

1. GİRİŞ

Staphylococcus aureus, tüm dünyada olduğu kadar yurdumuzda da en yaygın kronik mastitis etkenlerinden birisi olup, enfeksiyon çoğunlukla subklinik olarak gelişmekte ve somatik hücre sayısında artışa neden olmaktadır. Bununla birlikte genellikle süt veya memede saptanabilir bir değişiklik görülmez. Bakteri enfekte ineklerin meme bezlerinde, meme kanallarında ve meme lezyonlarında bulunur ve oldukça bulaşıcıdır. Enfekte olmuş meme bezlerinde *S. aureus* ile kontamine olmuş süt, enfekte olmamış bir meme bezi ile temas ettiğinde ve sağım zamanlarında bakteriler meme kanalına girdiklerinde enfeksiyon yayılmaya başlar. *S. aureus* bölgeye yerleştikten sonra antibiyotik tedavisine iyi yanıt vermez ve enfekte olan inekler sürüden ayrılmalı veya sürüden çıkarılmalıdır. Somatik hücre sayısının 200.000/ml'nin altındaki bazı sürülerde, uygun süt sağımı ve standart sağım zamanı hijyen tekniklerine rağmen *S. aureus*'u tamamen yok edememiştir (Roberson ve ark, 1994).

S. aureus süt sığırı yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olan mastitislerden en sık izole edilen bakteridir. İnfekte ineklerden elde edilen sütler enterotoksijenik *S. aureus* izolatlarının ana kaynağıdır (Zschöck ve ark, 2005). *S. aureus*, hücre membranlarını yok eden ve süt üreten dokuya doğrudan zarar verebilecek toksinler üretir (Trinidad ve ark, 1990a). Beyaz kan hücreleri, enfeksiyona karşı savaşmaya teşvik eden yangı bölgelerine çekilirler (Owens ve ark, 1991). Başlangıçta bakteriler meme bezleri ve dokulara zarar verir ve sonunda skar dokusunun oluşumuna neden olurlar. Bakteriler daha sonra kanal sistemine ilerleyip süt salgılayan hücrelere derin yerleşimli enfeksiyon cepleri oluştururlar. Bunu takiben, bakteri oluşumunu önlemek için bakterilerin duvarlarını kapatan apselerin oluşması, bakterilerin bağışıklık sistemi tarafından algılanmasını önler. Apseler, antibiyotiklerin bakterilere ulaşmasını önler ve tedaviye cevabın zayıf olmasının başlıca nedenidir. Bununla birlikte, *S. aureus* tüm subklinik mastitis enfeksiyonlarının %10-12'sini temsil eder (Tenhagen ve ark, 2009).

S. aureus, hücre membranlarını yok eden ve süt üreten dokuya doğrudan zarar verebilecek toksinler üretir (Trinidad ve ark, 1990a). Beyaz kan hücreleri, enfeksiyona karşı savaşmaya teşvik eden yangı bölgelerine çekilirler (Owens ve ark, 1991). Başlangıçta bakteriler meme bezleri ve dokulara zarar verir ve sonunda skar dokusunun oluşumuna neden olurlar. Bakteriler daha sonra kanal sistemine ilerleyip süt salgılayan hücrelere derin yerleşimli enfeksiyon cepleri oluştururlar. Bunu takiben, bakterilerin duvarlarını kapatan apselerin oluşturması, bakterilerin bağışıklık sistemi tarafından algılanmasını önler. Apseler,

antibiyotiklerin bakterilere ulaşmasını önler ve tedaviye cevabın zayıf olmasının başlıca nedenidir. Bu çalışmada subklinik mastitisli inek sütlerinden elde edilen *S. aureus* izolatlarında önemli toksin [(eksfolyatif toksin, Panton-Valentine lökositin, toksik şok sendrom toksin 1) genlerinin (eksfolyatif toksin A,B,D geni (*eta*, *etb*, *etd*), Panton-Valentine lökositin geni (*luk-PV*), toksik şok sendromu toksini 1 geni (*tst-1*)] polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile ve antibiyotik dirençliliğinin disk difüzyon yöntemi ile incelenmesi amaçlandı. Böylece meme dokusunda enfeksiyona sebep olan *S. aureus* kaynaklı enfeksiyonların ampirik tedavisine katkı sağlanmış olunacaktır.

1.1. Genel Özellikleri

Stafilokoklar aerop ve fakültatif anaerobik bakterilerdir. Yüksek tuz konsantrasyonunda (%10 NaCl) ve 18-40°C arasında klasik besiyerlerinde üreyebilme özelliklerine sahiptir. Optimal üreme ısısı 30-37 °C ve pH: 7-7,5'tir. Kanlı agarda 18-24 saatte yuvarlak, düzgün kenarlı, hafif konveks, opakt, 1-4 mm çapında koloniler yaparlar (Bilgehan 2004). *S. aureus* kolonileri 18-24 saatte pigmentli (sarı-portakal rengi, krem rengi), S tipi, yuvarlak, hafif kabarık ve çoğunluğu kanlı agarda beta hemoliz yapan koloniler oluşturur (Anderson, 1983).

S. aureus Gram pozitif, katalaz pozitif, genellikle oksidaz negatif, %10 tuz konsantrasyonunda üreyebilen, fakültatif anaerob koklar olup, *Micrococcaceae* ailesine ve stafilokok grubuna aittir. *Staphylococcus aureus*, altın koloni pigmentasyonu, koagülaz üretimi, mannitol ve trehaloz fermentasyonu ve ısıya dayanıklı termonükleaz üretimi ile diğer stafilokok türlerinden ayırt edilebilir (Anderson, 1983).

Çoğu *S. aureus* izolatu, 10 farklı serotip içerebilen bir polisakkarit kapsülle kaplanır. Kapsülün altında, Gram pozitif bakterilere özgü olan, kalın ve oldukça çapraz bağlanmış peptidoglikan tabakası ve teikoik asit içeren bir hücre duvarı bulunur (van Wely ve ark, 2001). *Staphylococcus aureus*'un yüzey proteinleri, fibrinojen, fibronektin, kollajen ve IgG'ye bağlanmaya katılan genel bir yapı bulundurur. *Staphylococcus aureus* tarafından üretilen penisilin bağlayıcı proteinler, bakterisidal permeabilite artırıcı protein 4 (PBPI-4), hücre çeperi peptidoglikan bağlanması ile ilgilidir. Bu proteinler beta-laktam antibiyotiklere bağlanabilir.

S. aureus genomunun evrensel özellikleri, 2800 kilobaz ağırlığında çift kromozomu, bir veya daha fazla plazmid, profajlar, transpozonlar, ekleme sekansı ve diğer karakterize edilip tamamlanmamış yardımcı genetik elementlerdir (Projan ve Novick, 1997). Bugüne

kadar 10'dan fazla eksiksiz *S. aureus* genomu dizilenmiştir. *Staphylococcus aureus*'un hücre büyümesi ve bölünmesi için gerekli olan yönetim genlerini içeren çekirdek genomu nispeten korunmaktadır. *Staphylococcus aureus* kormozomlarının %20'sine kadar olan bir kısmı, kendi başlarına çoğalabilen DNA segmentleri olan mobil genetik elementlerden oluşur. Bu elementlerin başlıca türleri arasında plazmidler, *S. aureus* patojenite bölgeleri, bakteriyofajlar, ekleme sekansları ve stafilokokkal kaset kromozomları yer alır. Bu elementlerin birçoğu virülens veya antimikrobiyel direnç genlerini kodladığından, bu segmentlerin *S. aureus* suşlarına transferi suşun patojenitesini etkileyebilmektedir. Mobil genetik unsurların dağılımları *S. aureus* suşları arasında ve hatta aynı suş soyları arasında belirgin şekilde değişim göstermektedir (Holden ve Lindsay, 2008).

1.2. Tarihçe

S. aureus'un neden olduğu enfeksiyonlar, yaklaşık 100 yıl önce bir İskoç bir cerrah olan Sir Alexander Ogston tarafından karakterize edilmiştir. 1890'da *S. aureus*'un sığırlarda mastitis oluşturduğu bildirilmiştir. *S. aureus* ilk olarak 1880 yılında Alexander Ogston tarafından ameliyat sonrası ölüm oranlarının artmasının nedeninin araştırılmasıyla keşfedilmiş ve daha sonra Frederich Julius Rosenbach tarafından isimlendirilmiştir. Daha çok “staph enfeksiyonu” veya “staph bakterisi” olarak adlandırılan *S. aureus*, asemptomatik olarak taşıyıcılarda %30 oranında burun deliklerinde bulunurken, geriye kalan çoğunlukta ise deride saptanmıştır (Lowy, 1998). Yenidoğanlar en yüksek nazal stafilokok taşıyıcılarıken ondan sonra ise hastane personelleri gelir (Williams, 1963). *S. aureus*, deriden deriye temas yoluyla geçer ve en fazla önceden hasta olan ve bağışıklık sistemi zayıf bireyleri etkiler. En yaygın geçiş yolu, aktif bir *S. aureus* türünü barındıran sağlık çalışanından temas yoluyla gelir. Diğer geçiş yolları, çevresel kaynaklardan ve bakterinin diğer taşıyıcılarından meydana gelir. Stafilokok enfeksiyonlarının olası sonuçları arasında genellikle pnömoni, septisemi ve yara enfeksiyonları gibi birçok hastane kaynaklı klinik bulgular vardır. *S. aureus* ilk kez identifiye edilip antibiyotikler geliştirilmeden önce bakterinin yaklaşık %80'lik bir ölüm oranına sahipti. Günümüzde antibiyotik tedavisi ile dünyadaki mortalite oranları %20-40 arasında değişmektedir ancak antibiyotik direnci ile ölüm oranları sürekli artmaktadır (Lowy, 2003). Antibiyotiklere direnç kazanmış bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlarda, hastalar tedaviye cevap vermediğinden vakaların çoğu ölümlerle sonuçlanmaktadır. Ayrıca dirençli bakteriler, hastaların hastanede kalma süreleri ve tedavi giderlerinin artmasına neden olmaktadır (Tenover, 2006; Paphitou, 2013).

1.3. Bakterinin Prevalansı ve Önemi

S. aureus, dünya genelinde sığırlarda en sık izole edilen patojenlerden biri olup (Myllys ve ark, 1994a; Tenhagen ve ark, 2006) çiğ süttten izole edilen en yaygın bulaşıcı mastitis patojenidir (Piccinini ve ark, 2003; Olde Riekerink ve ark, 2006). Uzun süreli araştırmalar süt endüstrisinde *S. aureus*'un öneminin değişmediğini göstermektedir (Swinkels ve ark, 2005). *S. aureus*, süt üretiminde azalma, bakteri kontaminasyonu ile artmış somatik hücre sayısı sonucu süt kalitesinde azalma, veteriner ve tedavi maliyetleri, prematüre tarama gereksinimi ve potansiyel genetik kayıp gibi ekonomik kayıplara neden olur (Østeras ve ark, 2005). Süt örneklerinde önemli ölçüde *S. aureus* üremesine sahip olan inekler, sürüden atılma riski altındadır (Reksen ve ark, 2006). Piccinini ve ark. (2003a) tarafından yapılan bir araştırmada, *S. aureus* mastitisli sürülerdeki patojen bulgusu bulunmayan sürülerle karşılaştırıldığında önemli miktarda süt kaybı olduğu bildirilmiştir.

