmektedir. *Staphylococcus aureus* mastitislerinin tedavisinde karşılaşılan temel güçlüklerde yine bu nedenle ortaya çıkar. *Staphylococcus aureus*'ların bu özelliğinden faydalanılarak koagulaz testi yapılır ve bu virulans faktörünü taşıyıp taşımadığına bakılır. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında *S. aureus*'un identifikasyonunda sıklıkla kullanılan testlerden biridir. Sadece bu teste bakılarak bu virülans faktörünün varlığına veya yokluğuna karar verilememektedir. Günümüzde hala *S. aureus*'ların koagulaz, pıhtılaştırma faktörleri ve fibrinojen bağlayan determinantlarla ilgili çalışmalar devam etmektedir. Bununla birlikte yapılan moleküler çalışmalar pıhtılaşma faktörü ile koagulazın birbirinden ayrı iki farklı virulans faktörü olduğunu ortaya çıkartmıştır. Koagulaz'dan yoksun mutant *S. aureus*'ların pıhtılaştırma işlevine devam ettiği bilinmektedir (82-84,178).

2.13.2.Ekstrasellüler toksin ve enzimler

2.13.2.1. PTSAg ailesi:

PTSAg *S. aureus* ve *S. pyogenes* tarafından salgılanan ekzotoksin grubunun genel adıdır (179)**.** Bu iki bakteriye ait ekzotoksinler çok önemli biyolojik karekterleri benzeştiği için aynı gruplandırma içinde yer almaktadır (180,181)**.** PTSAg grubu içinde *S. aureus*'larda bulunan TSST-1, Stafilokokal enterotoksinler (SEs) dışında artık streptekokal pirojenik ekzotoksinlerde (*SPe-a, b, c, d, e, f, g, h* ve *j* ve streptekokal süperantijenler) bulunmaktadır (181,183)**.** Stafilokokal PTSAgs'lar fonksiyonel benzerliklerine ilave olarak genetik ve biyokimyasal benzerliklerede sahiptir. *Staphylococcus.aureus*'ların salgıladıkları diğer proteinler gibi PTSAg'lerde *S.aureus'*ların üreme döneminde ortaya çıkar. Bu toksinler için gerekli olan genler

plazmidler, bakteriyofajlar veya patojenite adaları olarak tanımlanan alanlarda taşınırlar (181-184).

2.13.2.1.1. TSST-1 :

Bu toksinin kodlandığı gen bölgesi bakterinin kromozomunda mobil bir genetik element olarak bulunur (179,181). Bu protein başta 234 aminoasit tarafından prekürsör protein olarak sentezlenir. Daha sonra bir parçalanma geçirerek 40 aminoasitli bir yapıya dönüşür. Olgun bir TSST-1 22.000 Kda ağırlığında izoelektrik noktası 7.2 olan tek bir polipeptid zincirden oluşur. TSST-1 hidrofobik aminoasite sahiptir. Bu aminoasitler suda çözünmeye karşı oldukça dirençlidir. Yapılan analizlerde TSST-1 içinde hiç sistein kalıntısına rastlanmamıştır. Bu toksin aynı zamanda ısıya ve proteolizise oldukça dayanıklıdır. Toksik şok sendrom toksini bir saat süresince kaynatıldığında biyolojik aktivitesinin etkilenmediği bilinmektedir. Ayrıca tripsin ile çok uzun süren muamele görmediği taktirde bu toksinin parçalanmadığı saptanmıştır (185). Sığır mastitislerinde TSST-1 varlığının araştırılması için değişik çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda sığır mastitislerinden izole edilen etkenlerde TSST-1'i kodlayan gen bölgelerinin varlığını gösterilmiştir (186, 187).

2.13.2.1.2. Stafilokokal Enterotoksinler

Toplam 8 adet SEs vardır. Bunlar *sea* (Stafilokokal enterotoksin A), *seb, sec, sed, see, seg, seh*, *seı ve sej*'dir. Enterotoksinlerin hemen hemen tamamı gastroenterite ve kusmaya neden olur(186). Ayrıca süperantijenite yeteneğine sahiptirler. Isıya ve pepsin enziminin sindirici etkisine karşı orta derecede dayanabilirler (188-190). Moleküler yöntemlerin geliştirilmesiyle birlikte staphylococcal enterotoksinlerin bazı yeni özellikleri keşfedilmiştir. Örneğin; *seb* ve *sec*'nin nonmenstural dönemde kadınlarda TSS (toksik şok sendromu)'na neden olduğu, ve enterotoksinlerden birçoğunun immunomodülatör göreve sahip olduğu görülmüştür. Moleküler çalışmalar sonucunda enterotoksinlerin her birinin ayrı ayrı gen bölgeleri tarafından determine edildiği gösterilmiştir. Stafilokokal Enterotoksinlerin yapıları TSST-1 ile yapısal benzerlikler

saptanmasına karşın enterotoksinlerin yapılan protein sekans analizinde temel farklılıklara rastlanmıştır. Stafilokokal Enterotoksinlerin TSST-1'lerden daha kompleks bir yapıya sahip olduğu görülmüştür. Stafilokokal Enterotoksinlerin aminoterminal uçlarının uzunluğu daha fazadır, bu kısımda ikincil bir α heliks vardır **.** Stafilokokal Enterotoksinlerin daha kompleks bir yapıya sahip olması gastrointestinal bölgeden parçalanmadan geçebilmelerini sağlamaktadır (191,192). Kenny ve ark . 1992 ve ark. Yaptıkları çalışmada sığır mastitislerinden izole ettikleri 262 *S. aureus* suşunun % 28.6' sının enterotoksijenik olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada enterotokin üretemeyen suşlarında mastitis yapabileceği sonucuna varmışlardır. Akineden ve ark. 2001 sığır mastitslerinden izole ettikleri 103 etkende moleküler yöntemlerle yaptıkları incelemede farklı enterotoksin genlerinin varlığını göstermişlerdir. Boynukara ve ark 2009 subklinik mastitisli ineklerden izole ettikleri *S. aureus*'lardan % 25.5' inin enterotoksijenik olduğunu ve en fazla sea'nın varlığının tespit edildiğini bildirmişlerdir.

2.13.2.2. Eksfoliatif toksin

İnsan kaynaklı suşların yaklaşık % 5'i eksfoliatif toksin üretmektedir. Özellikle yeni doğan ve genç çocuklarda bülloz impetigo ve bunun generalize formu stafilokokal scaled-skin syndrome (SSSS)'a neden olmaktadır (194,195)**.** Bu toksin farelerde deride yanık benzeri lezyonların oluşmasına ve derinin epidermis tabakasının kaybolmasına neden olur (196)**.** Antijenik olarak birbirinden farklı üç izoformu tespit edilmiştir (ETA, ETB, ETD). En sık rastlanılan türü ETA ve ETB'dir (197, 198)**.** Dödrdüncü tür eksfoliatif toksin olan ETC atlardan izole edilmiştir. Ancak bu toksinin insanlardaki etkisi ve genetik karekterizasyonu tam olarak belirlenememiştir (199)**.** ETA profaj üzerine kodlanmıştır (200, 201)**.** Buna karşın ETB plazmit üzerinde bulunur (202,203)**.** ETD ise 14.8-kb etd patojenite adası üzerine lokalizedir (204) Toksinin glutamat spesifik proteaz aktivitesi vardır. Bu etkisi sayesinde ekstrasellüler ortamda bulunan desmogleinleri parçalamaktadır. Bu aktivite şu ana kadar farelerde ve insanlarda gösterilebilmiştir (205,206)**.** Hastanelerde epidermolitik infeksiyonların kontrol altına alınabilmesi ve epidemiyolojik sürvelans için eksfoliatif toksin üreten *S. aureus*'ların tanısının hızlı ve doğru konulması önemlidir. ET- üreten *S. aureus*'ların tanısı önceleri kültür süpernatantından immunolojik olarak toksinlerin belirlenmesi ile konulmaktaydı.

Ancak bu metod için ortamda tespit edilebilecek kadar toksin olmalıdır (207). Ancak PZR gibi moleküler yöntemlerde ET spesifik primerler kullanıldığı için fenotipik yöntemlere oranla daha doğru sonuç elde edilmektedir (208).

2.13.2.3. Hemolizinler

Stafilokok' lar kendilerini konağa daha kolay adapte edebilmek ve memeli hayvanlarda hastalık oluşturabilmek için birbirinden farklı birçok ekzotoksin salgılar (179). Bunların içinde hemolizinler (alfa, beta,gama ve delta), nükleaz, proteaz, lipaz, hiyolarunidaz, proteinazlar vardır. Bu ekzotoksinlerin başlıca görevi konağa ait dokulara zarar vererek kendisi için besin kaynağı oluşturmaktır. (180,181). Hemolizinler kendi içerisinde alfa, beta, gama ve delta olmak üzere 4 gruba ayrılmaktadır (178).

2.13.2.3.1. Alfa hemolizin:

Staphylococus aureus'ların birçoğu bu toksini salgılar. Hemolizinler içerisinde en iyi alfa hemolizinler (α- hemolizin) incelenmiştir. Bu toksin memeli hücrelerinin çoğunda toksik etkiye sahiptir. Alfa hemolizin özellikle tavşan eritrositlerini hemoliz etmektedir. Nörotoksik ve dermatonekrotik etkiye sahiptir (178). 1µg α- hemolizin İntravenöz olarak tavşanlara verildiğinde tavşanların ölümüne neden olmaktadır (209). Bu toksin aksesör gen regülatörü (*agr*) tarafından kontrol edilmektedir. Salınımlarını kontrol eden bir başka gen bölgesi ise *hla'*dır. Batch(yığın) kültürlerde üreme fazında salgılanırlar. Bazı *S. aureus*'ların *hla* bölgesine sahip olduğu ancak bu toksini üretemediği gözlenmiştir. Bu olay daha çok TSS hastalarından izole edilen *S.aureus*'larda gözlenmektedir. Ancak bu durumunda istisnaları vardır. Toksik şok sendromlu hastalardan izole edilen *S. aureus*'ların bazılarında bu toksinin salgılandığı görülmüştür. Bunun nedeni protein bölgesine gözlenen mutasyonlardır. Alfa hemolizin'ler Birçok sistem üzerinde yıkılmayıcı etkiye sahiptir. *Staphylococus aureus*'lar neden olduğu birçok hastalığa zemin hazırlar. Bu toksin; memeli hücreleri üzerinde iyon değişimini geri dönüşümsüz olarak değiştirir. Endotel hücrelerinin hücre membranındaki Ca^{++} geçiş dengesini bozar. Buna bağlı olarak aşırı Ca^{++} geçişi olur ve aşırı derecede

araşidonik asit salgılanmasına neden olur. Tromboksan ve prostasiklin üretimini indükler. Tromboksan salgısının artışı ile vazokonstrüksiyon şekillenir, ozmotik basıncın artması ile hücreler arasındaki bağlantı kopar. Bu toksin pulmoner ödem ve respiratorik distress oluşmasına neden olur. Alfa hemolizinler kan hücrelerine de etki ederek hücre içine Ca^{++} girişine neden olur ve prokoagulasyon faktörlerinin salınmasına neden olur. Pulmoner ödem oluşturmasındaki en önemli neden hücreler tarafından salgılanan ATP'nin salınımındaki azalmadır (178). Akineden ve ark 2001 sığır mastitislerinden izole edilen 103 suşun kültürlerinden 25'inde α hemoliz gördüklerini bildirmişlerdir.

2.13.2.3.2. Beta hemolizinler (β hemolizinler):

Staphylococus aureus'ların beta hemolizi ilk olarak Glenny ve arkadaşları tarafından 1935 yılında tespit edilmiştir. Beta hemolizin tavşanlardan ziyade koyun eritrositleri üzerine etki gösterir. Beta hemolizinler besiyerine ekzotoksin olarak salgılanırlar. Molekül ağırlığı 35.000 Kda'dır. Beta hemolizinler daha çok hayvan kökenli *S. aureus'*lardan ekstrakte edilir (210)**.** Diğer ekzotoksinlerde olduğu gibi beta hemolizinler de üreme fazında salgılanırlar. Beta hemolizinlerin saf olarak elde edilmesi için uzun süreden beri çalışmalar devam etmektedir. Bu amaçla jel filtrasyon, presipitasyon, iyon değişim kromatografisi, jel elektroforez, izoelektirik fokuslama yöntemleri kullanılmaktadır. İzoelektrik fokuslama yöntemi ile 10-15 kat daha fazla toksin elde edilebilir. Beta hemolizinlerin 1963 yılında fosfolipaz c enzim aktivitesine sahip olduğu anlaşılmıştır. Bu varlığın ortaya çıkması için ortamda Mg^{++} iyon konsantrasyonu olmalıdır. Bu aktivite sfingomyelin ve lizo-fosfatidilkolin için geçerlidir. Bu toksinin *S. aureus*'ların üremesini kolaylaştırdığı gözlenmiştir. *S.aureus'*ların bu toksininden yararlanılarak yapılan CAMP testi mikrobiyoloji laboratuarlarında tanı amaçlı kullanılmaktadır (178). Akineden ve ark 2001 sığır mastitislerinden izole ettikleri 103 suşun 50 tanesinin kültüründe beta hemolize rastladıklarını bildirmişlerdir

2.13.2.3.3. Gama hemolizin- PV- lökosidin:

Staphylococcus aureus'lar tarafından sentezlenen iki tip biokomponent yapısında toksin vardır. Bunlar gama hemolizin ve PV–lökosidin'dir. Bu nedenle bu toksinler aynı grup içinde değerlendirilmektedir. Bu proteinler birbirlerinden bağımsız olarak sentezlenir. Her ikiside iki farklı fragmentin bir araya gelmesiyle oluşur. Bunlar S(slow) ve F(fast) kısımlarıdır. Gama hemolizinler *S. aureus*'ların hemen hemen bütün türleri tarafından sentezlenir. Her iki toksinde nötrofil ve makrofajlar üzerine etkilidir. Diğer hemolizin toksinlerinin aksine gama hemolizini agarda görmek mümkün değildir. Bunun nedeni; gama hemolizinin agar tarafından inhibe edilmesidir. Bu toksinlerin biyokimyasal ve fizikokimyasal özellikleri üzerinde çalışmalar devam etmektedir (189). Gama hemolizin toksini PV lökosidine oranla yangısal mediatörleri daha az uyarır. PV lökosidin polimorf nükleer lökositlerdeki granüllerin sayısının artmasına ve yangısal mediatörlerin salınmasına neden olur (189,190).

2.13.2.3.4. Delta hemolizin:

Delta hemolizin; 26 aminoasite sahip polipeptid yapıdadır. Memeli hücrelerin birçoğuna zarar verir. İnsanlardan izole edilen *S. aureus'*lardaki delta toksinin köpeklerden elde edilen toksinle karşılaştırıldığında 9 farklı aminoasite sahip olduğu görülmüştür. Bu toksin *S. aureus'*ların yaklaşık % 97'si tarafından sentezlenir. Delta hemolizin *hld* ile gösterilen gen bölgesi ile determine edilmektedir (177). Delta toksinin memeli hücrelerine karşı toksik etkiye sahip oduğu bilinmektedir ancak hastalık oluştururken bu özelliğinin dışında hangi genlerin rol oynadığı tam olarak bilinmemektedir. Buna ilave olarak bu toksin hücreler arasındaki bağında kopmasına neden olur. Hücre organelleri, siferoblastlar ve protoplastlar üzerinede etkilidir ve dermatonekrotik etkinliğide bilinmektedir. Yüksek dozda laboratuvar hayvanlarına verildiğinde ölüme yol açabilir. Ancak fosfolipit varlığında delta hemoliz aktivitesi azalır (211).