S. aureus mastitisine bağlı ekonomik kayıplar, özellikle ineklerde ortalama bir mastitis vakasından daha yüksek olabilir (Gröhn ve ark, 2004). İnekler genelde düvelere kıyasla *S. aureus* ile daha çok enfekte olur (McDougall ve ark, 2007). Bununla birlikte, düveler için bazen *S. aureus* prevalansının yüksek olduğu bildirilmiştir. Birhanu ve ark. (2017), Etiyopya'nın Bishoftu şehrinde 153 adet subklinik mastitisli hayvanın %44,9'unun *S. aureus* kaynaklı olduğunu bildirmişlerdir. Tanzanya'da Suleiman ve ark. (2018)'inin yaptıkları çalışmada 203 hayvanın CMT ile subklinik mastitis olduğu belirlenmiş 416 hayvanda %36,8 oranında *S. aureus* izole etmişlerdir. Mpatswenumugabo ve ark. (2017)'inin Rwanda'da 13 çiftlikten CMT ile subklinik mastitis olduğu tespit edilmiş 62 sağmal inekten %51,5 oranında koagülaz negatif stafilokok ve %20,6 oranında *S. aureus* izole etmişlerdir. Elemo ve ark. (2017)'inin Etiyopya'da yaptıkları bir çalışmada, mastitis olduğu CMT ile belirlenmiş 251 ineğin 225 tanesi subklinik mastitis teşhisi konmuş ve *S. aureus* oranı %45,78 olarak belirlemişlerdir.

Bazı çevresel koşullar altında birçok *S. aureus* suşu, gıda zehirlenmelerine neden olabilecek çeşitli enterotoksin üretebilir (Jørgensen ve ark, 2005b). Bu toksinler, pastörizasyon veya diğer süt ısı muamelesiyle inaktive olmazlar. *S. aureus*, genellikle konak spesifik olarak kabul edilmesine rağmen, zoonotik bir patojen olabilir. Bununla birlikte, yakın zamanda metisilin dirençli *S. aureus*'un (MRSA) inekler ve insanlar arasında doğrudan iletimi bildirilmiştir (Juhász-Kaszanyitzky ve ark, 2007).

1.4. Rezervuarları ve Bulaşması

Ön burun delikleri, insanlarda *S. aureus*'un doğal nişleridir ve mikrop çoğunlukla ciltte, deri bezlerinde ve mukoz membranlarda bulunur. Sağlıklı insanların yaklaşık %20'sinde *S. aureus* persistent olarak burun deliklerinde kolonizeyken %70 oranında ise en azından aralıklı olarak bulunmaktadır. *S. aureus* varlığı, stafilokok enfeksiyonu için bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir (Kluytmans ve ark, 1997).

Diğer evcil geviş getirenlerin yanı sıra süt inekleri, mikrobun genellikle kısa sürede çoğalabilen ve devam edebilen bir kontaminant olarak bulunduğu geçici *S. aureus* konakçıları olarak düşünülür. *S. aureus*, sağlıklı ineklerin hemen hemen tüm eksternal yüzeylerinden izole edilmiş olup (Matos ve ark, 1991; Roberson ve ark, 1994) genellikle tercih ettiği yer meme derisidir (Jørgensen ve ark, 2005a). *S. aureus*'un meme derisi üzerinde ve diğer bazı vücut bölgelerinde, birincil olarak mukozal dış deliklerde uzun süreli kolonizasyon gözlemlenmesiyle beraber, dudak kısımlarında kolonizasyonun devam ettiği düşünülmektedir (Roberson ve ark, 1994). Bir buzağının, doğumda annesinin genital bölgesi yoluyla *S. aureus* ile ilk temas olasılığı yüksektir. *S. aureus* ahır ortamında, çiftlik malzemelerinde, zeminde, toz partiküllerinde ve yemlerde yaşadığı tespit edilmesine rağmen, çevresel bir bakteri olarak düşünülmemelidir (Matos ve ark, 1991).

S. aureus'un neden olduğu mastitis, bulaşıcı mastitis için planlanan kontrol programlarının ve yaygın enfeksiyon bulgularının *S. aureus* oluşumunun azaltıldığına işaret ederek (Larsen ve ark, 2000a), mastitis kaynaklı suşların çeşitliliği düşük olduğu için bulaşıcı olduğu düşünülmektedir (Wilson ve ark, 1995). Enfekte süt, genel olarak mikrobun birincil kaynağı olarak kabul edilir ve mastitis nedeni *S. aureus*'un bulaşma vektörü sağım hayvanlarıdır çünkü sütlerin sık sık enfekte olanlarla benzer *S. aureus* suşlarıyla kontamine olduğu gösterilmiştir (Larsen ve ark, 2000a; Zadoks ve ark, 2002; Jørgensen ve ark, 2005a). Meme bölgesi, bacaklar, dirsek kısımları ve karındaki aşınmalar gibi travmatik bölgeler genellikle *S. aureus* tarafından enfekte edilir ve *S. aureus*'un sekonder kaynaklı olduğu düşünülür.

S. aureus, klonal bir organizma olarak kabul edilir çünkü popülasyonlar, ortak ataların sahip olduğu genetik kodlarla ilişkili suşların gruplarından oluşur. *S. aureus*, horizontal gen transferi yerine nokta mutasyonuyla daha sık çeşitlenmektedir (Feil ve ark, 2003). Süt ineklerinde mastitisli süttten ve farklı gövde bölgelerinden izole edilen *S. aureus* suşları çeşitlidir (Middleton ve ark, 2002; Zadoks ve ark, 2002) ancak birçok alanda (Buzzola ve ark, 2001; Zschöck ve ark, 2004) ve hatta dünya genelinde (Smith ve ark, 2005) mastitis

vakalarının çoğunda suşların küçük bir alt grubunun dahil olduğu kabul edilmektedir. Birçok çalışmada, belirli bir sürüde genellikle sınırlı sayıda *S. aureus* suşuna sahip olduğunu, genellikle bir veya birkaç suşun baskın olduğu barınaklarında olduğu gösterilmiştir ve muhtemelen ortak bir suştan farklılaşmıştır (Larsen ve ark, 2000a; Sommerhäuser ve ark, 2003; Rabello ve ark, 2007). Bu alt grubun suşlarının genetik olarak birbirleriyle ilişkili olduğu ve muhtemelen ortak bir parental suştan ayırt edildiği gösterilmiştir (Smith ve ark, 2005). Buna karşılık meme başı ve meme başı derisi gibi göğüs dışındaki bölgelerde tespit edilen suşların çoğu mastitis suşlarından genetik olarak farklıdır ve bu suşların sığırların meme içi dokularını enfekte etme konusunda evrimleştiğini gösterir (Zadoks ve ark, 2002).

Aynı *S. aureus* suşları zaman zaman süt ineklerinden ve sağım personellerinin ellerinden identifiye edilmiştir (Jørgensen ve ark, 2005a) ancak sığır mastitisinden kaynaklanan suşlar genel olarak insan suşlarından genetik olarak farklı bir kümeyi temsil etmektedir ve böylece konak spesifikliği durumu ortaya çıkmaktadır (van Leeuwen ve ark, 2005). Bu özgülük veya konak adaptasyonunun bir kısmı, farklı derecelerde farklı suşlarda bulunan mobil eklenti genetik unsurların edinilmesi veya kaybedilmesinden kaynaklı olduğu düşünülebilir (Fitzgerald ve Musser, 2001).

1.5. Sığırların Meme İçi *S. aureus* Enfeksiyonunun Patogenezi

S. aureus nedenli enfeksiyon, konakçı hayvandaki mikrobu zıt kolonizasyonunun gerçekleştirdiği bir durum olarak düşünülebilir. Yangı, konakçının mikroba verdiği tepki, etkilenen organlarda şişme, kızarıklık, ağrı, sıcaklık sonucu fonksiyonlarında bozulmalar oluşur. Meme bezlerinin yangılaşması için genel terim, enfeksiyöz veya non-enfeksiyöz olabilen mastitistir.

Sığır meme bezinde *S. aureus* enfeksiyonunun gelişimi şu aşamalara ayrılabilir: meme bezinde *S. aureus*'un girişi, sığır bağışıklık sistemi arasında etkileşim, bağışıklık savunmasından kaçma, hayatta kalma ve doku istilası. Meme kanalına *S. aureus* girişi meme içi enfeksiyonuna neden olabilmektedir ancak bu herhangi bir enfeksiyonda olduğu gibi belirli koşullara bağlıdır. Bu koşullar; bakteri sayısı, mikrobu hedef dokuya varışı, suşun virülensi ve konakçı bağışıklığı olarak bilinmektedir (Projan ve Novick, 1997).

1.5.1. *S. aureus*'un Meme Bezine Girişi

Meme bezine, meme kanalı yoluyla yeterli miktarda *S. aureus* bakterisinin girmesi,

doğal meme içi enfeksiyonunun oluşması için gereklidir. Sığırların meme içi enfeksiyonlarında *S. aureus*'un enfektif dozu tam olarak bilinmemekle birlikte, meme kanalına bakterilerin doğrudan infüze edildiği deneysel bir modelde 10 cfu kadar küçük miktarlar enfeksiyona neden olmuştur (Postle ve ark, 1978). Bununla birlikte, deneysel enfeksiyon modellerinde tüm ineklerde enfeksiyon gelişmemiş olup bu da *S. aureus*'un daima meme bezinde yeterince çoğalmadığını ancak diğer predispozan faktörlerin mevcut olması gerektiğini öngörmektedir (Schukken ve ark, 1999). *S. aureus* invazyonuna karşı ilk savunma mekanizması meme kanalının fiziksel bariyeridir. Sıkı bir şekilde sarılmış meme kanalı, sağım arasındaki başın uç kısmını hızla kapatır. Meme kanal epitelyumunu örten keratinize madde bakteri üremesini engellemesine karşın bazen düveler *S. aureus*'u bu dokuda barındırabilmektedir (Trinidad ve ark, 1990b). *S. aureus*'un konakçı hücrelere veya ekstrasellüler matriks moleküllerine tutunması, kolonizasyon ve meme içi enfeksiyon için kritik bir basamaktır. Bu substantlara bağlılığın, nonspesifik fizikokimyasal mekanizmalar ve spesifik bakteriyel konakçı hücre bağlanması ile gerçekleştiği düşünülmektedir (Kluytmans ve ark, 1997). Bakteri, duktuslar ve meme bezinin alveollerini kaplayan epitelyal hücrelere adherensine kadar sütün fişkirarak dışarı atılmasına karşı direnir (Frost ve ark, 1977). *S. aureus*, çoğu diğer bakteri türlerinden sığır meme epitel hücrelerine daha iyi adhere olur (Frost ve ark, 1977) ve sütün varlığı adherensi arttırır (Mamo ve Fröman, 1994). Bağlanma olayında, derin epidermal hücrelerde, keratinize epitel hücreler gibi tam olgun hücreler için en uygundur (Aly ve Levit, 1987). Meme kanalı hücrelerine bağlanma hücre türünün kökenine bağlıdır (Sutra ve Poutrel, 1994). *S. aureus* özellikle meme bezinin üst kısmındaki hücrelere iyi adhere olmaktadır (Frost ve ark, 1977). *S. aureus* ayrıca bezlerin üst kısmında yayılmasını sağlayan yağ globüllerine de bağlanabilmektedir (Sandholm ve ark, 1989).

Meme travmaları *S. aureus*'un memedeki kolonizasyon riskini artırır. Epitel hasar, altta yatan subepitelyal bileşenleri (fibrinojen ve kollajen) stafilokok yüzey proteinlerinin konakçı hücre matriksine yapışmasına aracılık etmesini sağlar (Patti ve ark, 1994). *S. aureus* tarafından salgılanan ekzotoksinler de epitel hasara karışabilir. Sağım gibi küçük travmalar bile *S. aureus*'un meme içine girmesini kolaylaştırabilir. Kallus oluşumu meme kanalının sıkıca kapanmasını önlemektedir ve aşırı kalluslu meme dokusu *S. aureus*'a karşı daha duyarlıdır (Zadoks ve ark, 2001). Myllys ve ark. (1994b) yaptığı bir araştırmada meme başında koloni oluşumu, meme kanalı enfeksiyonu ve meme içi enfeksiyonunun meme deliği epitelyumunun kontrol bölgelerine kıyasla deneysel olarak aşınmış olduğu bölgelerde çok daha yaygın olduğu gösterilmiştir. Hayvan deneyleri, yabancı cisim mevcut olmadıkça kutanöz veya subkutanöz enfeksiyona neden olmak için çok sayıda canlı stafilokokun gerekli

olduğunu göstermiştir (Bunce ve ark, 1992). Öte yandan, yapışkan cerrahi bantların çıkarılması, epilasyon veya epitelin dış katmanlarının zarar görmesi gibi küçük travmalar halinde, *S. aureus*'un insanlarda deri enfeksiyonlarına neden olduğu bildirilmiştir (Singh ve ark, 1971).

1.5.2. *S. aureus*'un Meme Bezine Kolonizasyonu

S. aureus'un ve diğer bakteri türlerinin neden olduğu meme içi enfeksiyonlar, meme bezine meme kanalından bakterilerin girişinden kaynaklanmaktadır. Bir ineğin memesinin dörtte birinin enfekte olması genellikle diğer meme bölgelerinden bağımsız olarak bulaştırılır.

Sürülerdeki *S. aureus*'un ana rezervuarları enfekte bölgeler ve meme başı derisidir (Bramley ve Dodd, 1984). Meme ucundaki lezyonların varlığı (çatlaklar ve yarıklar) *S. aureus*'un derideki persistent kolonizasyonunu sağlar. Olumsuz sağım koşullarından ötürü bu travma veya lezyonlardan kaçınmak için sağım tesislerinin vakum seviyesi ve titreşim frekansı düzenli olarak kontrol edilmeli ve ayarlanmalıdır (Neave, 1971).

S. aureus esas olarak meme veya meme içinde bulunurken bakterilerin bir inekten diğerine geçişi genellikle sağım sırasında gerçekleşir. Geçişin ana vektörleri sağım personellerinin elleri, memeyi yıkamak veya kurutmak için kullanılan bezler, sağım makinesindeki vakum ayarının ani değişimlerinden dolayı sütün kontamine olup meme içine geri kaçmasıdır (Bramley ve Dodd, 1984). Sağımın *S. aureus* iletimindeki rolü, sağım sırasındaki hijyenik önlemlerin meme deliği kontaminasyonunda ve dolayısıyla sürüler halinde yeni *S. aureus* kaynaklı meme içi enfeksiyon oranında belirgin bir azalmaya yol açmasıyla doğrulanır (Neave, 1971; Kingwill, 1981).

Meme deliği, *S. aureus* tarafından kontamine edildiğinde, bakteriler persiste olup çoğalabilir (Bramley ve ark, 1979) ve daha sonra progresif kolonizasyon ile özellikle sağımın sonunda darbe olgularıyla meme kanalına girebilir (Anderson, 1983). Meme kanalının kolonizasyonu ve meme bezine kontaminasyonu için gerekli ön adım gibi görünmektedir (Forbes, 1969). *S. aureus*, koagülaz negatif stafilokoklar, *Corynebacterium bovis* ve *Streptococcus agalactiae* ile birlikte (Du Preez, 1985), keratinize epitelyal hücrelere adhere olduğu meme kanalından en sık izole edilen mikroorganizmalardır (Williams ve Mein, 1985). Meme kanalına kolonize olan bakterilerin meme başı sinüslerine ne kadar yakın oldukları göz önüne alındığında, meme enfeksiyonu riski o kadar yüksektir (Prasad ve Newbould, 1968). Bu bakterilerin süt ile teması, meme içi basınç arttıkça (sağım öncesi veya inek yürürken,

yatarken veya ayağa kalkarken) ve meme başını kanalizasyonla ederken sağımdan sonra meme sinüsüne aktarımına izin verebilir (Anderson, 1982; Anderson, 1983).

1.5.3. Meme Bezine Adhezyonu

Birkaç çalışmada az miktarda bakterinin meme başı kanalı vasıtasıyla meme içi infüzyonuyla deneysel *S. aureus* kaynaklı meme içi enfeksiyonlarını indüklemenin mümkün olduğunu göstermiştir (Postle ve ark, 1978). Bu gözlemler, sütün kazein ve laktozu hidrolize edebilen *S. aureus*'un gelişmesi için iyi bir besiyeri olduğunu ve meme bezinin enfeksiyona karşı doğal savunma mekanizmalarının yetersiz olduğunu göstermektedir. Bakterinin yüzey özellikleri, konak-bakteri ilişkisinde önemli bir rol oynamaktadır. *S. aureus* kaynaklı meme içi enfeksiyonu esnasında, yüzey bileşenleri konakçı meme dokularına bakteri adhezyonuna ve süt hücreleri tarafından fagositoz direncine katılır (Smith, 1977).

1.5.3.1. Adhezinlerin rolü

S. aureus'un meme bezine kolonizasyonunun ilk adımı, epitel hücrelerine yapışmaktır. *Staphylococcus aureus*'un sığır meme epitel hücrelerine in vitro yapışması başlangıçta Frost (1975) tarafından gösterilmiş olup sonrasında diğer araştırmacılar tarafından doğrulanmıştır (Opdebeeck ve ark, 1988). Bu fenomen, suş çeşitliliği ve hücrelerin kökeni ile değişmektedir. Suşun yapışkanlık kabiliyeti, aynı ineğin epitelyal hücrelerine farklı bölgelerden gelir fakat farklı ineklerin memelerinden geldiğinde bu suşlar çok az farklılık gösterir (Frost ve ark, 1977; Wanasinghe, 1981a). Laktoferik kanalların epitel hücrelerine *S. aureus*'un bağlanması, deneysel olarak enfekte olmuş meme bezlerinin kesitlerinin mikroskopik olarak incelenmesiyle in vivo olarak teyit edilmiştir (Gudding ve ark, 1984). *S. aureus*'un meme epitel hücrelerine yapışmasının mekanizmaları iyi bilinmemektedir. İki tür etkileşim söz konusudur: 1) nonspesifik fizikokimyasal etkileşimler ve 2) bakteri hücre duvarıyla ilişkili reseptörler ve konakçı bileşenler arasındaki spesifik etkileşimler.

Sığırların meme içi enfeksiyonlarından izole edilen *S. aureus*'ların çoğu suştan suşa ve kültür ortamı ile değişen yüksek bir yüzey hidrofobisine sahiptir (Jonsson ve Wadström, 1984; Mamo ve ark, 1987). Bu yüzey karakteristiği, hücre zarı ile hidrofobik etkileşimler yoluyla bakterilerin konakçı hücrelere fizyasyonunu kolaylaştırabilir. Üstelik *S. aureus*, kollajen ve fibronektin gibi (Holderbaum ve ark, 1986) konakçı hücre dışı proteinleri bağlayabilir (Kuusela, 1978). İnsan kökenli suşlarda invazivlik, in vitro suşlarda sistemlerde

adhezyon ve fibronektin bağlayıcı reseptörleri olan fibronektin (Fn) reseptörlerinin kantitatif ekspresyonu arasındaki ilişki bildirilmiştir (Proctor, 1987). *S. aureus*'un Fn bağlayıcı reseptörü, 200 kDa'lık bir protein olarak tanımlanmıştır (Fröman ve ark, 1987). Aslında, yapısal olarak bağlantılı iki adet Fn bağlayıcı proteini kodlayan birbirine bağlı genler yakın zamanda tanımlanmış ve aminoasit homolog birimleri bu proteinlerin Fn bağlayıcı alanı olarak tanımlanmıştır (Jönsson ve ark, 1991). Kollajen ve Fn için reseptörler, sığır meme içi enfeksiyonundan izole edilen suşlar üzerinde gösterilmiştir (Mamo ve Fröman, 1994). Bununla birlikte, meme içi enfeksiyonları sırasında *S. aureus*'un virülensinde fibronektin bağlayıcı protein olarak bilinen Fnbp'nin rolü kesin olarak gösterilmemiştir. Moleküler biyoloji bu noktayı netleştirmek için araçlar sağlayabilir. Fnbp'yi kodlayan genlerin tüm dizileri iyi belirlendiğinden (Jönsson ve ark, 1991), fibronektin bağlama yeteneğinden yoksun mutantları bölgeye özgü mutagenез yoluyla izole etmek mümkün olacaktır. Bu mutantlar, in vitro olarak meme hücrelerine adhezyonu ve ineklerde deneysel meme içi enfeksiyonları gibi deneylerde kullanılabilir. Hidrofobik etkileşimler ya da konakçı bileşenlerinin protein yapıda olması dikkat çekicidir. Bakteri ilk olarak proteolitik enzimlerle muamele edildiğinde *S. aureus*'un duktuler hücrelerine in vitro olarak adhezyonu engellenir (Wanasinghe, 1981b). Bu enzimler aynı zamanda yüzey hidrofobikliğini (Jonsson ve Wadström, 1984) ve *S. aureus*'un kollajen (Holderbaum ve ark, 1986) ve Fn'yi bağlama yeteneğini de düşürmüştür (Mamo ve ark, 1987). Son zamanlarda, Lindahl ve ark. (1990) sığır meme içi enfeksiyonundan izole edilmiş bir *S. aureus* suşundan 145 kDa'lık bir hücre duvarı ile bağlantılı proteini saflaştırmışlardır. Bu bileşen, inek sütü yağ globüllerinin ve meme epitel hücrelerinin membran proteinlerine bağlanma yeteneğine sahiptir.