2.13.2.4. Staphylokinaz:

Staphylococcus aureus'un birçok suşu plazminojen aktivatörü olarak bilinen staphylokinaza sahiptir. Bu faktör fibrinin lizizisine neden olur. Genetik determinantı lizojenik bakteriyofajla beraberdir. Staphylokinaz ve plazminojen gen aktivitesine bağlı olarak fibrin pıhtısının çözünmesine neden olur. Bu mekanizma staphylokinaz için karakteristiktir. Bu enzim aynı zamanıda koroner kalp damarlarının trombozisinde pıhtının eritilmesinde kullanılmaktadır. Koagulazda olduğu gibi staphylokinazında virülans faktörü olup olmadığı konusunda tartışmalar devam etmektedir. Ancak fibrini eriterek bakterilerin yayılmasınını kolaylaştırdığından virülans faktörleri içerisinde sayılmaktadır (192).

2.13.2.5. Diğer Ekstrasellüler Enzimler: :

Staphylococcus aureus virülans faktörü olarak proteaz, lipaz, DNAase ve yağ asiti modifiye edici sisteme sahiptir. Proteinler, yağlar ve yağ asitleri bakterinin gelişip çoğalabilmesi için gerekli üç önemli maddedir. FAME (yağ asitlerini modifiye eden enzim) antibakteriyel yağ asitlerini modifiye ederek bakterilerin daha uzun yaşamasını sağlasa da etkenin patogenezi düşünüldüğünde ve diğer virülans faktörleri ile karşılaştırıldığında minor öneme sahip olduğu görülür (189).

2.13.2.6. Biofilm:

Bazı bakteriler yüzeylere tabaka oluşturacak şekilde tutunurlar. Bu tabaka şeklindeki oluşuma biofilm adı verilir. Biofilm oluşurken ilk yapışan bakterilerin oluşturduğu bazal tabakaya diğer bakteriler tutunurlar. Diş plağı ve meme epitelyum hücreleri biofilmlerin en iyi incelenmiş örneklerdir. Biofilm oluşturma özelliği *S. aureus*'ların katater ve implantlara tutunabilmesinde de büyük önem taşır (192). Biofilm oluşumunun antibiyotik duyarlılık testlerini etkilediği öne sürülmektedir. *Staphylococcus aureus*'ların sığır mastitislerinde antibiyotik tedavisine karşı dirençli olmasının nedenlerinden biride biofilm üretebilmesidir. İnsan ve hayvan orjinli *S. aureus*'ların

biofilm içeren ortamlarda büyümesi durumunda serbest hareket edebildiği durumlara oranlara antibiyotiklere 10-1000 kat daha dirençli olduğu belirtilmektedir. (212).

3. MATERYAL ve METOT

3.1. MATERYAL

3.1.1. Numuneler

Çalışmada, Kayseri ili ve çevre ilçelerde (Bünyan, Sarıoğlan, Mimarsinan, Erkilet, Yeşilhisar) süt sığır yetiştiriciliği yapılan işletmelerdeki farklı yaş gruplarında mastitis şüpheli sığırlardan 25'er ml olmak üzere toplam 900 adet süt örneği toplandı. Numuneler toplanmadan önce hayvanın dört meme lobundan alınan süt örneklerine CMT testi yapıldı. CMT pozitif sonuç veren süt örnekleri steril ağzı vida kapaklı plastik tüpler içerisine toplandı. Toplanan numuneler soğuk zincir altında en kısa sürede laboratuara getirildi ve incelemeye alındı.

3.1.2. Besi yerleri

Baird Parker Medium (BPM) (Lab M, 0884071318)

Bileşimi	**gr/l**
Tyrptone	10,0
Beef extract	7,5
Yeast Extract	1,0
Lithium Chloride	5,0
Glycine	12,0
Sodium Piruvate	10,0
Agar No.2	20,0
pH	6,8±2

BPM besiyerinden 65,5g tartıldı.1L distile su içerisinde ısıtılarak eritildi. Daha sonra otoklavda 121 ˚C ‘de 15 dakika sterilize edildi.50 ˚C ‘ye soğutulan besi yerine 50 ml Egg Yolk Tellürite Emilsiyon ilave edilerek aseptik koşullarda steril petrilere 12,5-15 ml olacak şekilde döküldü.

Blood Agar No. 2 (Acumedia, 7266A)

Bileşimi	**500ml/mg**
Enzymatic digest of casein	7,5
Enzymatic digest of animal tissue	7,5
Liver digest	2,5
Yeast Extract	5
Sodium Chloride	5
Agar	12
pH	7,4±2

Blood Agar besiyerinden 39,5 g tartıldı.1L distile su içerisinde ısıtılarak eritildi. Daha sonra 121 ˚C ‘de 15 dakika otoklavda sterilize edildi.50 ˚C ‘ye soğutulan besi yerine % 5’lik defibrine steril koyun kanı ilave edilerek aseptik koşullarda steril petrilere 12,5-15 ml olacak şekilde döküldü.

Christensen Üre Agar (Acumedia 7226)

Bileşimi	**500ml/mg**
Üre:	20
Sodyum klorid:	5
Monopotasyum fosfat:	2
Jelatin pepton:	1
Dekstroz:	1
Fenol red:	0.012
pH	6.8±0.2

Simon Sitrat Agar:

Bileşimi

Sodyum klorid	20 gr
Amonyum dihidrojen:	5 gr
Magnezyum sülfatt:	2 gr
Sodyum sitrat	1 gr
Dipotasyum fosfat:	1 gr
Bromthymol blue	0,08 gr
pH	6.8±0.2

Brucella Broth (Acumedia, 7121A)

Bileşimi	**500ml/mg**
Enzymatic digest of casein	10
Enzymatic digest of animal tissue	10
Yeast Extract	2
Sodium Chloride	5
Dextrose	1
Sodium bi Sülfite	0,1
pH	7,0±2

MR-VP Broth(Merck 1.05712)

Bileşimi

Peptone from meat	7 g/L
D(+) Glukoz	5 g/L
Fosfat buffer:	5 g/L
pH	6,9±0,2

LDB(LYsin Decarboxylase Test)

Bileşimi

Gelatin pepton	7 g/L
Yeast ekstrakt	5 g/L
Brom kreazol purple	5 g/L
L-lysine	1
Dekstroz:	1
pH	6.8±0,2

3.1.3. Supplementler

3.1.3.1. Egg Yolk Tellurite Emülsiyon (%20) (Merck 1.03785)

Baird Parker Medium hazırlanması aşamasında kullanıldı. Steril edildikten sonra soğutulan 1 litre besiyerine 50 ml Egg yolk tellürit emülsiyon ilave edildi.

3.1.4. Ayıraçlar

3.1.4.1. Hidrojen Peroksit (H_2O_2) (Merck 1.08597.1000)

*Staphylococcus aureus'*un *Streptococcus* spp.'lerden ayrımında kulanıldı.

3.1.4.2. Bactident® Coagulase (Merck 1.13306.0001)

Staphylococcus aureus identifikasyonu aşamasında kullanıldı.

3.1.5 Testlerde Kullanılan Cihaz Ekipmanlar

3.1.5.1. Elektroforez Güç Kaynağı:

Elektroforezde güç kaynağı olarak (ThermoEC 250-90,USA) zaman ayarlı güç kaynağı kullanıldı.

3.1.5.2. Jel Görüntüleme Sistemi:

Jel elektroforezi sonrasında PCR test sonuçlarının değerlendirilmesi ve jel fotoğraflarının görüntülenmesi amacı ile Vilber Laurmat(Fransa) ve jel fotoğraflarının basılması için kullanıldı.Jel görüntülerinin yakalanması ve analizinde (Sony,Japonya) kullanıldı.

3.1.5.3. Steril Kabin(Laminar flow):

DNA eldesi ve PCR misklerinin hazırlanması steril kabinde (Telstar Bio-II-A,İspanya) gerçekleştirildi.

3.1.5.4. Thermal Cycler:

DNA eldesinde ve sonrasında gerçekleştirilen amplifikasyon işlemlerinde (Techne Touchgene Gradient, USA) kullanıldı.

3.1.5.5. Jel Elekroforez Cihazı:

DNA jel elekroforezi için mini ve midi jel elektroforez cihazları (ThermoEC 320, İngiltere) kullanıldı.

3.1.6. Referans suş:

İsolasyon ve identifikasyon çalışmalarının her aşamasında kullanılan *S. aureus* kontrol suşları Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı kültür koleksiyonundan temin edildi.

Nucleic Acid Extraction Kit:

Absolute ethanol	(> %95)
Lizozim	(50 mg / ml)
Proteinaz K	(20 mg/ml)
RNase	(20 mg / ml)

Washing Buffer hazırlanması:

Kullandığımız kit, 100'lük olduğu için (GF-BA-100) washing buffera 70 ml absolute ethanol ilave edilerek hazırlandı.

Buffer BG hazırlanması:

Buffer BG'de soğuk ortamda saklanmaya bağlı olarak tuz presipitasyonları meydana gelmiş ise, kullanmadan önce 55ºC-65ºC 'lik su banyosunda sık sık karıştırılarak tamamen çözdürüldü ve ondan sonra kullanıldı.

PCR Reaktifleri

10X PCR (Sıgma,USA):

Tris-HCl	100Mm
KCl	500mM
pH	8.3

dNTP Mix:

Konsantrasyonu 10mM olan dNTP mix (Vivantis,USA) solusyon amplifikasyon esnasında denatüre edilen zincirlerin tamamlanması için PCR reaksiyonunda kullanıldı. Solusyon kullanılıncaya kadar -20℃'de muhafaza edildi.

Taq Polimerase:

Isıya dayanıklı DNA enzimi (Vivantis USA, 500U) moleküler aşamada PCR reaksiyonunda çift zincirli DNA'nın 5'-3' yönünde nükleotidlerine ayrılması ve tek iplikçikli hale gelmesini sağlamak amacı ile kullanıldı. Kullanılıncaya kadar -20 ºC 'de muhafaza edildi.

$MgCI_2$:

Konsantrasyonu 50 mM olan $MgCI_2$ (Vivantis, USA) PCR reaksiyonunda Taq polimeraz enzimi ile birlikte kullanıldı. Kullanılıncaya kadar -20ºC'de muhafaza edildi.

Primerler:

Çalışmada mPCR reaksiyonu sonucunda yapılan agaroz jel elektroforezinde *mecA* için 163 bp (base pair), *femA* için 102 bp, exfoliative toxin A için 93 bp, exfoliative toxin B için 226 bp büyüklüğünde bantlar oluşturan primerler kullanıldı. Çalışmada kullanılan primerler tablo 3.1 'de belirtilmektedir.

Tablo 3. 1. *S.aureus* suşlarının m-PCR ile incelenmesinde kullanılan primerlerin dizilimi (213)

Çalışmada kullanılacak olan primer dizileri (5'-3')	Gen bölgesi	Virulens gen adı	Amplikon büyüklüğü (bp)
GFEMAR-1 AAAAAAGCACATAACAAGCG GFEMAR-2 GATAAAGAAGAAACCAGCAG	*femA*	Factor of meticillin resistance	132
GMECAR-1 ACTGCTATCCACCCTCAAAC GMECAR-2 CTGGTGAAGTTGTAATCTGG	*mecA*	Meticillin resistance	163
GETAR-1 GCAGGTGTTGATTTAGCATT GETAR-2 AGATGTCCCTATTTTTGCTG	*eta*	Exfoliative toxin A	93
GETBR-1 ACAAGCAAAAGAATACAGCG GETBR-2 GTTTTTGGCTGCTTCTCTTG	*etb*	Exfoliative toxin B	226

Çalışmada elde edilen izolatlar sekiz adet primer kullanılarak m-PCR tekniği ile incelenmiştir.

Çoğaltılması istenen bölgenin iki ucundaki DNA dizisini tanıyıp ona bağlanacak olan sentetik DNA parçaları olan liyofilize primerler 100 pmol/ml olacak şekilde sulandırıldı ve bu primerler PCR reaksiyonunda kullanılıncaya kadar -20℃'de muhafaza edildi.

DNA Ladder:

Konsantrasyonu 0,5µg/µl olan 100bp DNA ladder (Vivantis, USA) elektroforez sonucunda oluşan bantların büyüklüklerini belirlemek için kullanıldı. Kullanılıncaya kadar -20℃'de muhafaza edildi.

6XLoading Dye:

6 X Loading Dye'ın (Vivantis, USA) bileşiminde boyaları bulunmaktadır. Elektroforez boyunca DNA göçünün izlenmesi amacı DNA ladderlerin ve örneklerin agaroz jele yüklenmesinde kullanıldı. Kullanılıncaya kadar -20℃'de muhafaza edildi.

10 X TBE Electrophoresis Buffer

Tris	89 mM
Borik asit	89 mM
EDTA	2 Mm

50 ml 10 X TBE Buffer (Fermentas, Litvanya) 950 ml distile su ile 1000'e tamamlanarak 0.5 X TBE buffer hazırlandı.0.5 X TBE buffer agaroz jel hazırlanmasında ve elektroforez aşamasında kullanıldı.

Agarose :

Agaroz'dan (Lonza, USA, 100gr) 1,5 gr tartılarak 100 ml 0.5 X TBE ile homojenize edildi. Mikro dalga fırında eritildi. 50℃ civarına kadar soğutulan agaroza 3 µl ethidium bromid ilave edildi ve jel haline getirilerek elektroforez aşamasında kullanıldı.

Ethidium Bromide (GERBU, 180407):

Jelde DNA bantlarının görülebilmesi amacıyla kullanılan ethidium bromid'ten 1g/100 ml olacak şekildeki % 1 lik solusyondan ml'ye 0,5 ul olacak şekilde agaroz jelde hazırlanmasında kullanıldı.

3.2 METOT

3.2.1.California Mastitis Testi :

Shitandi ve ark. 2004'nın çalışmalarında belirttiği gibi yapıldı

3.2.2. Sığır Süt Örneklerinden *S. aureus* İzolasyonu

Staphylococcus aureus izolasyonu amacı sürme plak yöntemi ile Egg-Yolk Tellurit (Merck 1.03785.0001) içeren BPM (Lab M**,** 0884071318) besiyerine ekildi. 37º C'de 2 -3 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübsyon süresinden sonra *S. aureus* şüpheli beş adet koloni kanlı agara (Acumedia, 7266A) subkültüre edilerek 37º C'de 24 saat inkübe edildi. Bu süre sonucunda identifikasyon için şüpheli koloniler Brusella Broth (Acumedia, 7121A)'a subkültüre edilerek 37º C'de 24 saat inkübe edidi (54, 82-84, 87, 88).

3.2.3. Biyokimyasal testler

Sütlerden izole edilen etkenlerin biyokimyasal özelliklerini belirlemek için; karbonhidrat fermantasyon testleri, indol, metil red- voges proskauer, üre, lizin dekarboksilaz, hidrojen sülfür, lizin dekarboksilaz, sitrat kullanım testleri uygulandı (84, 87,88).

3.2.3.1 Karbonhidrat Fermantasyon Testi:

Karbohidrat fermantasyon testlerinde, test edilecek olan sorbitol, laktoz, glikoz, mannitol, sakkoroz gibi karbonhidratların % 10 'luk çözeltileri hazırlanmış ve bu

çözeltiler 80 ^{o}C'de 3 gün süre ile 1'er saat tutularak steril edildi (Tindalizasyon). Bu çözeltilerden 0,5ml alınarak içerisinde 5ml steril brucella broth bulunan tüplere konuldu. Saf bakteri kültürleri her bir şeker için bu besiyerlerine 0,1 ml ekildi. Birkaç damla % 2'lik brom thymol blue ilave edilerek 37 ^{o}C'de 24-48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda tüpteki mevcut olan yeşil rengin sarıya dönüşmesi pozitif olarak değerlendirildi ((84, 87,88)).

3.2.3.2. Üre Testi :

18- 24 saatlik saf kültürden bir öze dolusu alındı ve yatık Christensen'in üreli agara ekildikten sonra 37°C de 1-5 gün bırakıldı. Her gün kontrol edilen kültürlerde renk değişmelerine dikkat edildi. Kültürde kırmızı rengin meydana gelmesi pozitif reaksiyon olarak ve hiçbir değişikliğin olmaması de negatif olarak değerlendirildi ((84, 87,88)).