Enfeksiyonun erken evrelerinde, epitel hücrelerine adhezyon, *S. aureus*'un sağım esnasında meme bezinin dışına çıkmasını önleyebilir. Sonrasında, *S. aureus* yağ globüllerine adhere olarak meme bezinde yayılabilir (Sandholm ve ark, 1989) ve daha sonra bezin farklı seviyelerindeki, yani meme başı sinüs ve laktiferik sinüs ve kanallardaki epitel hücrelerine tutunabilir (Frost ve ark, 1977).

1.5.3.2. Antifagositik faktörlerin ekspresyonu

Meme bezinin *S. aureus* enfeksiyonuna karşı ana savunma mekanizması polimorfnükleer nötrofil lökositler tarafından oluşturulan fagositozdur (Paape ve ark, 1979). Schalm ve ark. (1976) atın, anti-inek lökosit serumunun kesintisiz intravenöz enjeksiyonu ile nötropeni indüksiyonunun, *S. aureus* kaynaklı meme içi enfeksiyonun subklinikten akut

gangrenöz forma dönüşmesine yol açtığını göstermiştir. Dahası, Postle ve ark. (1978) sütteki somatik hücre sayısı 6×10^5 hücre/ml'den fazla olan bölgelerde deneysel *S. aureus* kaynaklı meme içi enfeksiyonunu indüklemeye başarısız olmuştur.

Sağlıklı bölgelerde sütteki somatik hücre sayısı genellikle 10^5 hücre/ml'den azdır. Meme bezi enfeksiyonu, çoğunlukla polimorf nükleer lökositlerin, meme paranzimi yoluyla süt içine akışına yol açar. *S. aureus* ile deneysel meme içi inokülasyondan sonra sütün somatik hücre sayısı, inokülasyondan 1-3 saat sonra artmaya başlar ve 24-48 saat içerisinde birkaç milyon hücre/ml'ye ulaşabilir (Heald, 1979; Gudding ve ark, 1984).

Bakterilerin polimorf nükleer lökositler tarafından fagositozu, bakterilerin tanınması, sindirilmesi ve hücre içi yıkımını içerir. Polimorf nükleer lökositlerin membran reseptörleri, lektin-karbonhidrat benzeri etkileşimler yoluyla nonspesifik bakteri yüzey komponentlerini bağlayabilir ancak bakterilerin tanınması ve ardından polimorf nükleer lökositlerin aktivasyonu, opsoninler tarafından aracılık edildiğinde çok daha etkilidir. *S. aureus*'un opsonizasyonu, özellikle peptidoglikan epitoplarına spesifik olan antikorları ve komplemanın C3b bileşenini içerir (Peterson ve ark, 1978). C3b bileşeni, peptidoglikan ya da teikoik asit gibi *S. aureus*'un yüzey bileşenleri tarafından doğrudan (Wilkinson ve ark, 1978) ya da peptidoglikan ile spesifik antikorlar, özellikle IgG izotipi arasındaki bağışıklık kompleksleri tarafından klasik ya da alternatif yollarla komplemanın aktivasyonu ile üretilir (Peterson ve ark, 1978). Bakteri üzerindeki immunglobulinlerin (C3b ile ilişkili olsun ya da olmasın) antikor bölgeleriyle fikze edilmesi ve polimorf nükleer lökosit yüzey reseptörleri üzerindeki Fc fragmenti tarafından polimorf nükleer lökositler ile bakteri alımını aktive eder. Ruminantlarda, polimorf nükleer lökositler üzerindeki Fc membran reseptörlerinin çoğu IgG₂ izotipine spesifiktir (McGuire ve ark, 1979).

Sağlıklı bir meme bölgesinin sütü, düşük seviyedeki opsoninler, komplementler (Poutrel ve Caffin, 1983) ve immunglobulinlere sahiptir (Butler, 1983). Opsonizasyona katılan ana izotip olan IgG₂, özellikle süt içeriğinde düşüktür. *S. aureus* kaynaklı meme içi enfeksiyonu sırasında meme bezinin yangısı hem polimorf nükleer lökosit takviyesini hem de meme paranzimi yoluyla süt içine plazma eksudasyonunu içerir. Böylece sütteki IgG₁, IgG₂ ve kompleman konsantrasyonu artar (Caffin ve Poutrel, 1988). Bununla birlikte bu yangı bakterilerin tamamen yok edilmesiyle sonuçlanmaz, yalnızca enfeksiyonun kısmen kontrol altında bakterilerin çoğalması ve memedeki savunma arasındaki dengeyi yansıtan kronik bir subklinik forma dönüşür. Bu denge, bir yandan polimorf nükleer lökositleri ile kazein ve yağ globüllerinin sindirimi nedeniyle düşük fagositoz etkinliği (Paape ve Wergin, 1977) ve *S.*

aureus'a spesifik opsonize antikorların düşük seviyesine ve diğer taraftan *S. aureus*'ta bulunan protein A ve kapsül üretimiyle açıklanabilir.

Protein A: Stafilokokkal protein A (SpA), bakteriyel hücre duvarı yüzeyine bağlanmıştır ve Fc fragmenti tarafından sayısız memeli türünde IgG'yi bağlama yeteneğine sahiptir (Forsgren ve ark, 1983).

Dossett ve ark. (1969) SpA'nın *S. aureus*'un fagositozunu inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte, bu antifagositik etki hem antikorların hem de komplementin göreceli olarak varlığına bağlı görünmektedir. İnsan IgG eksikliği bulunan serum varlığında yüksek SpA üreten suşların opsonizasyonu, düşük seviyede üreten suşlardan daha etkilidir, tersi opsoninler olarak normal insan serumu veya saflaştırılmış IgG ile gözlenmiştir (Dossett ve ark, 1969; Peterson ve ark, 1977).

İneklerin meme içi enfeksiyonlarından izole edilen suşların %50-60'ında tespit edilen SpA (Poutrel ve Ducelliez, 1979), inek IgG₂ ile kuvvetli reaksiyon gösterebilir ancak IgG₁ ile zayıf reaksiyona girer (Goudswaard ve ark, 1978). Sağlıklı bir meme bölgesinin sütünde, opsonizasyondaki önemli bir izotip olan IgG₂ konsantrasyonu çok düşüktür. Sonuç olarak SpA, *S. aureus* virülensinde en azından ineklerin meme içi enfeksiyonunun erken evrelerinde küçük bir rol oynayabilir. Postle ve ark. (1978) *S. aureus* suşlarında (çalışılan 12 suş) SpA miktarı ve ineklerde deneysel patojenite arasında önemli derecede negatif bir korelasyon raporlamışlardır.

Kapsül: Kapsül, hücre duvarını örten bir polisakkarit tabaka olarak tanımlanır (Wilkinson, 1983). Hint mürekkebi varlığında ışık veya elektron mikroskopisiyle gözlemlendiğinde bakterileri çevreleyen beyaz bir tuz kristali gibi görünmektedir (Melly ve ark 1979). Kapsüllü *S. aureus* suşları, serum soft agarda (SSA), %1 normal tavşan serumu içeren bir ortamda dağınık koloniler üretirken, kapsülsüz suşlar kompakt koloniler üretir (Yoshida ve Ekstedt, 1968). İki çalışma (her biri yaklaşık 800 suş ile), insan enfeksiyonlarından izole edilen *S. aureus* suşlarının sadece %5'inin Hint mürekkebi ve SSA teknikleri tarafından tanımlanan mikroskopik bir kapsül ürettiğini göstermiştir (Yoshida ve ark, 1970; Smith ve ark, 1971).

İneklerin meme içi enfeksiyonlarından izole edilen *S. aureus* suşlarında kapsül varlığı çok tartışılan bir konudur. Anderson (1984) ve Rather ve ark. (1986) suşların ışık mikroskopisinde kapsül gözlenmesinde başarısız olmuşlardır. İneklerin meme içi enfeksiyonlarının suşlarında kapsül olmadığı (Anderson 1984) veya bu suşların kapsül ve sümüksü yapı üretmediği (Rather ve ark, 1986), bir polisakkarit bileşeni bakteri yüzeyine gevşek şekilde bağlı olduğu sonucuna varmışlardır. (Wilkinson, 1983).

Watson'ın Avustralya'daki ekibi, inek veya koyunların meme içi enfeksiyonlarından izole edilen *S. aureus* suşlarının, koyunların periton boşluğunda in vivo olarak geliştirildiğinde psödokapsül olarak adlandırdıkları yüzeysel bir bileşen ürettiğini gözlemlemiştir (Watson, 1982). Yalancı kapsül, bakteri yüzeyi ile ilişkilidir ancak ışık mikroskopisiyle görünmez ve bu nedenle klasik bir kapsül olarak sınıflandırılmaz. Watson ve Watson (1989) elektron mikroskopisinde psödokapsülün meme içi enfeksiyonu sırasında in vivo olarak üretildiğini ve *S. aureus*'un inek, koyun veya keçi sütü peyniraltı suyunun bulunduğu sıvı besiyeri içerisinde yetiştirildiğinde in vitro olarak üretildiğini göstermiştir. Yalancı kapsül üreten suşlar fareler için daha çok virülettir ve polimorf nükleer lökositler tarafından fagositoza karşı daha yüksek bir dirence sahiptir (Watson, 1982). İneklerin veya koyunların yalancı kapsül üreten bir suşla aşılınması, serumdaki yalancı kapsüller antikoru indüklemiş olup aşılınmış hayvanların *S. aureus* tarafından deneysel enfeksiyonlara karşı direncini artırmıştır ve klinik belirtilerin ve süt üretiminin ciddiyetiyle değerlendirilmiştir.

İnsan enfeksiyonlarından izole edilen *S. aureus* suşlarının, 11 farklı serotipe ait kapsüller polisakkarit ürettiği gösterilmiştir (Sompolinsky ve ark, 1985). Tavşan poliklonal serumu (Sompolinsky ve ark, 1985) veya fare monoklonal antikoru ile yapılan birçok serolojik araştırmalar (Hochkeppel ve ark, 1987; Fournier ve ark, 1987a), insan kaynaklı suşların %70-80'inin 5 ve 8 olmak üzere iki serotipe ait olduğunu göstermiştir. Tip 5 ve tip 8 kapsüller polisakkariti (Fournier ve ark, 1987b), bakteri yüzeylerinde elektron mikroskopisi ile altın etiketli monoklonal antikolarla saflaştırılmış, görselleştirilmiş ve kimyasal yapıları tanımlanmış olup (Vann ve ark, 1988) N-asetil fukosamin ve N-asetil mannuronik asidin O-asetil grupları ile heteropolimerlerinin yeri serotipe göre değişmektedir (Hochkeppel ve ark, 1987). Kapsüller polisakkarit üreten suşlar ısıyla inaktif edilmiş normal insan serumu varlığında insan polimorf nükleer lökositleri tarafından in vitro fagositoza dirençlidir ancak bu direnç kapsüller polisakkarit spesifik tavşan serumu veya fare monoklonal antikolarının varlığında bastırılır (Karakawa ve ark, 1988).

1.5.3.3. *S. aureus* yüzey bileşenlerinin in vivo ekspresyonunun kuramsal kinetiği

Yüzey bileşenlerin ekspresyon kinetiği araştırılmamış olsa da, enfeksiyonun ilk evrelerinde *S. aureus*, meme epiteline ve süt yağ globüllerine adhere olmasına izin veren hidrofobik yüzey proteinleri, özellikle de konak bileşenleri için reseptör ürettiği varsayılabilir ve böylece bezde dissemine olur (Jonsson ve Wadström, 1984; Mamo ve ark, 1987; Lindahl ve ark, 1990). Sonrasında, süte maruz bırakma sırasında *S. aureus*, opsoninler aracılığında

bakteri ve polimorfnükleer lökositlerinin etkileşimlerini bozarak fagositozu önleyen kapsüler polisakkariti (Wilkinson, 1983) veya hidrofilik yapısıyla önleyebilir (Van Oss, 1978). Meme içi enfeksiyonu sırasında *S. aureus* tarafından kapsülün ekspresyonu, enfekte edilmiş meme bezlerinden elde edilen sütte monoklonal antikorlarla, ELISA ile kapsüler polisakkaritin saptanması (Sutra ve Poutrel, 1990) ve anti kapsüllü *S. aureus* antikorları ile kaplı manyetik partiküller ile meme içi enfeksiyonlu süt örneklerinden ayrılan elektron mikroskobik çalışmalarıyla açık olarak gösterilmiştir (John ve ark, 1989).

1.5.4. Meme Bezinde Oluşan Patolojik Değişiklikler

Staphylococcus aureus kaynaklı meme içi enfeksiyonu sıklıkla genel (ateş ve anoreksi) ve lokal (meme başında tıkanıklık ve sertlik) klinik bulguları olan akut bir fazdan başlar. Bundan sonra, enfeksiyon genellikle sporadik klinik vakalarla kronik ve subklinik olarak ortaya çıkar. Akut gangrenöz meme içi enfeksiyonu, hızlı ve büyük miktarda bakteri çoğalması ile karakterizedir ve enfekte olan bölgenin nekroze olması ineklerde nadir görülüp keçi ve koyunlarda sık görülür (Anderson, 1982).

S. aureus enfeksiyonu sırasında meme bezinin patolojik değişiklikleri ya doğal olarak enfekte olmuş (Sordillo ve ark, 1989) ya da meme kanalı ve paranzim yoluyla deneysel bakteri inokülasyonu (Nickerson ve Heald, 1981; Gudding ve ark, 1984) ile mikroskobik incelenmeyle araştırılmıştır (Heald, 1979). Farklı histolojik lezyonlar bildirilmiştir: 1) Erken ülserasyon, laktifer sinüs ve duktuler epitel erozyonu, 2) Meme epitelini laktifer kanallara ve glandular alveollere çaprazlayan makrofajlar ve polimorfnükleer lökosit ile paranzim konjunktiva dokusunun infiltrasyonu, 3) Salgı aktivitesinin basit bir azalmadan total hücre lizisine kadar değişen şiddette alveoler salgı epitelyum hücrelerinin lezyonları, 4) Alveollerin büzülmesi, konjktiv dokunun çoğalması, epitelyal hücrelerin ve polimorfnükleer lökositlerin parçalanması sonucunda glandular alveollerde hücresel parçaların birikmesi. Bu fenomen alveollerin oklüzyonuna ve bakterilerin sıkışmasına neden olabilir. Ortaya çıkan enfeksiyon odağı bezin diğer bölgelerine bulaşan bakterileri serbest bırakabilir veya bir granüloma dönüşebilir (Anderson, 1983). Deneysel olarak *S. aureus* inoküle edilen fare meme bezlerindeki ultrastrüktürel bir çalışmada, bakterilerin epitel salgı hücrelerinin sitoplazmasında bulunabileceğini ortaya koymuştur (Chandler ve ark, 1980).

Bakteriler her zaman zarar görmüş epitel veya dokuda mevcut değildir. *S. aureus* tarafından üretilen toksinlerin ve enzimlerin süt içinde dağılabildiği ve kendi hazırlanmış yerlerinden uzakta hareket edebildiği görülmektedir. Ayrıca, lize olmuş polimorfnükleer

lökositler tarafından salınan lizozomal enzimler, meme bezi epitelyumunun değişmesine katkıda bulunabilir (Nickerson ve Heald, 1981).

Anderson (1982; 1983), stafilokokkal meme içi enfeksiyonlarının dinamik doğasını vurgulamıştır. Patolojik değişiklikler bezin değişken alanlarını çeşitli şiddet derecelerinde etkiler. Enfeksiyonun subklinikten klinik forma dönüşmesi, bezin içerisindeki bakterilerin yayılmasını aksettirebilir fakat bu durum lokal savunma mekanizmalarının etkinliğine bağlıdır.

1.5.4.1. Toksinlerin rolü

S. aureus alfa, beta, gama ve delta toksin olmak üzere dört hemolitik toksin üretebilir. Alfa ve beta toksinleri, *S. aureus* virülensinde önemli bir rol oynamaktadır. İneklerin meme içi enfeksiyonlarından izole edilen suşların %20-50'si tarafından üretilen alfa toksini (Elek ve Levy, 1950), hücre zarına bağlanan ve sitoplazmik komponentlerin bir sonucu olarak hücre ölümüne yol açan heksamerik porlar oluşturan bir sitolizindir (Bhakdi ve Tranum-Jensen, 1991). Bir tip sfingomyelinaz C olan beta toksin ise, bu suşların %75-100'ünde üretilir (Poutrel ve Ducelliez, 1979).

Önceki yapılan araştırmalar keçi, koyun ve ineklerin alfa ve beta anatoksinlerin bir karışımı ile sistemik olarak aşılmasının, alfa ve beta toksinlerine özgü serum antikorlarının indüklenmesine yol açtığını göstermiştir (Plommet ve Le Gall, 1963). Anatoksinlerle yapılan aşılama deneysel *S. aureus* kaynaklı meme içi enfeksiyonunun ortadan kaldırılmasına yol açmamakta özellikle küçük ruminantlarda klinik olarak enfeksiyonun şiddetinin azalmasına neden olmaktadır. Bu etki, meme yangısı sırasında kandan süte akan antitoksin antikorları ile toksin nötralizasyonuna atfedilebilir (Adlam ve ark, 1981). Le Gall ve Plommet (1965), aşılammış koyunlarda deneysel *S. aureus* kaynaklı meme içi enfeksiyonunun şiddetinin kan antitoksin antikor titresi ile ters orantılı olduğunu gözlemlemişlerdir. Benzer şekilde, ineklerde kan antitoksin titresi yaşla birlikte artarken, klinik *S. aureus* kaynaklı meme içi enfeksiyon insidensi azalmaktadır.

İnek sütü örneklerinden izole edilen *S. aureus* suşlarının çoğu, in vitro şartlar altında lökositin ürettiği gözlenmiştir (Loeffler ve ark, 1988). İki ayrı ve sinerjik F ve S bileşeninden oluşan bu toksin (Woodin, 1972), ineklerdeki polimorfnükleer lökositler üzerinde sitolitik etkiye sahiptir (Loeffler ve ark, 1986). Dahası, kronik *S. aureus* kaynaklı meme içi enfeksiyonlu ineklerin, enfekte olmamış hayvanlara kıyasla, serum ve sütte önemli miktarda anti-lökositin antikor titrelerine sahip oldukları gösterilmiştir (Loeffler ve Norcross, 1985).

TSST-1'in insan mononükleer hücreleri tarafından gama interferon ve interlöykin 1 gibi yangısal faktörlerin salınımını indüklediği bilinmektedir. İnek meme içi enfeksiyonlarından izole edilen 262 *S. aureus* izolatına ilişkin yapılan bir çalışmada, izolatların %20'sinin TSST-1 ürettiği ve genellikle enterotoksin C ve D ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Kenny ve ark, 1993).

1.5.4.2. Ekstrasellüler enzimlerin ve koagülazın rolü

S. aureus, ineklerin meme içi enfeksiyonunun patogeneğinde rol oynayan hyaluronidaz, fostataz, nükleaz, lipaz, katalaz, stafilokinaz ve proteazlar gibi sayısız hücre dışı enzimler üretir (Arvidson, 1983). *S. aureus*'un sütte hızla çoğalma yeteneği muhtemelen virülensinin önemli bir bileşenidir. Enzimler, *S. aureus*'un metabolizmaları için sütteki substratları kullanmasına ve dolayısıyla süte adapte olmasına ve gelişmesine izin verebilir. Bununla birlikte, meme dokusunun değişmesinde stafilokokkal enzimlerin tutulumu açık bir şekilde gösterilmiştir (Anderson, 1976).

Koagülazın *S. aureus* virülensindeki rolü, çoğunlukla fareler üzerinde araştırılmıştır. Safılaştırılmış koagülazın fare meme bezine enjekte edilmesi, polimorf nükleer lökositlerin meme epitelinin hiperplazisine ve sekretorik alveollerin akışına sebep olur (Anderson ve ark, 1982). Koagülaz kaybı, fare meme bezinde belirgin bir virülens azalmasına neden olmakla birlikte koagülaz negatif mutant suşlar orta derecede bir meme değişikliğine neden olurken, parental suş generalize bir nekroza yol açmaktadır. Koagülazın nekrotizan aktivitesi olmadığı için bu gözlemler koagülaz ve alfa toksinin sinerjik etkisini ortaya koymaktadır (Anderson ve ark, 1982). Bununla birlikte, Phonimdaeng ve ark. (1990) bu sonuçların bölgeye özgü koagülaz mutantları ile teyit edilmesinde başarısız olmuşlardır. Bu, daha önceki bulguların diğer virülens faktörlerini kodlayan genler üzerinde ilave mutasyona sahip suşlarla elde edildiğini ortaya koymaktadır (Kinsman ve ark, 1981). *S. aureus* suşlarının hücre duvarında bulunan önemli protein yapılardan birisi "clumping faktör" (bağlı koagülaz)dür. İnsan ve hayvanlarda stafilokok enfeksiyonları çoğunlukla koagülaz pozitif etkenler tarafından oluşturulmaktadır. Stafilokok türlerinin, hayvanlarda neden olduğu klinik tabloların başında septisemi ve irinli yara enfeksiyonu gelmektedir. Ayrıca mastitislerin en genel etkenidir. Koagülaz, patojenite ile ilişkili önemli bir faktördür. Koagülaz pozitif *S.aureus* ve *Staphylococcus intermedius* ve koagülaz değişken *Staphylococcus hyicus* evcil hayvanlar için önemli türlerdir. Koagülaz negatif stafilokoklar genellikle düşük virulense sahip olmalarına

karşın, bazıları insan ve hayvanlarda hastalığa neden olurlar (Diker ve ark, 2011).