3.2.3.3. İndol Testi:

İçerisinde 5 ml nutrient broth bulunan tüplere 18-24 saatlik saf kültürden 0,1 ml ekildi. 37 ^{o} C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda tüp içerisine 0,5 ml kovaks ayıracı damlatıldı Tüplerin üst kısmında bir iki dakika içinde kırmızı bir halkanın oluşması pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi. Sarımsı halka oluşması ise negatif reaksiyon olarak değerlendirildi (84, 87,88).

3.2.3.4 Metil Red Testi:

18-24 saatlik saf kültürlerden besi yerlerine ekimler yapıldı ve tüpler 37 °C de 2-7 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda tüp içerisine metil kırmızısı solüsyonunundan 4-5 damla damlatıldı ve iyice karıştırıldı. Tüpte kırmızı rengin oluşması pozitif, renk değişikliğinin olmaması negatif olarak değerlendirildi ((84, 87,88).

3.2.3.5 Hidrojen Sülfür Testi:

Bu test için kurşun asetat emdirilmiş steril kağıt şeritleri (0.5 x 100 mm) kullanıldı. İçerisinde 5ml Brucella buyyon bulunan tüplere 0,1 ml saf kültürden ekim yapıldıktan sonra, sıvı besiyerine çok yakın ancak sıvıya değmeyecek şekilde kağıt şeritler tüplerden sarkıtıldı. Tüpler 37°C de 2-7 gün inkübasyona bırakılarak her gün gözle kontrol edildi. Kurşun asetat emdirilmiş kağıttaki kurşun asetatla temasta kurşun sulfid meydana gelmesine bağlı olarak kağıdın ucunda kararma meydana gelmesi pozitif olarak; karamanın olmaması negatif olarak değerlendirildi (84, 87,88).

3.2.3.6. Lisin Dekarboksilaz Testi:

Lisin Dekarboksilaz Broth besiyeri ve kontrol olarak hazırlanan lisin içermeyen aynı besiyerine bir öze dolusu saf kültür inokule edildi. 37°C de 2-7 gün inkübe edildi. Kültürler her gün kontrol edildi. İnkübasyon süresi sonunda kontrol besiyerinin sarı renkte lisin dekarboksilaz broth besiyerinin menekşe renginde olan tüpler pozitif olarak değerlendirildi (84, 87,88).

3.2.3.7. Sitrat Kullanım Testi:

Bu test için 18- 24 saatlik saf kültürden yatık Simmons citrate agara ekimler yapıldı ve tüpler 2-7 gün 37 °C inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda üremenin olmaması ve ortamın orijinal yeşil rengini muhafaza etmesi negatif olarak değerlendirilirken ekim hattı boyunca üremeye bağlı olarak koyu mavi rengin oluşması pozitif olarak değerlendirildi (84, 87,88).

3.2.3.8. CAMP testi:

Darling 1975 çalışmada belirttiği şekilde yapılmıştır.

3.2.4.Moleküler İdentifikasyon

3.2.4.1.DNA Ekstraksiyonu

Bakteri DNA'sını elde etmek için GF-1 bakteri ekstraksiyon kiti kullanıldı. Ekstraksiyon işlemi kit protokolünün önerdiği şekilde gerçekleştirildi. Kısaca, şüpheli bakterilere ait bir gecelik sıvı kültüründen 1-3 ml alındı ve oda ısısında 6.000 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Tüpün üstünde biriken supernatant atılarak altta kalan pelletin üzerine 100 µl R1 buffer konuldu ve homojenize edildi. Üzerine 10 µl lizozim (50 mg/ml) konarak 37°C'de 20 dakika inkübe edildi. Süspansiyon 10.000 x g'de 3 dakika santrifüj edildi. Supernatant atılarak altta kalan pelletin üzerine 180 µl R2 bufferdan ve 20 µl proteinaz K (20 mg/ml) ilave edilerek homojenize edildi. 60°C'lik su banyosunda 20 dakika inkübasyon sonrasında süspansiyon üzerine 20 µl RNase (20 mg/ml) konuldu. Süspansiyon 37°C'de 5 dakika inkübe edilerek üzerine 440 µl BG buffer ilave edildi. İyice karıştırıldıktan sonra 60°C'lik su banyosunda 10 dakika inkübe edildi. Süspansiyon bir dakika oda ısısında dinlendirildikten sonra 200 µl absolut etanol ilave edilerek toplama tüpünün kolon kısmına aktarıldı. 10.000 x g'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra kolonun filtresinin altına geçen sıvı atılarak kolon yeni bir toplama tüpüne alındı ve üzerine 750 µl yıkama bufferından konuldu ve tekrar 10.000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Tüpün altında toplanan sıvı atılarak kalan etanolün tamamen uzaklaşması için ek bir santrifüj yapıldı. Spin kolon 1-1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınarak üzerine, önceden ısıtılmış 50-100 µl elution buffer konuldu. İki dakika oda ısısında beklendikten sonra 10.000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolon atılarak alttaki sıvı PCR'da hedef DNA olarak kullanılmak üzere -20 °C 'de saklandı.

3.2.4.2. Multipleks PCR

Multipleks PCR reaksiyon karışımının final konsantrasyonu 50µl olacak şekilde hazırlandı. Reaksiyon karışımı 5µl DNA örneği, 5 µl 10 X PCR buffer(Vivantis), 2 mM MgCl2(Vivantis), 200 µM dNTP(Vivantis), 50 pmol *eta* ve 20 pmol *mecA, femA* ve *etb* primerleri 2.5 U Taq polymerase(Vivantis) şeklinde hazırlandı. Karışımın her biri 200 µl'lik ısıya dayanıklı DNase-RNase free özel PCR tüplerine 45 µl reaksiyon karışımı 5 µl DNA örneği içerecek şekilde dağıtıldı. Amplifikasyon için tüpler yerleştirildi. DNA

amplikasyonu, 94 ˚C'de 5 dk ön denatürasyon işlemi uygulandıktan sonra 94 ˚C'de 2dk, 57 ˚C'de 2dk, 72˚C'de 1 dk 35 siklusta ve 72˚C'de 7 dk son uzatma olacak şekilde gerçekleştirildi.(213).

3.2.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri % 2'lik agaroz jelde 90 V gerilimde 45 dk elektroforez (ThermoEC250-90) işlemine tabi tutulduktan sonra, UVP jel dökümantasyon işlemi (Vilber Laourmat) kullanılarak görüntülendi (155)

4.BULGULAR

4.1.California Mastitis Testi

Çalışmada, Kayseri ilindeki farklı bölgeleri temsil edecek şekilde, bir yıllık süre içerisinde kamu ve özel sektöre ait süt sığır yetiştiriciliği yapılan işletmelerdeki farklı yaş gruplarına ait mastitisli ineklerden California Mastitis Testi (CMT) uygulanarak Trace (T), +1, +2,+3 sonuç veren toplam 900 adet süt örneği toplanarak incelendi. CMT negatif sütler değerlendirilmeye alınmadı. CMT testi sonucu aşağıda belirtilmiştir(Tablo-4.1.).

Tablo 4.1. California Mastitis Test Sonuçları

T	+1	+2	+3
132	408	330	30

T: Tarce, +1, +2,+3: Sütte Bulunan Somatik Hücre Sayısı

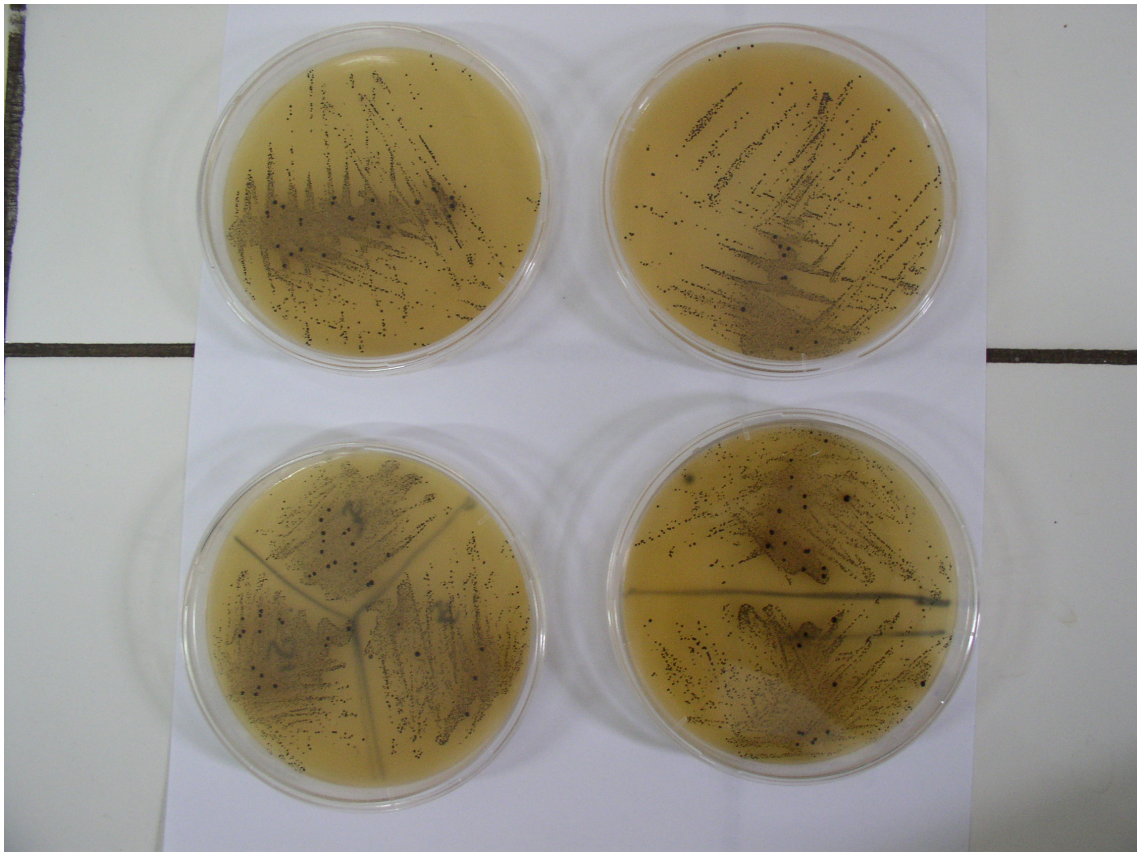
(T= 200.000-400.000, +1= 400.000-1.200.000, +2= 1.200.000-5.000.000, +3=5.000.000 ve üzeri)

Çalışmada, CMT pozitif 900 adet süt numunesi Baird Parker Medium ekilerek inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda toplam 900 adet süt numunesinden 187 adet (% 20,7) *S. aureus* şüpheli koloni tespit edildi. Şüpheli kolonilere mikroskobik muayene ve biyokimyasal testler uygulandı.

4.2. Mikroskobik Muayene Sonuçları

Çalışmada, şüpheli kolonilerden hazırlanan preparatların Gram boya yöntemi ile boyanması sonucunda yapılan mikroskobik muayenede, süt numunelerinin tamamında mavi mor renkli kok şeklinde, Gram pozitif bakteriler tespit edildi.

Şekil 4.1'de Baird Parker Medium ve Kanlı Agarda yapılan ekim sonucu üreyen koloniler belirtilmektedir.



Sekil 4.1. Baird Parker Medium'da pozitif (*S.aureus pozitif*) kültürlerin görünümü.

4.3. Biyokimyasal Test Sonuçları

Gram pozitif sonuç veren koliniler kanlı agar ve Brusella Broth'a subkültüre edilerek 37 º C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda üreyen koloni ve kültürlere katalaz, koagulaz, karbonhidrat fermantasyon testleri, indol, metil red- voges proskauer, üre, lizin dekarboksilaz, hidrojen sülfür, lizin dekarboksilaz, sitrat kullanım testleri uygulandı.Yapılan biyokimyasal testler sonucunda 187 adet şüpheli izolatın 128'i (% 68,4)'ü *S. aureus* olarak tespit edildi (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Süt Numunelerinden Elde Edilen *Staphylococcus* spp.'lerin Fenotipik Özellikleri

Fenotipik Testler	*S. aureus*	CNS
Gram pozitif (+)	128	59
Katalaz (+)	128	59
Koagulaz (+)	128	0
DNase Aktivitesi	128	0

CNS : Koagulaz negatif Stphylococcus

4.4. Süt Numunelerinde *Staphylococcus* spp'nin Prevalansı

Çalışmada incelenen 900 adet süt numunesinin 187'inde (% 20,7) *Staphylococcus* spp. türleri izole edildi. 187 pozitif örneğin 128'i (%68,4) *S. aureus*, 59'u (%31,6)CNS olarak belirlendi (Şekil 4.2).

Tablo 4.3.'de çalışmada kullanılan süt numulerindeki *Staphylococcus* türlerinin prevalansı belirtilmektedir.

Tablo 4.3. Süt numunlerindeki *Staphylococcus* Türlerinin Prevalansı

Numune	*Stahylococcus* spp.		*S.aureus*		CNS	
	Sayısı	%	Sayısı	%	Sayısı	%
Süt (n= 900)	187	20,7	128	68,4	59	31,6
Total (n= 900)	187	20,7	128	68,4	59	31,6

4.5. Süt Numunelerinden İzole Edilen Bakterilerin Prevalansı

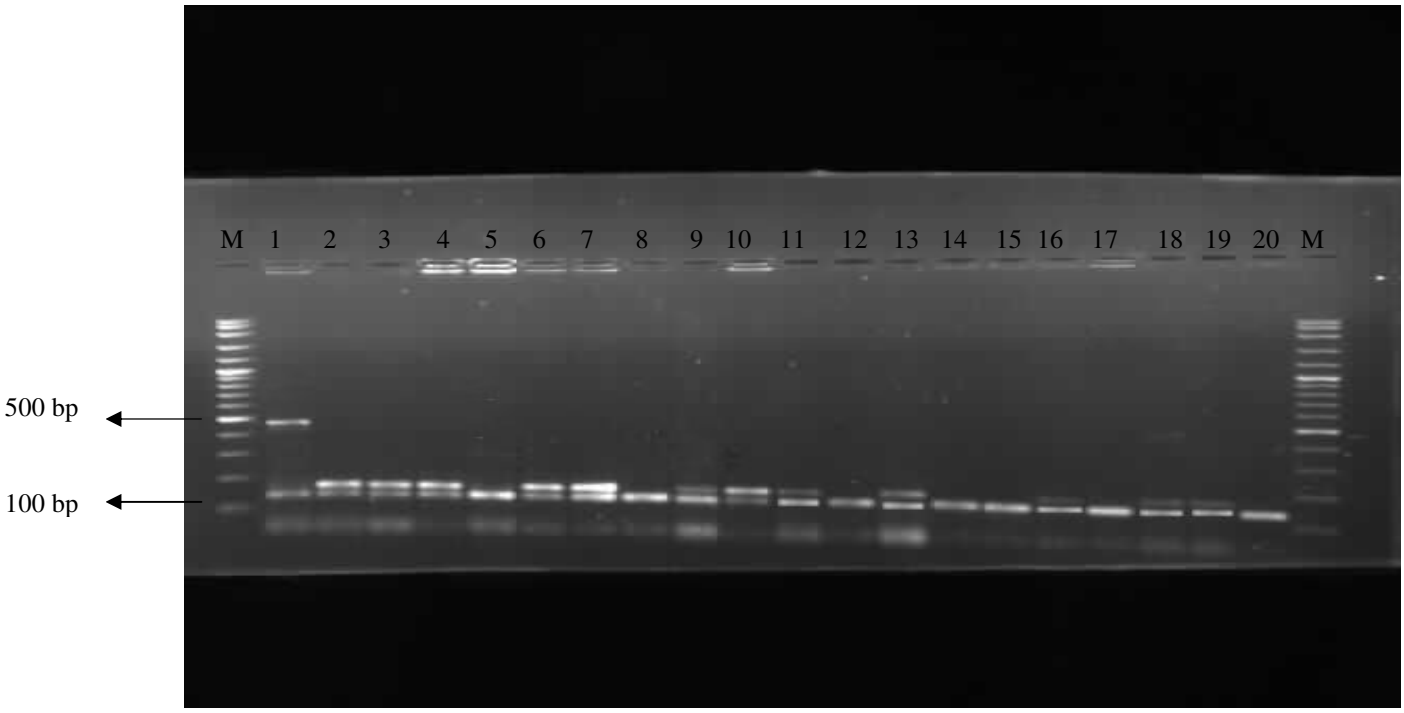
Çalışmada incelenen 900 adet süt numunesinin 240 (%26.6) tanesinde üreme saptandı. 187'inde (% 20,7) *Staphylococcus* spp. türleri izole edildi. 187 pozitif örneğin 128'i (%68,4) *S. aureus*, 59'u (%31,6)CNS olarak belirlendi (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Süt numunelerinden izole edilen etkenlerin prevelansı

İzole edilen bakterinin adı	Sayı
Staphylococcus aureus	128
CNS	59
Streptecoccus agalactia	19
Streptecoccus spp.	11
Escherichia coli,	33
Klebsiella spp.	1
Alcaligenes sp.	1

4.6. Multipleks PCR Sonuçları

Çalışmada, süt numunelerinden elde edilen *S. aureus* izolatlara uygulanan m-PCR reaksiyonu sonucunda yapılan agaroz jel elektroforezinde *mecA* için 163 bp (base pair), *femA* için 132 bp, *eta* için 93 bp, *etb* için 226 bp büyüklüğünde bant oluşumu beklendi. m-PCR işlemi sonucunda 128 adet *S. aureus* izolatının 9'unun (%7) *mecA* geni, bu izolatlardan 2 tanesinin sadece *mecA* geni diğer 7 tanesinin hem *mecA* hem de *femA* geni taşıdığı belirlendi. İzole edilen etkenlerden sadece 2 tanesinin *femA* taşımadığı belirlenmiştir. İzolatların hiç birisinde *eta* ve *etb* genine rastlanmadı(Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Sahadan izole edilen şüpheli suşlara uygulanan m-PCR sonuçları. M. Marker (100 bp Vivantis), 1, 5, 8, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 132 bp'de sadece *femA* pozitifliği görülen izolatlar, hem *mecA*(163 bp) hemde *fema* pozitif bulunan izolatlar (2, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 11, 13)

5. TARTIŞMA SONUÇ

Mastitis kompleks bir etiyolojiye sahip süt ineklerin en önemli yetiştirme hastalıklarından biridir. Türkiye'de mastitisin neden olduğu ekonomik kayıp hakkında kesin bir bilgi yoktur. Ancak yurtdışında yapılan çalışmalardan mastitisin süt ineği yetiştirciliğinde neden olduğu zararlar hakkında bilgi edinilebilmektedir (217,218). Bu çalışmada dünyada ve ülkemizde mastitis etiyolojisinde önemli bir yer tutan *S. aureus*'un izolasyonu ve multipleks PCR yöntemi ile bazı virülans faktörlerinin ve metisilin direncinin araştırılması amaçlandı. Bu amaca yönelik olarak CMT testi ile süt inekleri tarandı ve CMT pozitif süt örneklerinden etken izolasyonu yapıldı. CMT testi tüm dünyada mastitis olgularının erken tanısında yaygın olarak kullanılmaktadır. Dingwell ve ark. 2003 CMT testinin mastitislerin tanısında kullanımını inceledikleri çalışmada CMT testinin sensivitesinin % 82,4 spesifitesinin % 80.6 olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada mastitis tanısında CMT testinin hızlı, doğru ve ekonomik bir test olduğu belirtilmektedir. Middleton 2004 CMT testinin mastitis tanısında kullanılabilecek güvenilir bir test olduğunu belirtmiştir. Luedecke ve ark. 1967 Süt örneklerinde CMT skoru, Lökosit sayısı, katalaz aktivitesi ve A esteraz aktivitesini inceledikleri çalışmada CMT testinin anormal sütün göstergesi olduğunu belirtmişlerdir. Barnum ve .1961 Farklı kaynaklardan topladıkları süt numunelerine White test, CMT, Plate count testlerini ve süt kültürü yaparak mastitis tanısı koymaya çalışdıkları çalışmada CMT pozitif sonuç veren süt numunelerinin % 2,7'sinin süt kültüründe negatif sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada CMT testi ile daha doğru sonuçlar alınabilmesi için uzman kişiler tarafından yapılması gerektiği ayrıca test sonuçlarının yorumlanmasında bir uniformite geliştirilmesi gereği vurgulanmıştır. Shitandi ve Kihumbu 2004 CMT testi ile inceledikleri 239 süt numunesinin 39 (%16,3) tanesinin negatif, 200 (% 83,7) tanesinin pozitif sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada incelenen süt örneklerinin bakteriyolojik kültürü sonucunda 59 süt numunesinden hiçbir etken izole edilemediğini bildirmişlerdir. Hueston ve ark. 1986

Meme içi enfeksiyonlarda CMT testinin sensitivitesini inceledikleri çalışmada 106 koyundan aldıkları 526 süt numunesini incelemişler ve CMT testinin spesifitesinin % 76,5 sensivitesinin ise % 69,3 olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada major patojenlerle meydana gelmiş mastitislerde spesifitesinin %71.1 sensitivitesinin ise % 100'e çıktığını belirtmişlerdir. González-Rodríguez ve Cármenes 1996 1366 süt numunesini inceledikleri çalışmada süt numunelerini bakteriyolojk olarak incelemişler ve kültür sonuçlarına göre CMT'nin süt numunelerinin %78,4'ünü doğru sınıflandırdığını belirtmişlerdir. Middleton ve ark. 2004 Bir sürüden toplanan ve 1057 meme lobundan alınan süt örneklerini CMT ve SHS (Somatik Hücre Sayısı) ölçümleri ile kontrol ettiklerini bildirmişlerdir. CMT ve SHS'nin duyarlılığının sırasıyla % 61 ve % 76 olduğunu bildirilmişlerdir. Aynı çalışmada subklinik mastitisli ineklerin belirlenmesinde somatik hücre sayımı ve CMT taramasının bakteriyolojik yöntemlerle desteklenmesi gerektigi vurgulanmıstır. Bizim çalışmamızda CMT skoru olan Trace, 1+, 2+, 3+, 4+ olan 900 adet süt numunesi toplandı. Toplanan süt numunelerinin bakteriyolojik incelenmesi sonucunda 240 (%27) süt numunesinden 252 etken izolasyonu gerçekleştirildi. İncelenen süt numunelerinden bazılarında birden fazla etken izole edilmiştir. Bu 240 süt numunesinden 187'sinde (%20.7) *S. aureus* şüpheli kolonilerin izolasyonu yapıldı. Bu izolatlardan 128'inin *S.aureus* olduğu tespit edilmiştir. CMT pozitif sonuç veren 900 süt numunesinin 760'sında (%73) herhangi bir üremeye rastlanmamıştır. Bu oranlar diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında belirgin farklılıklar göstermektedir. Çalışmamızda CMT pozitif süt örneklerinin (Trace, 1+, 2+, 3+, 4+) bakteriyolojik incelemesinde üreme olmayan süt numunelerinin sayısının fazla olmasının nedenleri; CMT sonucu trace (200.000-400.000 arasında somatik hücre bulunması) çıkan süt numunelerinin de çalışma kapsamına alınması olabilir. Ayrıca ülkemizde yetiştiricinin veteriner hekimin bilgisi dışında antibiyotik kullanması süt kültürünü olumsuz yönde etkilemektedir. Klinik veya subklinik olarak mastitis olduğu saptanan ineklerde süt numunesi alınmadan antibiyotik tedavisine başlanması süt kültürünün negatif sonuç vermesine neden olmuş olabilir. CMT testi çevre şartlarından ve fiziksel koşullardan etkilenmektedir(225). Yaptığımız çalışmada sütler farklı çevre ve fiziksel şartlardan toplandığı için bu şartlarda CMT testinin yapılması sonuçları etkilemiş olabilir. Enfeksiyöz hastalıklarla mücadele edebilmenin en önemli şartı etiyolojide rol oynayan mikroorganizma veya mikroorganizmaların teşhis edilmesi ve bu mikroorganizmaların antimikrobiyallere olan duyarlılığının belirlenmesidir.

Ülkemizde ve farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda mastitis etiyolojisinde rol oynayan mikroorganizmaların ve bu mikroorganizmaların sahip olduğu antibiyotik direncinin bölgesel farklılık gösterebileceği belirtilmektedir (105). Ülkemizde ve dünyada klinik ve subklinik mastitislerden izole edilen en önemli etken *S. aureus*'tur. Türütoğlu ve ark 1995 1126 (% 70,6) süt örneğinin 316 (% 28,1)'sından *S. aureus* ve 260 (% 23,1)'ından *S. epidermidi*s identifiye ettiklerini bildirmişlerdir. Waage ve ark 1999 mastitis olgularının %44,3'ünden *S. aureus* izole edildiğini ve mastitis etiyolojisinde rol oynayan primer etkenin *S. aureus* olduğunu bildirmişlerdir. Kuyucuoğlu ve Uçar 2001 Afyon bölgesindeki mastitisli 126 inekten 119'unun subklinik, 7'sinin ise klinik mastitisli olduğu bildirilmiştir. Bu ineklerden % 40,1 oranında *S. aureus* identifiye edildiğini bildirmişlerdir. Shitandi ve Kihumbu 2004 mastitis şüpheli 239 süt örneğinin 109 (% 45,6)'undan *S. aureus*, 28 (% 11,7)'inden *Streptecoccus* spp., 31 (% 13)'inden CNS ve 14 (% 5,9)'ünden *E. coli* izole edildiğini bildirmişlerdir. 59 süt numunesinde ise hiçbir etkenin izole edilemediğini bildirmişlerdir. Getahun ve ark. 2008 subklinik ve klinik mastitislerde rol oynayan mikroorganizmaların dağılımını inceledikleri çalışmada subklinik mastitslerde *St. agalactia* (n=3 % 30) ve *St. dysgalactia*'nın (n= 3 % 30) klinik mastitslerde ise *S. aureus* ve *S. epidermidis*'in primer patojenler olduğunu belirtmişlerdir. Lakew ve ark. 2009 mastitis olgularının % 24,1'inden *S. aureus*, % 6,8'inden *Str. dysgalactia*, % 17,3'inden CNS, % 7,5'inden *E. coli*, % 3,8'inden *Str. uberis* ve % 14,4'ünden *Streptecoccus* spp. izole edildiğini bildirmişlerdir. Petrovski ve ark. 2009 Temmuz 2005 ve mayıs 2006 yılları arasında 14 çiftlikte yaptıkları çalışmada mastitis olgularından izole ettikleri etkenlerin %23,7'sinin *S. aureus* ve %23,3'ünün Str. uberis olduğunu ve mastitis etiyolojisinde rol oynayan temel etkenin *S. aureus* olduğunu bildirmişlerdir. Unnerstad ve ark. 2009 829 inekten topladıkları toplam 987 mastitisli süt numunesinin % 21,3'sinden *S. aureus*, % 15,9'undan *E. coli* % 15,6'sından *Str. dysgalactiae*, % 11,1'inden *Str.uberis*, % 6,2'sından CNS, % 6,1'inden *A. pyogenes* ve % 4,2'inden *Klebsiella* spp. izole ettiklerini bildirmişlerdir. Bengtsson ve ark. 2009 Akut klinik mastitisli ineklerden aldıkları süt numunelerinde yaptıkları çalışmada *Staphylococcus aureus* (n=211), CNS (n=56), *Streptococcus uberis* (n=113), *Streptococcus dysgalactiae* (n=152), *Streptococcus agalactiae* (n=6), *Escherichia coli* (n=163) ve *Klebsiella spp.* (n=4) izole ettiklerini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada *S. aureus* izolatları arasında metisilin direncine sahip izolatlar olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda elde edilen izolasyon oranları *S. aureus* (% 51, CNS % 23 , *Str*

agalactia % 8 , *Streptococcus spp.* % 4, *E. coli* (% 13 n=33), *Klebsiella spp* % 0,5 , *Alcaligenes spp.* % 0,5 ’dir. Çalışmamızdaki oranlara bakıldığında *S. aureus*’un mastitis etiyolojisinde rol oynayan primer etken olduğu görülmektedir. Bu durum farklı ülkelerde ve ülkemizde yapılan çalışmaların önemli bir bölümüyle uyumludur. Ancak bazı çalışmalardaki izolasyon oranları bizim çalışmamızdaki oranlarla farklılık arz etmektedir. Watts ve ark. 1986 mastitis olgularının % 26,9 oranında CNS ve % 7,1’inden *S. aureus* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Sargeant ve ark. 1998 % 28,7 oranında CNS, % 6,7 oranında *S. aureus* ve % 17,2 oranında *E. coli* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Ergün ve ark (2004), subklinik mastitisli 115 inekten alınan 262 adet süt örneğinden % 42,4 oranında koagulaz negatif stafilokok ve % 25,1 *S. aureus* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Malinowski 2006 ve ark. Polonyada 2003-2005 yılları arasında CMT pozitif saptadıkları 18.713 süt numunesinde yaptıkları incelemede % 15,7 *Streptecoccus* spp. % 14,6 CNS, % 8,6 *S. aureus,* % 4 gram negatif basil ve % 3,8 *Corynobacterium* spp. izole ettiklerini bildirmişlerdir. Ferguson ve ark. 2007 Ekim 2000 ve Haziran 2006 yılları arasında Sicilya’da 18.711 süt örneğini inceledikleri çalışmada % 22,6 CNS, % 20,6 *S. aureus,* %11,1 *Streptecoccus spp.,*% 2,9 koliform grubu bakteri, % 2,3 *Streptecoccus agalactia,* % 5,8 diğer mikroorganizmaları izole ettiklerini bildirmişlerdir. Hendriksen ve ark. 2008 13 Avrupa ülkesinde 2002 ve 2004 yılları arasında mastitis etiyolojisinde rol oynayan mikroorganizmaların dağılımını inceledikleri çalışmada dağılımının bölgesel farklılık gösterdiğini belirtmişlerdir.Bu farklılıkların ortaya çıkmasının nedenleri aşağıdaki gibi sıralanabilir;

1. Çalışmaların farklı bölgelerde yapılması
2. İncelenecek süt örneklerinin toplanma yöntemlerinin değişkenliği
3. Süt kültürü için kullanılan besi yerleri arasındaki farklılıklar
4. Laboratuar personelinin manüplasyonu