1.5.5. *S. aureus* ve Sığır İmmun Sistemi Arasındaki Etkileşim

Meme kanalının ikinci savunma hattı, meme kanalında bulunan sütteki immün hücrelerini (nötrofiller, makrofajlar, doğal katil hücreler ve dendritik hücreler) ve humoral faktörleri (laktoferrin, lizozim, laktoperoksidaz, protein A ve komplement) içeren doğal bağışıklık sistemini içermektedir (Rainard, 2003; Rainard ve Riollet, 2003). Bakteriye kolonizasyon, bakterilerin tetiklediği sitokin üretimine cevap olarak, öncelikle polimorf nükleer nötrofiller olmak üzere somatik hücrelerin akışını sağlar. Lökositler tarafından fagositoz ve öldürme, *S. aureus* enfeksiyonuna karşı konakçı savunmasında başrol oynamaktadır. *S. aureus* tarafından salgılanan süperantijenler gibi çok sayıda ekzoprotein fagositozu etkileyebilir. Fagositozan hücreler, T hücrelere sunmak için yutulan stafilokokları veya ürünlerini yüzeylerindeki MHC-2 molekülleri ile birlikte eksprese eder. Nötrofillerin birikimi ve kapsül oluşumu sıklıkla *S. aureus* tarafından enfekte olmuş bez bölgelerini çevreler ve bakteriler furunküller ve apseler içinde korunurlar. *S. aureus* konakçı savunma mekanizmalarından ve antimikrobiyellerin etkilerinden korunup konakçı hücre içi öldürme etkisinden kaçıp hayatta kalabilir (Mullarky ve ark, 2001). *S. aureus* hücre içi bir mikroorganizma olarak kabul edilmekle birlikte sığır meme epitel hücrelerinin içinde de replikasyonu kanıtlanmıştır (Almeida ve ark, 1996). Hücre içi ortamda, *S. aureus* nutrisyonel strese maruz kalsa da hayatta kalabilir. Sözde küçük koloni varyantları, yavaşça çoğalır ve değişmiş metabolizmaya bağlı olarak tipik koloni morfolojisine sahiptirler ancak enfektif olup antimikrobiyel maddelere karşı oldukça dirençlidirler. Salgılanan sitolitik toksinler, *S. aureus*'un hücre içi ortamdan salınmasına izin verir (Brouillette ve ark, 2004).

1.6. *S. aureus*'un Virülens Faktörlerinin Meme İçi Enfeksiyonundaki Rolü

En dar tanıma göre bir virülens faktörü, homojen hale getirildiğinde ve bir deney hayvanına verildiğinde patojenik bir etki yaratan maddelerdir. Bu tanımlama kullanılarak, bağlanma ile ilgili faktörlerin virülens faktörleri olduğu düşünülmelidir. En geniş anlamda ise bakteriyel sitoplazmada üretilen, evcil bir organizma içinde veya üzerinde, non-simbiyotik olmayan bir şekilde yaşamaya izin veren herhangi bir faktör virülens faktörü olarak kabul edilir (Projan ve Novick, 1997). *S. aureus*, bakterinin ökaryotik membranlara yapışmasına, fagositoza direnmesine, ökaryotik hücrelerin parçalanmasına ve bir dizi konakçı

immunomodulator moleküllerin üretimine neden olmasına izin veren çok sayıda virülens faktörü üretebilir. Mastitisten izole edilen sığır suşları arasında, en fazla enterotoksinler (Aarestrup ve ark, 1999; Tollersrud ve ark, 2000; Larsen ve ark, 2000b) veya bu toksinleri kodlayan genler araştırılmıştır (Salasia ve ark, 2004; Zschöck ve ark, 2004; Srinivasan ve ark, 2006). Birçok çalışma, sığırlarda *S. aureus*'un virülensinin suşlar arasında farklılık gösterdiğini öne sürse de bu fenomende spesifik virülens faktörlerinin muhtemel rolü tam olarak anlaşılamamıştır (Zadoks ve ark, 2000; Larsen ve ark, 2000a).

1.6.1. Virülens Faktörlerin Kontrolü ve Ekspresyonu

S. aureus'un virülens faktörleri, bakteri hücre bölünmesi ve gelişmesi için gerekli değildir ve bunların birçoğunda sadece bazı koşullar gereklidir. Virülens faktörlerinin kesintisiz olarak salgılanması mikroorganizma için pratik değildir. Bu nedenle, *S. aureus* yüzey proteinlerinin ve ekzoenzimlerin ekspresyonu, bakteri üremesi ve çevresel uyarılar evresine bağlı olarak koordine edilmiş bir süreçtir (Horsburgh, 2008). Koordinasyon, *sar* lokusu (stafilokokkal yardımcı regülatörü), *agr* lokusu (yardımcı gen regülatörü) ve *sae* lokusu (stafilokokkal yardımcı element) gibi üç bileşenli regülatör sistemlerin iyi karakterize edilmiş global düzenleyici unsurlarıyla yapılır (Fournier, 2008).

1.6.2. Enfeksiyonun Oluşmasında Rol Oynayan Toksinler

S. aureus kollajen, elastin, fibrinojen, fibronektin, kemik siyaloproteini, laminin ve trombospondin gibi çeşitli hücre yüzey proteinlerine bağlanmaya aracılık ettiği gösterilen birçok adhezin üretebilir (Foster ve Höök, 1998). Bu proteinlerin ligasyonu, *S. aureus*'un dokulara kolonize olmasını ve enfeksiyonu başlatmasını sağlar (Patti ve ark, 1994; Brouillette ve ark, 2004). Fnbp'lerin hücre invazyonuna karıştığı (Dziewanowska ve ark, 1999), fibronektin ve fibrinojen vasıtasıyla trombositlere yapışmasına aracılık ettiği gösterilmiştir (Heilmann ve ark, 2004). *S. aureus* ökaryotik hücreleri ve fagositozan hücreleri istila edebilir ve böylelikle antibiyotikler bu hücre içi bakterilere erişemezler (Balwit ve ark, 1994). Bu istilada, *S. aureus* konakçı hücre yüzeyi üzerinde yüzeysel olarak eksprese edilen Fnbp'leri (Lammers ve ark, 1999) ve $\alpha 1\beta 5$ -integrinini kullanır (Sinha ve ark, 1999).

S. aureus plastik malzemelerin polimer yüzeylerine yapışabilir, mikrokoloni oluşturabilir ve bakterileri kaplayan bir biyofilm oluşturup ekstrasellüler sümüksü madde veya glikokaliks üretebilir (Donlan ve Costerton, 2002). Fnbp'lerin, tıbbi cihazlardaki

fibronektin ile kaplanmış yüzeylere çift mutantların yapışmadığı gösterilmiştir. Dahası, Fnbp'lerin yakın geçmişte biyofilm oluşumuna aracılık ettiği gösterilmiştir (O'Neill ve ark, 2008).

1.6.2.1. Panton-Valentine lökositin

İki komponentli gözenek oluşturan toksinler, aynı zamanda lökositinler veya lökotoksiner olarak adlandırılıp, fagositlerin etkili katilleridirler (Alonso ve Torres, 2014). S- altbiriminin, hücre yüzeyindeki spesifik proteinli bir reseptöre bağlandığı iki monomer halinde S ve F bileşenleri olarak salınırlar. F bileşeninin daha sonra alınması ve dönüşümlü S ve F bileşenlerinin oligomerizasyonu sonucunda hücre zarında oktamerik gözeneklerin oluşması sonucu hücre ölümüne yol açmaktadır (Yamashita ve ark, 2014). *S. aureus*'un lökotoksik etkisine ilave olarak, iki komponentli lökositinler ile sinerjik olarak hareket edebilen (örneğin; gözenek oluşturan alfa toksin, sfingomyelinaz, fenol çözücü modüller) (Otto, 2014) lökositleri öldürme amaçlı birkaç faktör daha salgırlar (Munoz-Planillo ve ark, 2009). *S. aureus*'a karşı ilk savunma hattında fagositler önemli efektör hücrelerdir (Rigby ve De Leo, 2012) fakat *S. aureus* lökositinlerinin, fagositlerin seçici olarak öldürülmesi konakçının hayatta kalması için zararlı olduğunu göstermiştir (Reyes-Robles ve ark, 2013; Spaan ve ark, 2014). Büyükbaş hayvanların mastitisinde, hızlı nötrofil istihdamı, *S. aureus* enfeksiyonlarını sınırlamak için kilit önem taşımaktadır (Rainard ve Riollet, 2003). Birkaç lökositinin sığır nötrofillerini başarıyla hedeflediği ve öldürdüğü gösterilmiş olsa da sığır mastitis izolatları ile bunların sığır *S. aureus* mastitisinin patogeneziindeki rolü bilinmemektedir (Barrio ve ark, 2006).

S. aureus izolatları, 6 genetik bölüme sahip oldukları için en çok 6 lökositin türü barındırabilirken, gamma hemolizinler (*HlgAB* ve *HlgCB*) ve *LukAB* (*LukGH* olarak da bilinir) en yaygın olanlarıdır (Alonzo ve Torres, 2014). *LukED* patojenite bölgesi vSaß üzerinde kodlanır ve çoğu suşta yaygın olarak bulunur (McCarthy ve Lindsay, 2013). Bununla birlikte, ruminant CC133'ten gelen suşlar, *LukE*'de fonksiyonel *LukED* oluşumunu önleyen bir erken stop kodonu kodlamaktadır (Guinane, 2010). Ek olarak, *S. aureus* iki fajla kodlanmış lökositini, Panton-Valentine lökositin (PVL) ve *LukMF*'yi elde edebilmektedir. *pvl* genleri insan türleri ile sınırlıyken *LukMF*, özellikle sığır mastitis izolatları ve hayvan suşları ile ilişkilidir (Yamada ve ark, 2005; Schlotter ve ark, 2012). *LukMF* operonunun sığır izolatlarında bildirilen prevalansı %10-86 arasında değişmekte olup coğrafik bölge bakımından farklılık göstermektedir (Yamada ve ark, 2005; Schlotter ve ark, 2012; Padmaja

ve Halami, 2013). *LukMF*, sığır nötrofilleri ve monositleri üzerinde çok derin bir litik etki göstermektedir (Vrielling ve ark, 2015). Sığır mastitis izolatı S1444 için *S. aureus*'un uzakta olan sığır nötrofillerini öldürmesi için *LukMF* kullandığı, dolayısıyla fagotisozu önlediği gösterilmiştir. *LukMF*, sığır mastitisinde önemli bir virülens faktörü olduğu hipotezine tabi tutulmuştur (Vrielling ve ark, 2015).