Saha çalışmalarında mastitis olgularından izole edilen etkenlerin dağılımları gibi sahip oldukları antibiyotik direncide önemli ölçüde değişkenlik göstermektedir. Hendriksen ve ark. 2008 13 farklı Avrupa ülkesinde *S. aureus’*un sahip olduğu antibiyotik direncini incelemişler ve ülkelere göre değişen oranlarda antibiyotik direnci saptadıklarını belirtmişlerdir. Özellikle metisilin direnci klinik

olgulardan izole edilen *S. aureus*'lar arasında hızla yayılmaktadır(108). Swartz ve ark. 1984 Subklinik mastitis olgularından izole edilen 93 *S. aureus* izolatından hiçbirisinin metisiline dirençli olmadığını belirtmişlerdir. Matsunaga ve ark. 1990 66 sığır çiftliğinden toplanan mastitisli sütlerden izole edilen *S. aureus*'lardan hiçbirisinin metisiline dirençli olmadığını belirtmişlerdir. Pengov ve Ceru 2003 E-test ile 76 sığır kökenli *S. aureus* suşunun sahip olduğu metisilin direncini araştırdıkları çalışmada etkenlerden hiçbirisinin metisiline dirençli olmadığını belirtmişlerdir. Güler ve ark. 2005 mastitis olgularından izole edilen 265 *S. aureus* suşu üzerinde yaptıkları çalışmada oksasillin dirençli suş bulunmadığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada Penisilin direncinin 95 yılından 2004 yılına kadarki sürede % 43,5'ten % 76,9'a yükseldiğini bildirmişlerdir. Nunes ve ark. 2007 Mastitisli ineklerden izole ettikleri 30 *S. aureus* izolatından hiçbirisinin metisiline dirençli olmadığını bildirmişlerdir. Barton ve ark. 2003 Sığır orjinli *S. aureus*'larda en fazla beta laktamaz aracılı penisilin direncine rastlandığını ve metisilin direncinin tespit edilemediğini bildirmişlerdir. Monecke ve ark. 2007 Sığır orjinli *S. aureus*'lardan 2 tanesinde metisilin direnci saptadıklarını bildirmişlerdir. Loeffler ve ark. 2009 129 köpeğin 10(% 7,8) tanesinde MRSA izole ettiklerini bildirmişlerdir. Van den Eede 2009 110 attan aldıkları nasal örneklerden izole edilen *S. aureus*'lardan 12 (% 10,9) tanesinde metisilin direnci saptadıklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmada subklinik mastitisli ineklere ait sütlerden izole edilen toplam 128 *S. aureus* suşunun 9 (% 7) tanesinde *mecA* geni saptanmıştır. Bu etkenlerden tamamının femA genine sahip olduğu görülmüştür. Yukarıdaki verilere bakarak ve EARSS raporu göz önüne alındığında metisilin direncinin hızla yayıldığı görülmektedir. Çalışmamızda elde edilen verilerde bu bilgiyi doğrulamaktadır. Ayrıca bizim çalışmamızda hayvansal kökenli *S. aureus* izolatları arasında da metisilin direncinin yaygınlaşmaya başladığı açıkca görülmektedir. Bu çalışmada ve son yıllarda yapılan çalışmalarda metisilin dirençli suşların izolasyon oranlarının arttığı görülmektedir. Bu bakımdan çalışmamız özellikle son iki yıldır bu konu ile ilgili yapılan çalışmaların verileri ile paralellik göstermektedir. Ayrıca Avrupa Hastalıkları Önleme ve Mücadele biriminin yaptığı çalışmaya göre ülkemizde invazif olgulardan izole edilen *S. aureus*'lardan %10-25'inin metisiline dirençli olduğunu göstermektedir(108). Bu çalışmada elde edilen sonuçlarda

çalışmamızda elde edilen sonuçlara paralellik göstermektedir. Bu durum ilerleyen yıllarda metisilin dirençli *S. aureus*'lardan kaynaklanan hastalıkların sayısının aratacağını göstermektedir. Hayvansal kökenli MRSA'ların görülmesi özellikle ülkemizde insan sağlığını olumsuz yönde etkileyecektir. Bunun nedeni ükemizde hayvan hareketlerinin kontrol edilememesi, hayvansal kaynaklı atıkların kontrollü imhasının yapılamamasıdır. MRSA'nın tespit edilme oranın artışındaki nedenlerden biri de moleküler yöntemlerin geliştirilmesidir. Genotipik yöntemler fenotipik yöntemlere oranla daha hızlı ve doğru sonuçlar vermektedir (239). Zahan ve ark. 2009 2006-2007 yılları arasında izole ettikleri 40 *S.aureus* izolatındaki metisilin direncini disk difüzyon, agar dilusyon ve PCR metodlarıyla inceledikleri çalışmada 10(%25) adet izolatın *mecA* geni taşıdığını belirtmişlerdir. Aynı çalışmada agar dilusyon ve disk difüzyon tekniği ile tespit edilen MRSA'ların sayısının moleküler yöntemlerle tespit edilenden daha fazla olduğunu bildirmiştir. Bu nednele antibiyotik direncinin belirlenmesinde fenotipik yöntemlerle moleküler yöntemlerin sonuçlarının çelişkili olduğunu bildirmişlerdir. Anand ve ark. 2009 Farklı klinik örneklerden izole ettikleri 50 *S.aureus* izolatından 32 tanesinin *mecA* geni taşıdığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada metisilin direncinin saptanmasında oksasilin disk difüzyon ve sefoksitin disk difüzyon tekniklerinin moleküler yöntemlere duyarlılığının daha az olduğunu belirtmişlerdir. Kearns ve ark. 1999 İngilterede yaptıkları çalışmada mPCR ile 111 stafilokok suşu içerisinde bulunan MRSA'ların hızlı ve doğru bir şekilde tespit edilebilidiğini ve mPCR yönteminin *S.aureus*'larda metisilin direncinin tespitinde kullanılabilecek bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Zmantar ve ark. 2008 Kulak infeksiyonlarından izole ettikleri 35 izolatın %60'ında *mecA* geninin tespit edildiğni bildirmiştir. Aynı çalışmada fenotipik ve genotipik yöntemler arasında bir korelasyon bulunmadığı belirtilmiş buna rağmen moleküler yöntemlerin fenotipik yöntemlere oranla daha hızlı, güvenilir ve ekonomik olduğu belirtilmiştir. Mohanasoundaram ve Lalitha 2008 Klinik örneklerden izole ettikleri 150 *S. aureus* izolatının sahip olduğu metisilin direncinin tespitinde moleküler yöntemlerle fenotipik yöntemleri karşılaştırdığı çalışmada moleküler yöntemlerin spesifitesi ve sensivitesinin fenotipik yöntemlere oranla daha iyi olduğunu bildirmiştir. Aynı çalışmada fenotipik yöntemlerle antibiyotik direncinin tespit edilebilmei için gereken sürenin 48 saat

olduğu bu sürenin moleküler yöntemlerde 24 saate kadar dülştüğünü bildirmişlerdir. Cho ve ark. 2007 PCR ile PBP2a lateks aglütinasyon testi ve oksasilin disk difüzyon tekniğinin % 98 oranında korelasyon saptadıklarını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada metisilin direncinin araştırılmasında PCR'ın altın standart olduğunu belirtmişlerdir. Bizim çalışmamız fenotipik ve genotipik yöntemlerin karşılaştırılmasını içermediğinden ve güvenilirliği daha yüksek olduğundan metisilin direnci ve direnç genleri multipleks PCR ile araştırılmıştır. *femA* bulunduran *S.aureus*'larda metisilin direncinin bulundurmayan suşlara oranla daha güçlü olduğu belirtilmektedir (213,246,247). Cho ve ark. 2007 105 *S.aureus* izolatı üzerinde yaptıları çalışmada izolatların tamamının *femA* pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Mehrotra ve ark. 2000 İnsanlardan izole edilen 176 *S.aureus* izolatının tamamının *femA* geni taşıdığını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda biyokimyasal testlerle ve morfolojik olarak *S.aureus* olduğu bilinen izolatların tamamının *femA* geni taşıdığı belirlenmiştir. Bu durum yukarıdaki çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Çalışmamızda elde edilen bu bulgu ile *S.aureus*'larda *femA* geninin internal kontrol olarak kullanılabileceğini göstermiştir. *Staphylococcus aureus*'ların önemli bir toksinide eksfoliatif toksindir. İnsanlarda Bulloz impetigoya neden olmaktadır(205). Koagulaz pozitif 2632 S.aureus suşundan % 6,2'sinin eksfoliatif toksin ürettiğini bildirmişlerdir. Johnson ve ark. 1991 88 *S.aureus* izolatı üzerinde yaptıkları çalışmada 7 adet *eta* pozitif 2 adet *etb* pozitif suş saptadıklarını bildirmişlerdir. Akineden ve ark. 2001 Sığır mastitslerinden izole ettikleri 103 *S. aureus*'tan hiçbirisinin *eta* ve *etb* içermediğini bildirmişlerdir. Becker ve ark. 2001 farklı kaynaklardan izole ettikleri 429 *S. aureus* izolatından sadece 5 tanesinin eksfoliatif toksin genine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Van Duijkeren ve ark. 2008 Domuz çifliklerinden izole ettikleri MRSA'lardan hiçbirinin eksfoliatif toksin taşımadığını bildirmiştir. de Sousa ve ark. 2007 Sığır, koyun, keçi ve bufoladan aldıkları süt numunelerinden izole ettikleri 84 *Staphylococcus* spp.'nin hiçbirisinde *etd*'ye rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamız kapsamında izolatların *eta ve etb* genleri m PCR ile incelenmiştir. İzolatlardan hiçbirisinin *eta* ve *etb* geni taşımadığı bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda elde edilen bulgular hayvansal kökenli *S. aureus*'lar üzerinde yapılan diğer çalışmalarla benzer bulgulara sahiptir.

Sonuç olarak; çalışmamız kapsamında farklı işletme ve sürülerden aldığımız mastitis şüpheli sütlerin taranmasında kullanılan CMT testi süt kültürü ile tam bir korelasyon sağlamamıştır. Bunun nedeni ülkemizdeki süt sığırı yetiştiriciliğinde bilinçsiz antibiyotik kullanılması olabilir. Süt numuneleri alınmadan yetiştiricinin ineklere antibiyotik vermesi süt kültüründe etkenlerin üremesini inhibe etmiş olabilir. Çalışmamızda mastitis etiyolojisinde rol oyanayan primer etken *S. aureus*'tu. Ancak bu konuda yapılan diğer çalışmalar ve bizim çalışmamız CNS' lerin ilerleyen dönemde mastitis etiyolojisinde önemli rol oyanayabileceğini göstermektedir. Bunun nedeni ülkemizde özellikle kırsal kesimde ineklerin hala elle sağılması ve sağımcıların hijyen koşullarına yeterince dikkat etmemesidir. İzole edilen *S. aureus*'ların önemli oranda (%7) *mecA* genine sahip olduğu görüldü. Bu oran diğer ülkelerde yapılan çalışmalar göz önüne alnıdğında oldukça yüksektir. Eğer veteriner hekimlikte kullanılan ilaçların özellikle antibiyotiklerin kullanımı konusunda tedbir alınmasa bu oran ilerleyen yıllarda daha da artacaktır. Ayrıca *S. aureus*'ların tamamında *fem*A pozitifliği görülmüştür. *S.aureus'*un identifikasyonunda *femA*'nın internal kontrol olarak kullanılabileceği görüldü. Çalışmamızda izole edilen *S.aureus*'lardan hiçbirisinde eksfoliatif toksin genleri olan *eta* ve *etb* geni gösterilememiştir. Bu durum eksfoliatif toksinin mastitis patogenezinde önemli bir virülens faktörü olmadığını göstermektedir. Ancak *eta* ve *etb* genleri plazmit veya profaj üzerinde olduğundan ilerleyen çalışmalarda plazmit ekstraksiyonu yöntemiyle plazmitlerinde incelenmesi eksfoliatif toksinin inek mastitislerinin etiyolojisindekini yerinin belirlenmesinde büyük yarar sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. El Zubeir IEM, El Owni OAO. Seasonal Variation of Incidences and Etiological Agents of Bovine Mastitis in Friesian Cattle in Sudan. Research J Animal and Veterinary Sciences 2006; 1(1): 25-29

2. Sato K, Bartlett PC, Alban L, Agger JF, Houe H. Managerial and Environmental Determinants of Clinical Mastitis in Danish Dairy Herds. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2008; 50(4):1-8

3. Fox LK, Bayles KW, Bohach GA. *Staphylococcus aureus* Mastitis. In: Honeymoon AL, Fredman H, Bendinelli M (eds), *Staphylococcus aureus* İnfection and Disease. Newyork, Kluwer Academic Publisher, 2002 :271-289

4. Fox, LK, Shook GE, Schultz LH. Factors Related to Milk Loss in Quarters with Low Somatic Cell Counts. J Dairy Sci 1985; 68**:**2100-2107.

5. Tekeli T. Mastitis. In Tekeli T, Erdem H, Akın N, İnal M, Torlak E (eds), AB Sürecinde Kaliteli Süt Üretimi ve Somatik Hücre Sayısı . Konya, Güzeliş Ofsetmatbaa, 2005: 19-35.

6. Anonim: http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=4053

7. Göktolga ZG, Karkacıer O, Çiçek A. İşlenmiş Süt ve Süt Ürünleri Sanayinde Süt Teşvik Pirimi Politikasının Analizi. GOÜ Ziraat Fakültesi Dergisi 2004; 21(2):49-55

8. Shwimmer A, Freed M, Blum S, Khatib N, Weissblit L, Friedman S, Elad D. Mastitis Caused by Yersinia pseudotuberculosis in Israeli Dairy Cattle and Public Health Implications. Zoonoses Public Health 2007; 54:353–357

9. Rawool DB, Malik SV, Shakuntala I, Sahare AM, Barbuddhe SB. Detection of Multiple Virulence-Associated Genes in *Listeria monocytogenes* İsolated from Bovine Mastitis Cases. Int J Food Microbiology 2007; 113(2):201-207

10. Zadoks R, Leeuwen WV, Barkema H, et al. 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 Clınıcal Microbıology 2000; 38(5):1931–1939

11. Bradley AJ. Bovine Mastitis: An Evolving Disease. The Veterinary Journal 2002; 164:116-128

12. Colleau JJ, Bihan-Duval EL. A Simulation Study Mastitis Resistance of Selection Methods to Improve Dairy Cows. J Dairy Sci 1995; 78:659-671

13. Mcdonald JS. Bovine Mastitis: Introductory Remarks**.** J Dairy Sci 197; 62:117-118

14. Huijps K, Lam TJGM, Hogeveen H. Costs of Mastitis: Facts and Perception. J Dairy Research 2008; 75:113–120.

15. Rajala-Schultz PJ, Grohn YT, Mcculloch CE, Guard CL. Effects of Clinical Mastitis on Milk Yield in Dairy Cows. J Dairy Sci 1999; 82:1213–1220

16. Kossaibati MA, Esslemont RJ. The Costs of Production Diseases in Dairy Herds in England. Vet J 1997;154(1):41-51

17. Rısco CA, Donovan GA, Hernandez J. Clinical Mastitis Associated with Abortion in Dairy Cows. J Dairy Sci 1999; 82:1684–168

18. Schrick FN, Hockett ME, Saxton AM, et al. Influence of Subclinical Mastitis During Early Lactation on Reproductive Parameters. J Dairy Sci 2001; 84:1407–1412

19. Houben EHP, Dıjkhuızen AA, Van arendonkz JAM, Huırne RM. Short and Long-Term Production Losses and Repeatability of Clinical Mastitis in Dairy Cattle. J Dairy Sci 1993; 76:2561-2578

20. Komine Y, Komine K, Kai K. A New Diagnostic İndicator Using Cocanavalin a Low Affinity Lactoferrin Levels in Mammary Gland Secretion in Mastitic Diary Cows. J Vet Med Sci 2006; 68(1):59-63

21. Park YK, Koo HC, Kim SH, et al. The Analysis of Milk Components and Pathogenic Bacteria Isolated from Bovine Raw Milk in Korea. J Dairy Sci 2007; 90:5405–5414

22. Pyörälä S. Indicators of Inflammation in the Diagnosis of Mastitis. Vet Res 2003; 34:565–578

23. Eberhart RJ. Management of Dry Cows to Reduce Mastitis. J Dairy Sci 1986; 69:1721-1732

24. Cremonesi P, Castiglioni B, Malferrari G, et al. Technical Note: Improved Method for Rapid DNA Extraction of Mastitis Pathogens Directly from Milk. J Dairy Sci 2006; 89:163–169

25. Baştan A. İneklerde Meme Hastalıkları. Hatipoğlu Basım ve Yayım San. Tic. LTD. ŞTİ. 2002. 33-84

26. Larsen HD, Sloth KH, Elsberg C, et al. The Dynamics of *Staphylococcus aureus* İntramammary İnfection in Nine Danish Dairy Herds. Veterinary Microbiology 2000; 71: 89-101

27. Rabello RF, Souza CRVM, Duarte RS, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates Recovered from Bovine Mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. J Dairy Sci 2005; 88:3211–3219

28. Daley MJ, Coyle PA, Wıllıams TJ. *Staphylococcus aureus* Mastitis: Pathogenesis and Treatment with Bovine Interleukin-1β and Interleukin-2. J Dairy Sci 1991; 74:4413-4424

29. Rişvanlı A. Elazığ Bölgesi Süt İneklerinde Klinik ve Subklinik Mastitislerin Dağılımı, Mastitislere Sebep olan mikroorganizmaların İzolasyonu ve Antibiyotiklere Duyarlılıkları Üzerine Çalışma, Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Elazığ 2001

30. Hogan J, Smıth KL. Coliform mastitis. Vet Res 2003; 34:507–519

31. Blowey R, Edmondson P. Teat Disinfection in Dairy Herds British Veterinary Association 1996; 18:254-260

32. Haveri M, Hovinen M, Roslof A, Pyorala S. Molecular Types and Genetic Profiles of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Bovine Intramammary Infections and Extramammary Sites. J Clınıcal Mıcrobıology 2008; 46(11):3728–3735

33. Bishop JR, Bodine AR, Janzen JJ. Sensivities to Antibiotics and Seasonal Occurence of Mastitis Patogens J Dairy Sci 1980; 63(7):1134-1137

34. Morse D, Delorenzo MA, Natzke RP, Bray DR, Charecterization of Clinical Mastitis Records From One Herd in a Subtropical Environment. J Dairy Sci 1988; 71(5):1396-1405

35. Barkema HW, Schukken YH, Lam TJGM, et al. Management Practies Associated with Low, Medium and High Somatic Cell Counts in Bulk Milk. J Dairy Sci 1998; 81(7):1917-1927

36. Elbers AR, Miltenburg JD, Delange D, et al. Rics Factors for Clinical Mastitis in Random Sample of Dairy Herds from the Southern Part of the Netherlands. J Dairy Sci 1998; 81(2):420-426

37. Jain NC. Comman Mammary Pathogens and Factors in İnfection and Mastitis. J Dairy Sci 1979; 62(1):128-134.

38. Jones TO. A rewiev of Teat Factors in Bovine E.coli Mastitis Vet Rec 1986; 118:507-509

39. Oz H, Farnsworth RT, Larson VL. Enviromental Mastitis. Vet Bull 1985; 55(11):829-839

40. Schukken YH, Grommers FJ, Vandegeer D, Brand A. İncidence of Clinical Mastitis on Farms with Low Somatic Cell Counts in Milk. Vet Rec 1989; 125:60-63

41. Philpot WN. Control of Mastitis by Hygiene and Therapy. J Dairy Sci 1979; 62:168-176

42. Todhunter DA, Smith KL, Hogan JS. Environmental Streptecoccal Intramammary İnfections of the Bovine Mammary Gland. J Dairy Sci 1995; 78(11):2366-2374

43. Barkema HW, Schukken YH, Lam TJGM, et al. İncidence of Clinical Mastitis in Dairy Herds Grouped in Three Categories by Bulk Milk Somatic Cell Counts. J Dairy Sci 1998; 81(2):411-419

44. Kawai K, Hagiwara S, Anri A, H. Nagahata. Lactoferrin Concentration in Milk of Bovine Clinical Mastitis. Veterinary Research Communications 1999; 23: 391-398

45. Chaneton L, Tirante L, Maito J, et al. Relationship Between Milk Lactoferrin and Etiological Agent in the Mastitic Bovine Mammary Gland. J Dairy Sci 2008; 91:1865–1873

46. Sordillo LM, Streicher KL. Mammary Gland Immunity and Mastitis Susceptibility. J Mammary Gland Biology and Neoplasia 2002; 7(2): 135-146

47. Waage S, Mork T, Roros A, Bacteria Associated with Clinical Mastitis in Dairy Heifers. J Dairy Sci 1999; 82:712–719

48. Pitkala A, Haveri M, Pyorala S, Myllys V, Honkanen-Buzalski T. Bovine Mastitis in Finland 2001—Prevalence, Distribution of Bacteria, and Antimicrobial Resistance. J Dairy Sci 2004; 87:2433–2441

49. Ferguson JD, Azzaro G, Gambina M, Licitra G. Prevalence of Mastitis Pathogens in Ragusa, Sicily, from 2000 to 2006. J Dairy Sci 2007; 90:5798–5813

50. Sargeant JM., Scott HM, Leslie KE, Jane MI, Bashiri A. Clinical Mastitis in Dairy Cattle in Ontario: Frequency of Occurrence and Bacteriological İsolates. Can Vet J 1998; 39: 33-38

51. Khan AZ, Muhammad G. Quarter-Wıse Comparatıve Prevalence of Mastıtıs ın Buffaloes and Crossbred Cows. Pakistan Vet J 2005; 25(1):9-12

52. Watts JL, Pankey JW, Oliver WM, Nickerson SC, Lazarus AW. Prevalence and Effects of Intramammary Infectıon ın Beef Cows. J Anita Sci 1986;62:16-20

53. Kitchen BJ, Mıddleton G, Durward IG, Andrews RJ, Salmon MC. Mastitis Diagnostic Tests to Estimate Mammary Gland Epithelial Cell Damage. J Dairy Sci 1980; 63:978-983

54. Akan M. Staphylococcus infeksiyonları. In: Aydın N, Paracıkoğlu J (eds), Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). Ankara, İlke Emek Yayınları, 2006; 5-13

55. Bourry A, Cochard T, Poutrel B. Serological Diagnosis of Bovine, Caprine, and Ovine Mastitis Caused by *Listeria monocytogenes* by Using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. J Clınıcal Mıcrobıology 1997; 35(6):1606–1608

56. Flöck M, Winter P. Diagnostic Ultrasonography in Cattle with Diseases of the Mammary Gland. The Veterinary Journal 2006; 171:314–321

57. Watts JL, Owens WE Evaluation of the Rapid Mastitis Test for Identification of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* Isolated from Bovine Mammary Glands. J Clınıcal Mıcrobıology 1988; 26(4):672-674

58. Sanford CJ, Keefe GP, Sanchez J, et al. Test Characteristics from Latent-Class Models of the California Mastitis Test. Preventive Veterinary Medicine 2006; 77: 96–108

59. Younan M, Ali Z, Bornstein S, Müler W. Application of the California Mastitis Test in İntramammary *Streptecoccus agalactia* and *Staphylococcus aureus* İnfections of Camels(Camelus dromedarius) in Kenya. Preventive Veterinary Medicine. 2001; 51:307-316

60. Shitandi A, Kihumbu G. Assessment of the California Mastitis Test Usage in Smallholder Dairy Herds and Risk of Violative Antimicrobial Residues. J Vet Sci 2004; 5(1):5–9

61. Sheldrake RF, Mcgrego GD. R, Hoare RJT. Somatic Cell Count, Electrical Conductivity, and Serum Albumin Concentration for Detecting Bovine Mastitis. J Dairy Sci 1983; 66:548-555

62. Cedden F, Kor A, Keskin S. Laktasyonun Geç Döneminde Keçi Sütünde Somatik Hücre Sayımı; Yaş, Süt Verimi ve Bazı Meme Özellikleri ile Olan İlişkileri. J Agric Sci 2002; 12(2):63-67

63. Moon JS, Koo HC, Joo YS, et al. Application of a New Portable Microscopic Somatic Cell Counter with Disposable Plastic Chip for Milk Analysis. J Dairy Sci 2007 90:2253–2259

64. McDougall S, Murdough P, Pankey W, et al. Relationships Among Somatic Cell Count, California Mastitis Test, İmpedance and Bacteriological Status of Milk in Goats and Sheep in Early Lactation Small Ruminant Research. Small Ruminant Research 2001; 40:245-254.

65. Norberg E. Electrical Conductivity of Milk as a Phenotypic and Genetic İndicator of Bovine Mastitis: A review. Livestock Production Science 2005; 96: 129–139

66. Norberg E, Hogeveen H, Korsgaard IR, et. al. Electrical Conductivity of Milk: Ability to Predict Mastitis Status. J Dairy Sci 2004; 87:1099–1107

67. Kul E, Erdem H, Atasever S. Süt Sığırlarında Farklı Meme Özelliklerinin Mastitis ve Süt Somatik Hücre Sayısı Üzerine Etkileri. J Fac of Agric 2006; 21(3):350-356

68. Milner P, Page KL, Hıllerton JE. The Effects of Early Antibiotic Treatment Following Diagnosis of Mastitis Detected by a Change in the Electrical Conductivity of Milk. 1997 J Dairy Sci 1996; 80:859–863

69. Keefe GP. *Streptococcus agalactiae* Mastitis: A Review. Can Vet J 1997; 38:429-437

70. Dinsmore RP, Englısh PB, Gonzalez RN, Sears PM. Use of Augmented Cultural Techniques in the Diagnosis of the Bacterial Cause of Clinical Bovine Mastitis. J Dairy Sci 1992; 75:2706-2712

71. Koess C, Hamann J. Detection of Mastitis in the Bovine Mammary Gland by Flow Cytometry at Early Stages. J Dairy Research 2008;75:225–232

72. Boerlin P, Kuhnert P, Hussy D, Schaellibaum M. Methods for Identification of *Staphylococcus aureus* Isolates in Cases of Bovine Mastitis. J Clınıcal Mıcrobıology, 2003; 41:767–771

73. Riffon R, Sayasıth K, Khalil H, et. al. Development of a Rapid and Sensitive Test for Identification of Major Pathogens in Bovine Mastitis by PCR. J Clinical Microbiology 2001; 39(7):2584–2589

74. Thomas EJG, Kıng RK, Burchak JACK, Gannon VPJ. Sensitive and Specific Detection of *Listeria monocytogenes* in Milk and Ground Beef with the Polymerase Chain Reaction. Applied and Environmental Microbıology 1991;57(9):2576-2580

75. Vasudevan P, Nair MKM, Annamalai T, Venkitanarayanan KS. Phenotypic and Genotypic Characterization of Bovine Mastitis İsolates of *Staphylococcus aureus* for Biofilm Formation. Veterinary Microbiology 2003; 92:179–185

76. Lange C, Cardoso M, Senczek D, Schwarz S. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* İsolates from Cases of Bovine Mastitis in Brazil. Vet Microbiol 1999; 67(2):127-141.

77. Lee KH, Lee JW, Wang SW, et. al. Development of a Novel Biochip for Rapid Multiplex Detection of Seven Mastitis-Causing Pathogens in Bovine Milk Samples. J Vet Diagn Invest 2008; 20:463–471

78. Kubota M, Hayashi T, Iwasaki K, et. al. Rapid and Effective Method for Separation of *Staphylococcus aureus* from Somatic Cells in Mastitis Milk. J Dairy Sci 2007; 90:4100–4107

79. Graber HU, Casey MG, Naskova J, Steiner A, Schaeren W, et. al. Development of a Highly Sensitive and Specific Assay to Detect *Staphylococcus aureus* in Bovine Mastitic Milk. J Dairy Sci 2007; 90:4661–4669

80. Gillespie BE, Oliver SP. Simultaneous Detection of Mastitis Pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis,* and *Streptococcus agalactiae* by Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction. J. Dairy Sci 2005; 88:3510–3518

81. Anonim: http://www.textbookofbacteriology.net/staph.html

82. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJC, Leonard FC. Veterinary Microbiology and Microbial Diseases (First Published). MPG Books, Cornwall, 2002:43-48

83. Cengiz AT. Staphylococcus. In: Ustaçelebi Ş (eds), Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara, Güneş Kitapevi, 1999; 339-347

84. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Diagnostic Microbiology (Eleventh edition). Mosby, Missouri, 1998:285-296

85. Sordillo LM, Nıckerson SC. Pathology of Staphyloccus aureus Mastiffs During Lactogenesis: Relationships with Bovine Mammary Structure and Function. J Dairy Sci 1989; 72:228-240

86. Nickerson SC, Owens WE, Boddıe RL. Mastitis in Dairy Heifers: Initial Studies on Prevalence and Control. J Dairy Sci 1995; 78:1607-1618

87. Türütoğlu H, Ateşoğlu A, Salihlioğlu H, Öztürk M. Marmara Bölgesi Süt İneklerinde Mastitise Neden Olan Etkenler. Pendik Vet Mikrobiyol Derg 1995; 26:125-137.

88. Kuyucuoğlu Y ve Uçar M**,** Afyon Bölgesi Süt İneklerinde Subklinik ve Klinik Mastitislerin Görülme Oranları ve Etkili Antibiyotiklerin Tespiti. Vet Hek Mikrobiol Derg 2001; 1:19-24.

89. Lakew M, Tolosa T, Tigre W. Prevalence and Major Bacterial Causes of Bovine Mastitis in Asella, South Eastern Ethiopia. Trop Anim Health Prod. 2009;41(7):1525-1530.

90. Nagahata H, Ito H, Maruta H, et. al. Controlling Highly Prevalent *Staphylococcus aureus* Mastitis from the Dairy Farm. J Vet Med Sci 2007; 69(9):893–898

91. Tollersrud T, Kenny K, Caugant DA, Lund A. Characterisation of İsolates of *Staphylococcus aureus* from Acute, Chronic and Subclinical Mastitis in Cows in Norway. APMIS 2000;108: 565–72

92. Gudding R, McDonald JS, Cheville FN. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Mastitis: Bacteriologic, Histologic and Ultrastructural Pathologic Findings. Am J Vet Res 1984; 45:2525-2531.

93. Nickerson SC, Heald CW. Cells in Local Reaction to Experimental *Staphylococcus aureus* Infection in Bovine Mammary Gland. J Dairy Science 1982; 65(1):105-116

94. Nickerson SC. Control of Heifer Mastitis: Antimicrobial Treatment An Overview. Veterinary Microbiology 2009;134:128–135

95. Barkema HW, Schukken YH, Zadoks RN. Invited Review: The Role of Cow, Pathogen, and Treatment Regimen in the Therapeutic Success of Bovine *Staphylococcus aureus* Mastitis. J Dairy Sci 2006; 89:1877–1895

96. Eberhart RJ. Management of Dry Cows to Reduce Mastitis**.** J Dairy Sci 1986;69:1721-1732

97. Erksine RJ, Bartlett PC, Crawshaw PC, Gombas DM. Efficacy of İntramuscular Oxytetracycline as a Dry Cow Treatment for *Staphylococcus aureus* Mastitis. J Dairy Sci 1994; 77:3347-3353.

98. Owens WE, Watts JL, Boddie RL, Nickerson SC. Antibiotic Treatment of Mastitis: Comparison of İntramammary and İntramammary Plus İntramuscular Therapies. J Dairy Sci 1988; 71:3143-3147

99. Sandholm M, Kaartinen L, Pyorala S. Bovine Mastitis Why Does Antibiotic Therapy not Always Work? An Overview. J Vet Pharmacol Ther 1990;13:248–260.