Son yıllardaki lökosidinin türü ve hücre özgüllüğü, konakçı reseptörlerinin tanımlanmasıyla açığa kavuşturulmuştur. *LukAB*, integrin CD11b ile etkileşime girerken, diğer tüm lökosidiner kemokin reseptörlerini bağlarlar (DuMont ve ark, 2013). *HlgAB* ve *LukED*, CXCR1 ve CXCR2'yi hedef almaktadır. Ek olarak *HlgAB*, CCR2 ve *LukED* ile de CCR5 ile etkileşir. *HlgCB* ve *pvl*, C5aR1 ve C5aR2'yi hedef alırken, *LukMF* özellikle CCR1, CCR2 ve CCR5 reseptörlerini ihtiva eden hücreleri öldürür (Reyes-Robles ve ark, 2013; Spaan ve ark, 2014). Alıcı sekansı, yapısı ve ekspresyon farklılıkları konakçı-toksin etkileşimlerinin gözlenen tür özgüllüğünü oluşturmaktadır (Spaan ve ark, 2013; Vrielling ve ark, 2015).

S. aureus'un sığır mastitis izolatları potansiyel olarak 5 farklı lökosidin çiftini salabilir, bunların dördü (*LukMF*, *LukED*, *HlgAB*, *HlgCB*) sığır nötrofillerini hedef alacak şekilde tanımlanmıştır. Beşinci lökosidin olan *LukAB*'nin sığır nötrofillerini öldürme yeteneği henüz yeterince araştırılmamıştır (Barrio ve ark, 2006; Vrielling ve ark, 2015).

1.6.2.2. Toksik şok sendrom toksini

S. aureus tarafından üretilen protein yapıları toksinler ve diğer virülens faktörleri, subklinik ve klinik mastitis olgularında organizmanın patojenitesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Zschöck ve ark, 2000). TSST-1, yaklaşık 22 kDa'lık bir molekül ağırlığına, 7,2 izoelektrik noktaya sahip olan tek zincirli bir polipeptitten oluşan bir virülens faktördür. Toksin, süperantijen ailesine ait olmakla beraber bakterinin ürettiği bu toksin daha geniş bir pirojenik ekzotoksin ailesindedir (Marrack ve Kappler, 1990). TSST-1, yaygın olarak insanlarda ve hayvanlarda toksik şok sendromuna neden olur. TSST-1, ölümcül endotoksin şokunu artırmak ve nonspesifik T hücre proliferasyonunu uyarmak için IL-1, TNF- α ve ateş oluşumunu indüklemeye yeteneği de dahil olmak üzere diğer pirojenik ekzotoksinlerle ortak birçok biyolojik özelliklere sahiptir (Takeuchi ve ark, 1998). Kan dolaşımına girdikten sonra toksin, MHC-2 proteinlerine bağlanarak belirli T hücre tiplerinin aktivasyonu ile bağışıklık sistemini etkiler ve böylece sitokinlerin salınımıyla sistemik toksisite ve adaptif bağışıklık baskılanır ve bu yanıt dolayısıyla çoklu organ yetmezliği

sendromu ve sonuç olarak ölümcül şok gerçekleşir. Bu suşların besin zincirlerinde ve insan popülasyonlarında, özellikle bağıışıklığı baskılanmış hastalarda bulunması, hastalığa yakalanma riskini artıracaktır (Blaiotta ve ark, 2006). Dolayısıyla, sirkülasyon halindeki stafilokok suşlarının alt tiplerini ve virülens faktörlerini ortaya koyarak hastalığa karşı etkili kontrol stratejileri geliştirilmesi önemlidir.

1.6.2.3. Eksfoliyatif toksin

Eksfoliyatif toksin, stafilokok türlerinin ürettiği, insan ve hayvan derisinde kabarcıklara neden olan bir ekzotoksindir (Ladhani ve ark, 1999). Eksfoliyatif toksin üreten *S. aureus* türleri, stafilokokkal haşlanmış deri sendromu veya Ritter hastalığı ve büllöz impetigo ile ilişkilidir (Melish ve Glasgow, 1971). Stafilokokkal haşlanmış deri sendromu öncelikli olarak küçük çocukların ve yenidoğanların bir hastalığı olan generalize kabarıklık yapan cilt hastalıklarıdır ancak yetişkinler de etkilenebilir (Cribier ve ark, 1994). Klinik bulgular ateş, cilt hassasiyeti ve eritem ile aniden başlar ve bunu takiben ilerleyen birkaç saat içinde gün boyunca cilt yüzeyinin tamamını içeren geniş epidermal ayrılma tabakaları oluşur. Büllöz impetigo, daha yaşlı çocuklarda stafilokokkal haşlanmış deri sendromunun lokalize bir şeklidir ve çoğunlukla enfeksiyon bölgelerinde, özellikle ekstremitelerde görülür. Stafilokokkal haşlanmış deri sendromunda *S. aureus* farenks, burun, kulak veya konjunktiva gibi uzak odak noktalarında bulunur ve mevcut lezyonlarda bakteri tarafından üretilen eksfoliyatif toksin dolaşıma girip bu bölgelerde pul pul dökülmelere neden olur. Serolojik olarak, insan hastalıklarında rol oynayan eksfoliyatif toksinler esas olarak eksfoliyatif toksin A (ETA) ve eksfoliyatif toksin B (ETB) olmak üzere iki tipten oluşur (Arbuthnott ve Billcliffe, 1976). Her iki toksin de granüler tabaka boyunca epidermal nekroliz veya derinin inflamasyon cevabı olmaksızın intraepidermal bölünmeye neden olur (Arbuthnott ve Billcliffe, 1976). Eksfoliyatif toksinin intraepidermal bölünmeyi indüklemek için serin proteazları gibi hareket ettiğini gösteren birkaç kanıt vardır: 1) ETA ve ETB'nin *S. aureus* V8 serin proteazı (Dancer ve Noble, 1990) ve V8 proteazının katalitik bölgesi ETA ile aminoasit dizilimi bakımından benzerlik göstermektedir (Bailey ve Smith, 1990), 2) Serin proteaz inhibitörleri ile önceden inkübe edilmiş ve kısmen saflaştırılmış eksfoliyatif toksinler, derideki epitelium hücrelerde ayrılmalara neden olmaktadır (Dancer ve Noble, 1990), 3) ETA'nın varsayılan katalitik bölgesinde serin kalıntısının glisin ile değiştirilmesi toksinin eksfoliyatif etkinliğini tamamen ortadan kaldırmaktadır (Prevost ve ark, 1991; Redpath ve ark, 1991), 4) ETA ve ETB'nin kristal yapıları son zamanlarda belirlenmiş olup (Cavarelli ve

ark, 1997; Vath ve ark, 1997) her iki türün de yapısal olarak serin proteazlarının kemotripsin ailesine ait olduğu gösterilmiştir (Vath ve ark, 1999). Bununla birlikte, eksfoliyatif toksinin patojenik rolündeki kesin hedef maddesi yenidoğan fareler kullanılarak 1970 yılında gösterilene kadar yaklaşık 30 yıl boyunca gizemli kalmıştır (Ladhani ve ark, 1999). Bu buluşun ipuçları, otoimmün kabarıklık hastalığı olan pemfigus foliaceusun patofizyolojisi üzerine yapılan araştırmalarda sağlanmakla birlikte burada otoantikorlarla desmosomal kadherin desmoglein 1 (Dsg-1)'in inaktivasyonunun stafilokokkal haşlanmış deri sendromu veya büllöz impetigo ile gözlenenlere benzer şekilde kabarcıklara neden olduğu gösterilmiştir (Matozaki ve ark, 2000). Bu gözlem, Dsg-1'in ETA proteazı için spesifik substrat olarak yakın zamanda tanımlanmasına yol açmıştır (Amagai ve ark, 2000).

Eksfoliyatif toksin gibi stafilokokların virülens faktörleri, hücre gelişimi veya bölünmesi için gerekli olmayan yardımcı proteinlerdir. Bu faktörlerin genetik belirleyicileri genellikle fajlar, plazmidler ve patojenite bölgeleri gibi mobil genetik elementlerle ilişkilidir (Betley ve ark, 1992; Novick ve ark, 2001). Örneğin, *eta* genleri (Yamaguchi ve ark, 2000) ve enterotoksin A (Betley ve Mekalanos, 1985) ve E (Couch ve ark, 1988), *S. aureus* kromozomundaki profaj genomları üzerinde kodlanır ve enterotoksin D (Bayles ve Iandolo, 1989), ETB (Yamaguchi ve ark, 2001) ve *edin-C* genlerinin plazmidlerde var olduğu gösterilmiştir (Yamaguchi ve ark, 2001). "Patojenite bölgesi" terimi ilk önce üropatojenik *Escherichia coli*'lerdeki büyük kromozomal virülensle ilişkili segmentleri tanımlamak üzere bulunmuştur (Blum ve ark, 1994). O zamandan beri bu tanım, tek bir genle 2 kb'den daha az bir bölgeden, birçok türde tespit edilen 200 kb'lık multigenli elementlerin (Stein ve ark, 1996) bölgesine kadar değişen bölgeleri belirtecek şekilde genişletilmiştir (Kaper ve Hacker, 1999). Stafilokok türlerinde en az 3 tür patojenite bölgesi bildirilmiştir (Kuroda ve ark, 2001).

1.6.3. Enfeksiyonun Sürdürülmesinde Rol Oynayan Virülens Faktörleri

Enfeksiyonun başlaması ile ilgili faktörler hemolizinler, lökositinler, süperantijenler, nükleazlar, proteazlar ve lipazları içermektedir.

Hemolizinler, bağışıklık sistemi hücrelerine zarar veren ve yok eden sitotoksik ajanlardır. Genellikle meme içi enfeksiyona neden olan *S. aureus* izolatları tarafından üretilen alfa hemolizin (Aarestrup ve ark, 1999), sığır meme hücreleri için toksiktir (Bramley ve ark, 1989), eritrolizise neden olur, konakçı hücre iyon dengesini bozar, dermonekrotik ve nörotoksiktir (Dinges ve ark, 2000), biyofilm oluşmasında gereklidir (Caiazza ve O'Toole, 2003), perakut toksikasyonda belirleyici bir rol oynamaktadır (Matsunaga ve ark, 1993). Sığır

suşlarının çoğunun ürettiği beta hemolizin, eritrositlerin sfingomyelinazı olarak işlev görür (Aarestrup ve ark, 1999). Eritrositlerin beta hemolizinine duyarlılığı hedef hücrenin sfingomyelin içeriğine bağlıdır (Doery ve ark, 1965). Örneğin; koyun eritrositlerini kolaylıkla lize edebilirken tavşan eritrositlerini etkilemez. İn vitro çalışmalara dayanarak beta hemolizinin, alfa hemolizinin etkilerini artırdığı ve sığır meme epitel hücrelerinde *S. aureus*'un tutunmasına yardımcı olduğu düşünülmektedir (Cifrian ve ark, 1996). Delta hemolizin, sürfektant veya oluk oluşturma özelliklerine sahiptir ve beta hemolizinin hemolitik etkilerini yoğunlaştırır (Dinges ve ark, 2000). Gama hemolizin, monositler ve makrofajlar için toksiktir, eritrositler ve fagositler için lizis etkisine sahiptir (Projan ve Novick, 1997). Alfa ve gama toksinin eşzamanlı üretimi fare septik artritisinde *S. aureus*'un virülensini teşvik etmiştir (Nilsson ve ark, 1999).