100. Soback S, Saran A. New Antimicrobial agents in Mastitis Therapy. In: Hogeveen H (eds), Mastitis in Dairy Production. First ed. The Netherlands, Wageningen Academic Publishers, 2005;53:58

101. Gentilini E, Denamiel G, Lorente P. Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis in Argentina. J Dairy Sci 2000; 83:1224–1227

102. Lacasse P, Lauzon K, Diarra MS, Petitclerc D. Utilization of Lactoferrin to Fight Antibiotic-Resistant Mammary Gland Pathogens. J Anim Sci 2008; 86:66-71

103. Erksine RJ, Walker RD, Bolin CA, Bartlett PC, White DG. Trends in Antibacterial Susceptibility of Mastitis Pathogens During a Seven-Year Period. J Dairy Sci 2002; 85:1111–1118

104. Costa EO, Benites NR, Guerra JL, Melville PA. Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus* spp. Isolated from Mammary Parenchymas of Slaughtered Dairy Cows. J Vet Med 2000; 47:99–103 ,

105. Hendriksen RS, Mevius DJ, Schroeter A, et. al. Prevalence of Antimicrobial Resistance Among Bacterial Pathogens İsolated from Cattle in Different European Countries: 2002–2004. Acta Veterinaria Scandinavica 2008; 50(28): 1-10

106. Nunes SF, Bexiga R, Cavaco LM, Vilela CL. Technical Note*:* Antimicrobial Susceptibility of Portuguese Isolatesof *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in Subclinical Bovine Mastitis. J Dairy Sci 2007; 90:3242–3246

107. Panlilio AL, Culver DH, Gaynes RP, et. al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ın U.S. Hospıtals, 1975-1991. Infect Control Hosp Epidemiol 1992;13:582-586

108. www.rivm.nl/earss/.../EARSS%202007_FINAL_tcm61-55933.pdf

109. Salat O, Serieys F, Poutrel B, Durel L, Goby L. Systemic Treatment of Subclinical Mastitis in Lactating Cows with Penethamate Hydriodide. J Dairy Sci 2008; 91:632–640

110. Broadsent JR, Chou YC, K. Gıllıes, Kondo JK. Nisin Inhibits Several Gram-Positive, Mastitis-Causing Pathogens. J Dairy Sci 1989; 72:3342-3345

111. Nair MKM, Joy J, Hinckley VL, Hoagland TA,Venkitanarayanan KS. J Dairy Sci 2005; 88:3488–3495

112. Moon JS, Kim HK, Koo HC, et. al. The Antibacterial and İmmunostimulative Effect of Chitosanoligosaccharides Against İnfection by *Staphylococcus aureus* İsolated from Bovine Mastitis. Appl Microbiol Biotechnol 2007;75:989–998

113. Coelho MLV, Nascimento JS, Fagundes PC, et. al. Activity of Staphylococcal Bacteriocins Against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* İnvolved in Bovine Mastitis. Research in Microbiology 2007;158:625-630

114. Smith TH, Fox LK, Middleton JR, Outbreak of Mastitis Caused by One Strain of *Staphylococcus aureus* in a Closed Dairy Herd. J Am Vet Med Assoc 1998; 212**:**553-556

115. Tenhagen BA, Edinger D, Baumgaertner B, et. al. Efficacy of a Herd-Specific Vaccine Against *Staphylococcus aureus* to Prevent Postpartum Mastitis in Dairy Heifers. J Vet Med 2001; 48: 601-607

116. Hadimli HH, Erganiş O, Kav K, Sayın Z. Evaluatıon of a Combıned Vaccıne Against Staphylococcal Mastıtıs ın Ewes**.** Bull Vet Inst 2005; 49:179-182

117. Chang BS, Moon JS, Kang HM, et. al. Protective Effects of Recombinant Staphylococcal Enterotoxin Type C Mutant Vaccine Against Experimental Bovine İnfection by a Strain of *Staphylococcus aureus* İsolated from Subclinical Mastitis in Dairy Cattle. Vaccine 2008; 26:2081-2091

118. Pellegrino M, Giraudo J, Raspanti C, et. al. Experimental Trial in Heifers Vaccinated with *Staphylococcus aureus* Avirulent Mutant Against Bovine Mastitis. Veterinary Microbiology 2008; 127:186-190

119. Leitner G, Yadlin N, Lubashevsy E, et. al. Development of a *Staphylococcus aureus* Vaccine Against Mastitis in Dairy Cows. II. Field Trial. Veterinary Immunology and Immunopathology 2003; 93:53-158

120. Karchmer AW. Nosocomial Bloodstream İnfections: Organisms, Risk Factors and İmplications. Clin Infect Dis 2000;31:139-143

121. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, et. al. Comparison of Mortality Associated with Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia: a Meta- analysis. Clin Infect Dis 2003;36:53-9

122. Herwaldt LA. Control of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the Hospital Setting. Am J Med 1999;106:48-52

123. Stefani S, Varaldo PE. Epidemiology of Methicillin-Resistant Staphylococci in Europe Clin Microbiol Infect 2003; 9:1179-1186

124. Kuehnert MJ, Hill HA, Kupronis BA, Tokars JI, Solomon SL, Jernigan DB Methicillin-Resistant-*Staphylococcus aureus* Hospitalizations, United States. Emerg Infect Dis 2005;11:868-872

125. Cuevas O, Cercenado E, Vindel A, et. al. Evolution of the Antimicrobial Resistance of *Staphylococus* spp. in Spain: Five Nationwide Prevalence Studies. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48:4240-4245

126. Simor AE, Ofner-Agostini M, Bryce E, et al. The Evolution of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* in Canadian Hospitals: 5 years of National Surveillance. CMAJ 2001;165:21-26

127. Barber, M. Methicillin-resistant staphylococci. J Clin Pathol 1961;1**4:**385–393

128. McDougal LK, Thornsberry C. The Role of Beta-lactamase in Staphylococcal Resistance to Penicillinase-Resistant Penicillins and Cephalosporins. J Clin Microbiol 1986;23**:**832-839

129. Tomasz A, Drugeon HB, de Lencastre HM, Jabes D, McDougal L, Bille J. New Mechanism for Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*: Clinical İsolates that Lack the PBP 2a Gene and Contain Normal Penicilin binding Proteins with Modified Penicillin-Binding Capacity. Antimicrob. Agents Chemother 1989; 33**:**1869-1874

130. Chambers HF. Methicillin Resistance in Staphylococci: Molecular and Biochemical Basis and Clinical İmplications. Clin Microbiol Rev 1997;10**:**781-791

131. Fasola EL, Peterson LR. Laboratory Detection and Evaluation of Antibiotic-Resistant *Staphylococcus aureus* Nosocomial İnfections. In: Weinstein RS, Gram AR (eds). Advances in Pathology, Volume V. Chicago, IL. Mosby-Year Book, 992:285-306

132. Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The Emergence and Evolution of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol 2001; 9**:**486-493

133. Song MD, Wachi M, Doi M, Ischino F, Matsuhashi M. Evolution of an İnducible Penicillin-Target Protein in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Gene Fusion. FEBS Lett 1987;221**:**167-171

134. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A New Class of Genetic Element, Staphylococcus Cassette Chromosome *mec*, Encodes Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44**:**1549-1555

135. Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, Hiramatsu K. Structural Comparison of Three Types of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* İntegrated in the Chromosome in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2001 45**,** 1323–1336

136. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, Data Summary From January 1992 Through June 2004, İssued October 2004. Am. J. Infect. Control 2004; 32:470–485

137. Jones ME, Draghi DC, Thornsberry C, Karlowsky JA, Sahm DF, Wenzel RP Emerging Resistance Among Bacterial Pathogens in the İntensive Care Unit European and North American Surveillance Study 2000–2002. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2004; 29:3–14

138. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, et al. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Carrying Panton-Valentine Leukocidin Genes: Worldwide Emergence. Emerg Infect Dis 2003; 9:978–984

139. McCormick JK, Yarwood JM, Schlievert PM. Toxic Shock Syndrome and Bacterial Superantigens: An Update Annu Rev Microbiol 2001; 55:77-104

140. Francis JS, Doherty MC, Lopatin U, et al. Severe Community-Onset Pneumonia in Healthy Adults Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Carrying the Panton-Valentine Leukocidin Genes. Clin Infect Dis 2005;40:100–107

141. Miller LG, Perdreau-Remington F, Rieg G, et al. Necrotizing Fasciitis Caused by Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Los Angeles. N Engl J Med 2005; 352:1445–1453

142. Fey PD, Said-Salim B, Rupp ME, et al. Comparative Molecular Analysis of Community or Hospital-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus.* Antimicrob Agents Chemother 2003;47:196–203

143. Juhász-Kaszanyitzky É, Jánosi S, Somogyi P, et. al. MRSA Transmission Between Cows and Humans. Emerging Infectious Diseases 2007; 13(4):630-632

144. Van Duijkeren E, Ikawaty R, Broekhuizen-Stins MJ, et. al. Transmission of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Between Different Kinds of Pig Farms Vet Microbiol 2008 25; 126(4):383-389

145. Seguin JC, Walker RD, Caron JP, et. al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Outbreak in a Veterinary Teaching Hospital: Potential Human-to-Animal Transmission. J Clin Microbiol 1999; 37(5):1459-1463

146. Strommenger B, Kehrenberg C, Kettlitz C, et. al. Molecular Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains from Pet Animals and Their Relationship to Human İsolates. J Antimicrobial Chemotherapy 2006; 57:461–465

147. Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. CLSI/ NCCLS document 2005; CLSI, Wayne, PA.

148. Yamazumi T, Furuta I, Diekema DJ, Pfaller MA, Jones RN. Comparison of the Vitek Gram-Positive Susceptibility 106 Card, the MRSA-Screen Latex Agglutination Test, and *mec*A Analysis for Detecting Oxacillin Resistance in a Geographically Diverse Collection of Clinical İsolates of Coagulase-Negative Staphylococci. J Clin Microbiol 2001;39*:*3633–3636

149. Swenson JM, Williams PP, Killgore G, O'Hara CM, Tenover FC. Performance of Eight Methods, İncluding Two New Rapid Methods for Detection of Oxacillin Resistance in a Challenge Set of *Staphylococcus aureus* Organisms. J Clin Microbiol 2001; 39:3785-3788

150. Paule SM, Pasquariello AC, Hacek DM, et al. Direct Detection of *Staphylococcus aureus* from Adult and Neonate Nasal Swab Specimens Using Real-Time Polymerase Chain Reaction. J Mol Diagn 2004; 6:191-196

151. Warren DK, Liao RS, Merz LR, Eveland M, Dunne WM. Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Directly from Nasal Swab Specimens by a Real-Time PCR Assay. J Clin Microbiol 2004; 42:5578-5581

152. Peterson LR, Petzel RA, Clabots CR, Fasching CE, Gerding DN Medical Technologists Using Molecular Epidemiology as Part of the İnfection Control Team. Diagn Microbiol Infect Dis 1993; 16:303-311

153. Berger-Bächi B. Resistance not Mediated by β-lactamase (methicillin resistance). In: Crossley KB, Archer GL (eds), The Staphylococci in Human Disease. New York, Churchill Livingstone, 1997:158-167

154. Berger-Bächi B, Rohrer S. Factors İnfluencing Methicillin Resistance in Staphylococci. Arch Microbiol 2002; 178:165-171

155. Hackbarth CJ, Miick C, Chambers HF. Altered Production of Penicillin-Binding Protein 2a Can Affect Phenotypic Expression of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus.* Antimicrob Agents Chemother 1994; 38:2568-2571

156. Murakami K, Tomasz A. Involvement of Multiple Genetic Determinants in High-Level Methicillin Resistance in *Staphylococcns aureus.* J Bacteriol 1989; 171:874–879

157. Berger-Bächi B, Barberis-Maino L, Strassle A, Kayser FH. *Fem*A, A Host-Mediated Factor Essential for Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* Molecular Cloning and Characterization. Mol Gen Genet 1989; 219:263-269

158. Chambers HE. Methicillin Resistance in Staphylococci: Molecular and Biochemical Basis and Clinical İmplications. Clin Microbiol Rev 1997; 10:781-791

159. Berger-Bächi B. Insertional inactivation of staphylococcal methicillin resistance by Tn*551*. J Bacteriol 1983; 154:479-487

160. Gilmore KS, Gilmore MS, Sahm DF. Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. In: Wax RG, Lewis K, Salyers AA, Taber H (eds), Bacterial Resistance to Antimicrobials 2 nd ed. Boca Raton, CRC press, 2008: 291-312

161. Chambers HF. Penicillin-Binding Protein-Mediated Resistance in Pneumococci and Staphylococci. J Infect Dis 1999; 179:353-359

162. Zhang HZ, Hackbarth CJ, Chansky KM, Chambers HF. A Proteolytic Transmembrane Signaling Pathway and Resistance to β-lactams in Staphylococci. Science 2001; 291:1962-1965

163. de Jonge BL, Sidow T, Chang YS, et. al. Altered Muropeptide Composition in *Staphylococcus aureus* Strains with an İnactivated *femA* Locus. J Bacteriol 1993; 175:2779-2782

164. Roher S, Ehlert K, Tschierske M, Labischinski H, Berger-Bächi B. The essential *Staphylococcus aureus* Gene *fmhB* is İnvolved in the First Step of Peptidoglycan Pentaglycine İnterpeptide Formation. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96:9351-9356

165. Henze U, Sidow T, Wecke J, Labischinski H, Berger-Bächi B. Influence of *femB* on Methicillin Resistance and Peptidoglycan Metabolism in *Staphylcoccus aureus.* J Bacteriol 1993; 175:1612-1620

166. Berger-Bächi B, Strassle A, Gustafson JE, Kayser FH. Mapping and Characterization of Multiple Chromosomal Factors İnvolved in Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus.* Antimicrob Agents Chemother 1992; 36:1367-1373

167. Glanzmann P, Gustafson J, Komatsuzawa H, Ohta K, Berger-Bächi B. *glmM* Operon and Methicillin-Resistant *glmM* Supressors Mutants in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43:240-245

168. Berger- Bächi B. Genetic Basis of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. Cell Mol Life Sci 1999; 56:764-770

169. Cheung AL. Regulation of Virulence Determinants in *Staphylococcus aureus*. In: Honeymoon AL, Fredman H, Bendinelli M (eds), *Staphylococcus aureus* İnfection and Disease. Newyork, Kluwer Academic Publisher, 2002:295-318

170. Duman PM, Projan SJ. The Regulation of Virulence in theStaphylococci. In: Honeymoon AL, Fredman H, Bendinelli M (eds), *Staphylococcus aureus* infection and disease. Newyork, Kluwer Academic Publisher, 2002:1-14

171. Haveri M, Taponen S, Vuopio-Varkila J, Salmenlinna S, Pyorala S. Bacterial Genotype Affects the Manifestation and Persistence of Bovine *Staphylococcus aureus*n Intramammary Infection. J Clınıcal Mıcrobıology 2005;43(2):959-961

172. Haveri M, Roslof A, Rantala L, Pyorala S. Virulence Genes of Bovine *Staphylococcus aureus* from Persistent and Nonpersistent İntramammary İnfections with Different Clinical Characteristics. J Applied Microbiology 2007 ;103:993-1000

173. Janzon L, Arvidson S. The Role of the d-Lysin Gene (*hld*) in the Regulation of Virulence Genes by the Accessory Gene Regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. EMBO J. 1990; 9:391-1399

174. Lee CY. Capsule Production In: Honeymoon AL, Fredman H, Bendinelli M (eds), *Staphylococcus aureus* infection and disease. Newyork, Kluwer Academic Publisher, 2002:35-45

175. Su C. Isolation of *Staphylococcus aureus* Candidate Virulence Determinants Related to Bovine Mastitis. Phd Thesis, The Pennsylvania State University the Graduate School Department of Veterinary Science , Pennsylvania 1999

176. Robbins JB, Schneerson R, Horwith G, et. al. *Staphylococcus aureus* Types 5 and 8 Capsular Polysaccharide-Protein Conjugate Vaccines. American Heart Journal 2004; 147:593-598

177. Mayville P, Ji G, Beavis R, Yang H, Goger M, Novick RP, Muir TW Structure-Activity Analysis of Synthetic Autoinducing Thiolactone Peptides from *Staphylococcus aureus* Responsible from Virulence. Proc Natl Acad Sci 1999; 96:1218-1223

178. Lina G, Jarraud S, Ji G, Greenland T, Pedraza T, Etienne J, Novick RP. and Vandenesch F, Trans-Membrane Topology and Histidine Kinase Activity of AgrC, the agr Signal Receptor in *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol 1998; 28:655-662

179. Baret JF, Hoch JA. Two-Component Signal Transduction as a Target for Microbial Anti-İnfective Therapy. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42:529-1536

180. Regassa LB, Novick RP, Betley MJ. Glucose and Nonmaintained pH Decrease Expression of the Accessory Gene Regulator (agr) in *Staphylococcus aureus.* Infect Immun 1992; 60: 3381-3388

181. Gillaspy AF, Pati JM, Smeltzer MS. Transcriptional Regulation of the *Staphylococcus aureus* Collagen Adhesin Gene, cna. Infect Immun 1997; 65:1536-1540

182. Bronner S, Stoessel P, Gravet A, Monteil H. and Prevost G. Variable expression of *Staphylococcus aureus* bicomponent leucotoxins semiquantifed by competitive reverse transcription-PCR. Appl Environ Microbiol 2000; 66:3931-3938

183. Goerke C, Campana S, Bayer MG, Doring G, Botzenhart K, Wolz C, Direct Quantitative Transcript Analysis of the *agr* Regulation of *Staphylococcus aureus* During Human İnfection in Comparison to the Expression pro.1 İn vitro. Infect Immun 2000; 68:304-1311

184. Peng HL, Novick RP, Kreiswirth B, Kornblum J, Schlievert P. Cloning, Characterization, and Sequencing of an Accessory Gene Regulator (agr) in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 1988; 170:4365-4372

185. Novick RP, Projan SJ, Kornblum J, Ross HF, Ji G, Kreiwirth B, Vandenesch F. Moghazeh S. The agr P2 Operon: An Autocatalytic Sensory Transduction System in *Staphylococcus aureus*. Mol Gen Genet 1995; 248:446-458

186. Akineden O, Annemu C, Hassan AA, et. al. Toxin Genes and Other Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolates from Milk of Cows with Mastitis. Clınıcal and Dıagnostıc Laboratory Immunology 2001; 8(5): 959-969

187. Kenny Kevın, Reiser RF, Bastida-Corcuera FD, Norcross NL. Production of Enterotoxins and Toxic Shock Syndrome Toxin by Bovine Mammary Isolates of *Staphylococcus aureus*. J Clınıcal Mıcrobıology 1993; 31(3):706-707

188. Ji G, Beavis R, Novick RP. Cell Density Control of Staphylococcal Virulence Mediated by an Octapeptide Pheromone. Proc Natl Acad Sci 1995; 92:12055-12059

189. Janzon L, Lofdahl S, Arvidson S. Identification and Nucleotide Sequence of the Delta-Lysin Gene, hld, Adjacent to the Accessory Gene Regulator (agr) of *Staphylococcus aureus*. Mol Gen Genet; 1989 219:480-485

190. Janzon L, Arvidson S. The Role of the d-lysin Gene (hld) in the Regulation of Virulence Genes by the Accessory Gene Regulator (agr) in *Staphylococcus aureus*. EMBO J. 1990; 9:1391-1399

191. Zhang S, Strewart G. Staphylococcal Enterotoxins. In: Honeymoon AL, Fredman H, Bendinelli M (eds), *Staphylococcus aureus* İnfection and Disease. Newyork, Kluwer Academic Publisher, 2002 :117-130

192. Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP Quorum Sensing in Bacteria: the LuxR-LuxI Family of Cell Densityresponsive Transcriptional Regulators. J Bacteriol 1994; 176:269-275

193. Boynukara B, Gulhan T, Alişarlı M, Gürtürk K, Solmaz H. Classical Enterotoxigenic Characteristics of *Staphylococcus aureus* Strains İsolated from Bovine Subclinical Mastitis in Van, Turkey. International J Food Microbiology 2008;125:209-211

194. Ladhanı S, Joannou CL, Lochrıe DP, Evans RW, Poston SM. Clinical, Microbial and Biochemical Aspects of the Exfoliative Toxins Causing Staphylococcal Scalded-Skin Syndrome. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12:224–242

195. Plano LR. *Staphylococcus aureus* Exfoliative Toxins: How They Cause Disease. J Invest Dermatol 2004; 122:1070-1077

196. O'Toole PW, Foster TJ. Epidermolytic Toxin Serotype B of *Staphylococcus aureu*s is Plasmid-Encoded. FEMS Microbiol Lett 1986; 36: 311–314

197. Kondo I, Sakuraı S, Saraı Y, Futakı S. Two Serotypes of Exfoliatin and Their Distribution in Staphylococcal Strains İsolates From Patients With Scalded-Skin Syndrome. J Clin Microbiol 1975; 1:394–400

198. Růžıčková V, Pantůček R, Petráš P, Doškař J, Sedláček I, Rosypal S. Molecular Typing of Exfoliative Toxin-Producing *Staphylococcus aureus* Strains İnvolved in Epidermolytic İnfections. Internat J Med Microbio 2003; 292:541-545

199. Sato H, Matsumorı Y, Tanabe T, Saıto H, Shımızu A, Kawano J. A New Type of Staphylococcal Exfoliative Toxin from a *Staphylococcus aureus* Strain İsolated from a Horse with Phlegmon. *Infect Immun* 1994; 62:3780–3785

200. Yamaguchı T, Hayashı T, Takamı H, Nakasone K, Ohnıshı M, Nakayama K, Yamada S, Komatsuzawa H, Sugaı M. Phage Conversion of Exfoliative Toxin A Production in *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol 2000; 38:694–705

201. Endo Y, Yamada T, Matsunaga K, Hayakawa Y, Kaıdoh T, Takeuchı S. Phage Conversion of Exfoliative Toxin A in *Staphylococcus aureus* İsolated from Cows with Mastitis. Vet Microbiol 2003; 96:81–90

202. Warren RL. Exfoliative Toxin Plasmids of Bacteriophage Group 2 *Staphylococcus aureus*: Sequence Homology. Infect Immun 1980; 30:601-606

203. Yamaguchı T, Hayashı T, Takamı H, Ohnıshı M, Murata T, Nakayama K, Asakawa K, Ohara M, Komatsuzawa H, Sugaı M. Complete Nucleotide Sequence of a *Staphylococcus aureus* Exfoliative Toxin B Plasmid and İdentification of a Novel ADP-ribosyltransferase, EDIN-C. Infect Immun 2001; 69:7760-7771

204. Yamaguchı T, Nıshıfujı K, Sasakı M, Fudaba Y, Aepfelbacher M, Takata T, Ohara M, Komatsuzawa H, Amagaı M, Sugaı M. Identification of the *Staphylococcus aureus* Pathogenicity İsland which Encodes a Novel Exfoliative Toxin, ETD, and EDIN-B. Infect Immun 2002; 70:5835–5845

205. Nishifuji K, Sugai M, Amagai M. Staphylococcal Exfoliative Toxins: ‘‘Molecular Scissors’’ of Bacteria that Attack the Cutaneous Defense Barrier in Mammals. J Dermatological Science 2008;49: 21-31

206. Pıemont Y, Rasoamananjara D,Fouace JM, Tobıas B. Epidemiological Investigation of Exfoliative Toxin-Producing *Staphylococcus aureus* Strains in Hospitalized Patients. J Clınıcal Mıcrobıology 1984; 19(3):417-420

207. Thompson NE, Razdan M, Kuntsmann G, Aschenbach JM, Evenson ML, Bergdoll MS. Detection of Staphylococcal Enterotoxins by Enzyme-Linked İmmunosorbent Assays and Radioimmunoassays: Comparison of Monoclonal and Polyclonal Antibody systems. Appl Environ Microbiol 1986; 51:885-890

208. Růžičková V, Voller J, Pantůčeka R, Petráš P, Doškař J. Multiplex PCR for Detection of Three Exfoliative Toxin Serotype Genes in *Staphylococcus aureus.* Folia Microbiol 2005; 50 (6):499-502

209. Coleman G. The Effect of Glucose on the Differential Rates of Extracellular Protein and Alpha-toxin Formation by *Staphylococcus aureus* (Wood 46). Arch Microbiol 1983; 134:208-211

210. Balaban N, Novick RP. Autocrine Regulation of Toxin Synthesis by *Staphylococcus aureus.* PNAS; 1995; 92(5):1619-1623

211. Ji G, Beavis R, Novick RP. Bacterial İnterference Caused by Autoinducing Peptide Variants. Science;1997; 276:2027-2030

212. Melchior MB, Fink-Gremmels J, Gaastra W. Extended Antimicrobial Susceptibility Assay for *Staphylococcus aureus* isolates from Bovine Mastitis Growing in Biofilms. Veterinary Microbiology 2007; 125: 141-149

213. Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. Multiplex PCR for Detection of Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxins, Exfoliative Toxins, Toxic Shock Syndrome Toxin 1, and Methicillin Resistance. J Clınıcal Mıcrobıology 2000; 38(3): 1032-1035

214. O'Brien FG, Pearman JW, Gracey M, Riley TV, Grubb WB. Community Strain of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Involved in a Hospital Outbreak. J Clinical Microbiology 1999; 37(9): 2858-2862

215. Bekar M. Enterobacteriaceae Familyası Mikroorganizmaların Genel Karakterleri ve Tanı Yöntemleri. Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Ankara 1995, ss 8-85

216. Darling CL. Standardization and Evaluation of the CAMP Reaction for the Prompt, Presumptive Identification of *Streptococcus agalactiae* (Lancefield Group B) in Clinical Material. J Clınıcal Mıcrobıology 1975; 1(2):171-174

217. Bloser TH. Economic Losses from National Research Program on Mastitis in the United States. J Dairy Sci 1979; 62:119-127

218. Yalçın C, Cevger Y, Türkyılmaz K, Uysal G. Estimation of Milk Yield Losses from Subclinical Mastitis in Dairy Cows. Turk J Vet Anim Sci. 2000; 24:599:604

219. Dingwell RT, Leslie KE, Schukken YH, Sargeant JM, Timms LL. Evaluation of the California Mastitis Test to Detect an İntramammary İnfection with a Major Pathogen in Early Lactation Dairy Cows. Can Vet J 2003; 44:413–416

220. Middleton JR, Hardin D, Steevens B, Randle R, Tyler JW. Use of Somatic Cell Counts and California Mastitis Test Results from İndividual Quarter Milk Samples to Detect Subclinical İntramammary İnfection in Dairy Cattle from a Herd with a High Bulk Tank Somatic Cell Count. J American Veterinary Medical Association 2004; 224(3): 419-423

221. Luedecke LO, Forster TL, Ashworth US. Relationship Between California Mastitis Test Reaction and Leucocyte Count, Catalase Activity, and A-esterase Activity of Milk from Opposite Quarters. J Daıry Scıence 1967; 50(10): 1592-1596

222. Barnum DA, Newbouldt FHS. The Use of the Calıfornıa Mastıtıs Test for the Detectıon of Bovıne Mastıtıs. Can Vet Jour 1961; 2(3):83-90

223. Hueston WD, Hartwig NR, Judy JK. Detection of Ovine İntramammary İnfection with the California Mastitis Test. J Am Vet Med Assoc 1986;188(5):522-524

224. González-Rodríguez MC, Cármenes P. Evaluation of the California Mastitis Test as a Discriminant Method to Detect Subclinical Mastitis in Ewes. Small Ruminant Research 1996; 21(3):245-250

225. Braund DG, Schultz LH. Physiological and Environmental Factors Affecting the California Mastitis Test Under Field Conditions. J Dairy Science 1963; 46:197-203

226. Getahun K. Kelay B, Bekana M, Lobago F. Bovine Mastitis and Antibiotic Resistance Patterns in Selalle Smallholder Dairy Farms, Central Ethiopia. Trop Anim Health Prod 2008; 40:261-268

227. Petrovski KR, Heuer C, Parkinson TJ, Williamson NB. The İncidence and Aetiology of Clinical Bovine Mastitis on 14 Arms in Northland, New Zealand. N Z Vet J 2009; 57(2):109-115

228. Unnerstad EH, Lindberg A, Persson WK. Microbial Aetiology of Acute Clinical Mastitis and Agent-Specific Risk Factors. Vet Microbiol 2009; 137:90-97

229. Bengtsson B, Unnerstad HE, Ekman T, Artursson K, Öst MN, Waller KP. Antimicrobial Susceptibility of Udder Pathogens from Cases of Acute Clinical Mastitis in Dairy Cows. Veterinary Microbiology 2008; 136:142-149

230. Malınowskı E, Henryka L, Anna K. Relatıonshıp Between Mastitis Agents and Somatıc Cell Count ın Foremılk Samples. Bull Vet Inst Pulawy 2006; 50: 349-352

231. Swartz R, Jooste PJ, Novello JC. Antibiotic Susceptibility Patterns of Mastitis Pathogens İsolated from Bloemfontein Dairy Herds. J S Afr Vet Assoc 1984; 55(4):187-193

232. Matsunaga T, Yoshida T, Kamata Sİ, Uchida K. İdentification of Staphylococci from Bovine Mastitis and an Examination of their Susceptibility to Antibiotics and β-Lactamase Production. Jpn J Vet Sci 1990; 52(6): 1219-1227

233. Pengov A, Ceru S. Antimicrobial Drug Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Bovine and Ovine Mammary Glands. J. Dairy Sci 2003; 86:3157-3163

234. Güler L, Ok Ü, Gündüz K, Gülcü Y, Hadimli HH. Antimicrobial Susceptibility and Coagulase Gene Typing of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Clinical Mastitis Cases in Turkey. J Dairy Sci 2005; 88:3149-3154

235. Barton MD, Prrat R, Hart WS. Antibiotic Resistance in Animals. Communicable Diseases İntelligence 2003; 27:121-126

236. Monecke S, Kuhnert Peter, Hotzel H, Slickers P, Ehricht R. Microarray Based Study on Virulence-Associated Genes and Resistance Determinants of *Staphylococcus aureus* İsolates from Cattle. Veterinary Microbiology 2007; 125: 128-140

237. Loeffler A, Pfeiffer DU, Lindsay JA, Soares-Magalhaes R, Lloyd DH. Lack of Transmission of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Between Apparently Healthy Dogs in a Rescue Kennel. Veterinary Microbiology 2010; 141:178-181

238. Van den Eede, Martens A, Lipinska U, et. al. High Occurrence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in Equine Nasal Samples. Veterinary Microbiology 2009; 133: 138-144

239. Pereira V, Lopes C, Castro A, et. al. Characterization for Enterotoxin Production, Virulence Factors, and Antibiotic Susceptibility of *Staphylococcus aureus* İsolates from Various Foods in Portugal. Food Microbiology 2009; 26(3): 278-282

240. Zahan NA, Hossain MA, Musa AK, et. al. PCR for *mecA* gene of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Mymensingh Med J 2009; 18(1):21-26

241. Anand KB, Agrawal P, Kumar S, Kapila K. Comparison of Cefoxitin Disc Diffusion Test, Oxacillin Screen Agar, and PCR for *mecA* Gene for Detection of MRSA. İndian J Medical Microbiology 2009; 27(1):27-29

242. Kearns AM, Seiders PR, Wheeler J, Freeman R, Steward M. Rapid Detection of Methicillin-Resistant Staphylococci by Multiplex PCR. J Hospital Infection 1999; 43(1): 33-37

243. Zmantr T, Chaieb K, Abdallah FB, et. al. Multiplex PCR Detection of the Antibiotic Resistance Genes in *Staphylococcus aureus* Strains İsolated from Auricular İnfections. Folia Microbiologica 2008; 53(4):357-362

244. Mohanasoundaram KM, Lalitha MK. Comparison of Phenotypic Versus Genotypic Methods in the Detection of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus.* Indian J Med Res 2008; 127:78-84

245. Cho JI, Jung HJ, Kim YJ, Park SH, Ha SD, Kim KS. Detection of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* İsolates Using Two-Step Triplex PCR and Conventional Methods. J Microbiol Biotechnol 2007;17(4):673-676

246. Raju S, Chandrakanth RK, SA Patil. High-Level Oxacillin and Gentamycin Resistance with Reduced Susceptibility to Vancomycin in *Staphylococcus aureus*-Carrying mecA and femA Gene Complex. Current Mıcrobıology 2007; 54:429–434

247. Xiong YL, Fan XJ, Zhang L, Lü XJ, Li XF, Gao YY, Fan H. Study on the Correlation Between Resistance Phenotype and Expression Level of femA of *Staphylococcus aureus.* Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban 2007; 38(2):268-71

248. Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton FE, Pollard DR, Rozee KR. Detection of Genes for Enterotoxins, Exfoliative Toxins, and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the Polymerase Chain Reaction

249. Becker K, Haverkämper G, von Eiff C, Roth R, Peters G. Survey of Staphylococcal Enterotoxin Genes, Exfoliative Toxin Genes, and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 Gene in Non-*Staphylococcus aureus* Species. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001; 20:407–409

250. de Sousa MA, Carlos ESRP, Olney VM, et. al. Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates from Buffalo, Bovine, Ovine, and Caprine Milk Samples Collected in Rio de Janeiro State, Brazil. Applied and Environmental Microbiology 2007; 73:3845-3849