Lökosidinler, kalsiyum akımını ve ardından gözenek oluşumunu indükleyerek konakçı savunma hücrelerinin fagositozan zarlarına zarar verir. Lökosidinler, S (yavaş salınan) ve F (hızlı salınan) proteinleri olmak üzere her ikisinin sinerjistik etkisine bağlı olarak toksik etkisi vardır (Kamio ve ark, 1993). Bu aile Panton Valentine lökosidin PVL (*lukS-PV+lukF-PV*), gama hemolizin ve lökosidin (Hlg ve Luk; *hlgA+lukF* ve *lukS+lukF*), *LukM/LukF-PV* (*lukM+lukF-PV*), *LukE/LukD* (Kamio ve ark, 1993; Prevost ve ark, 1995) ve sığır mastitis P83 suşunda saptanan *LukR-PV* genlerini içermektedir (Supersac ve ark, 1993). Lökosidinler ayrıca gama hemolizinden daha lökotoksiktir (Prevost ve ark, 1995).

Stafilokokkal süperantijen ailesi, enterotoksinler ve enterotoksin benzeri proteinleri (SEA, SEE, SEG, SER, SEU), toksik şok sendrom toksini (TSST) ve eksfoliyatif ETA ve ETB'yi içerir. TSST-1 ve endotoksinin test hayvanlarına uygulanan deneysel modellerinde süperantijenlerin pirojenite, süperantijenite (Dinges ve ark, 2000) ve tavşanlarda letaliteyi yaklaşık 100.000 kat artırma yeteneği gibi en az üç biyolojik özellikleri mevcuttur (Schlievert, 1982). Süperantijenler, MHC-2 proteinlerinin dış yüzeyine ve antijenlerin normal olarak bağlandığı T hücre reseptörleri alanının dışına bağlanır (Fleischer ve Schrezenmeier, 1988). Normal antijen sunum mekanizması atlanır ve dolayısıyla normalde %0,1'i aktive olan T hücrelerinin yaklaşık %30'u birden aktive olur (Dinges ve ark, 2000; McCormick ve ark, 2001). Bu durum toksik şok sendromunda görüldüğü gibi sitokinlerin kitlesel ve kontrolsüz şekilde salınmasına, kapillar sızıntıya, hipovolemik şoka ve çoklu organ yetmezliğine neden olur. Perakut *S. aureus* mastitisinde böyle bir reaksiyon olduğu ileri sürülmüştür. Süperantijenler makrofajları ve monositleri, tümör nekrozis faktör alfa, nitrik oksit, IL-6 ve IL-10'da dahil olmak üzere birçok inflamatorik medyatörleri üretmek üzere uyarabilir. Dahası, interferon gama varlığında makrofajlar sitolitik hale gelir. Süperantijenlerin *S.*

aureus'u konakçı savunma sistemlerinden kaçmayı kolaylaştırdığı düşünülmektedir ve dolayısıyla hem akut hem de kronik sığır mastitisine katkıda bulunduğu öngörülmektedir. Ferens ve ark. (1998) SEC'nin CD8 T hücrelerinin çoğalmasını artırarak sığır bağışıklık sistemini etkilediğini ve CD4 T hücrelerinin baskılanmasına neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu süperantijenler, *S. aureus*'un mukozal membranlarda persiste olmasına yardımcı olabilir (Ferens ve Bohach, 2000).

Çoğu *S. aureus* suşu endotel hücrelerine yapışmayı artırabilir, fagositozu önleyebilir ve daha sonra opsonizasyon ve fagositoz başarısız olduğunda bakteriler antimikrobiyel maddelerden ve antikorlardan kendisini gizleyebilen bir kapsül ve sümüksü bir yapı üretir. Protein A, hücre duvarı ile ilişkili bir protein olup IgG, IgA, IgE, tümör nekrozis faktörleri ve opsonizasyonu ve fagositozu zayıflatan trombositleri de içeren birkaç ana faktörle etkileşime girer (Peterson ve ark, 1977; Gomez ve ark, 2004). Protein A ile B hücrelerine bağlı IgM'nin bağlanması, polimorfnükleerler ve makrofajlar gibi konakçı hücrelerin ölümüne yol açan bir mekanizma olan apoptozisi indükler (Goodyear ve Silverman, 2004). Fibrinojeni fibrine dönüştüren ve hücrelerin pıhtılaşmasına neden olan bir protrombin aktivatörü olan koagülaz, çoğu *S. aureus* suşu tarafından üretilir (Phonimdaeng ve ark, 1990). Virülens faktörü rolü olma olasılığı da bulunmaktadır. Lipazlar, esterazlar, yağ asidi modifiye edici enzim ve fosfolipazlar bakteri zarını yok etmek için konakçı hücrelerin ürettiği çeşitli yağ asitleri ve diğer lipid moleküllerine karşı sürfektant olarak görev görür (Arvidson, 2000).

1.7. Antibiyotik Dirençliliği

Dünya genelinde artış gösteren antibiyotik dirençliliğinin, genelde yoğun antibiyotik kullanımından kaynaklandığı rapor edilmiştir. Avrupa'da her yıl tahminen yaklaşık 25.000 kişinin antibiyotiklere direnç geliştirmiş bakterilerin neden olduğu infeksiyonlar nedeniyle öldükleri bildirilmiştir. Benzer şekilde Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi'nde (US Centers for Disease Control and Prevention) 2013 yılında yayınladığı raporda, yılda en az 2 milyon insanın antibiyotiğe dirençli bakterilerle infekte olduğu ve bu kişilerden 23.000'nin bu nedenle öldüğü belirtilmiştir (Laxminarayan ve ark, 2013).

S. aureus, 1880'li yıllarda keşfedilen insan ve hayvanların deri, üst solunum sistemi, alt ürogenital sistem ve sindirim sistemi mukozalarında kommensal olarak bulunabilen *Staphylococcus* cinsi içinde yer alan patojen mikroorganizmalardandır. *S. aureus* hafif deri infeksiyonlarından, pnömoni ve menenjit gibi yaşamı tehdit eden hastalıklara kadar farklı

yelpazedeki hastalıklardan sorumlu çok yönlü bir patojendir (Deurenberg ve Stobberingh, 2008; Sasidharan ve ark, 2011; Şeker ve Garipçin, 2013). *S. aureus* sıklıkla süt hayvanlarında subklinik mastitise neden olup, süt ve süt ürünlerinde kontaminasyonlara neden olmaktadır. Ürettiği farklı tipdeki ısıya dirençli enterotoksinleriyle gıda zehirlenmelerinde önemli rol oynarlar. Gıda kaynaklı hastalıklar arasında dünyada üçüncü sırada rapor edilmişlerdir (Stapleton ve Taylor, 2002). *S. aureus* hastane kaynaklı infeksiyonların en önemli etkenlerindedir. Etken hızla çoklu antibiyotik direnci kazanarak nozokomiyal ve toplumla ilişkili infeksiyonlara neden olur. *S. aureus* bu özelliği nedeniyle halk sağlığı açısından önemli rol oynamaktadır (Grumann ve ark, 2014).

Antibiyotik dirençliliği terimi, belirli bir antibiyotiğin klinik infeksiyonda etkisiz olmasını ifade etmektedir. Patojenik bakterilerde antibiyotik dirençliliği mikrobiyolojik ya da klinik olarak tanımlanabilmektedir. Mikrobiyolojik direnç, laboratuvar testlerinde eşik değerin tespit edilmesiyle ortaya konabilmektedir. Klinik direnç ise, teröpötik yetersizliğin ihtimali ile ilişkili antimikrobiyal aktivitenin seviyesidir. Klinik direnci belirleyen testin eşik değeri, infeksiyon alanı ya da ilacın dozu gibi klinik ortamın durumu ile değişmektedir. In vitro olarak da antibiyotik dirençliliği, organizmalara karşı antibiyotiğin minimal bakterisit konsantrasyonu ve minimal inhibisyon konsantrasyonunun uygun laboratuvar koşulları altında ölçülmesi ile tanımlanmaktadır (Macgovan ve Macnaughton, 2013).

Çoklu antibiyotik direnci terimi ile ilgili olarak gerek Avrupa Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (European Centre for Disease Prevention and Control) gerekse Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (US Centers for Disease Prevention and Control) tarafından karşılaştırılabilir verilerin rapor edilmesi ve çeşitli antimikrobiyal direnç profillerinin derecelendirilmesinin kolaylaştırılması için, uluslararası bir terminoloji yayınlamıştır. Bu kullanılan sisteme göre, çoklu antibiyotik direnci, bir mikroorganizmanın üç ya da daha fazla antimikrobiyal sınıftan en az bir ajana karşı direnç göstermesi olarak tanımlanmıştır. Hastane kaynaklı *S. aureus*'un beta laktam antibiyotiklere, makrolidlere, florokinolonlara ve aminoglikozidlere karşı gösterdiği direnç çoklu antibiyotik dirence örnektir (Theuretzbacher, 2013)

Antimikrobiyal direncin gelişmesinde başta antimikrobiyal ajanların kullanım dozları ve sınıfı olmak üzere, dirençli mikroorganizmalarla çapraz infeksiyon sıklığı, toplum davranışları, sosyal yapı ve yetersiz sürveyans gibi temel etkenler rol oynamaktadır (Aksoy ve ark, 2007).

1.7.1. *S. aureus*'un Direnç Geliştirdiği Antibiyotikler

1.7.1.1. Penisilin direnci

Beta laktam grubundan olan penisilinler ilk antibiyotiklerden biridir. Penisilinler, *Penicillium chrysogenum* türü küflerden üretilmiş olup, piyasaya sürülmelerinden kısa süre sonra *S. aureus* suşları tarafından direnç gelişmiştir. *S. aureus* izolatlarının 1946 yıllarında yaklaşık %6'sı beta laktamaz üretmekteyken bu oran 1948'de %50'lere, 1957'de ise %80'lere kadar yükselmiştir. Günümüzde ise bu oran %90'dan fazladır (Lowy, 2003; Schito, 2006).

Penisiline karşı stafilokokal direnç *blaZ* geni aracılığıyla olmaktadır. Bu gen beta laktamızı kodlamaktadır. Beta laktamaz genelde, stafilokokların beta laktam antibiyotiklerine maruz kaldığında sentezlenip, beta laktam halkası hidrolize olur. *blaZ* geni, birbirine komşu antireseptör *blazRI* ve reseptör *blaI* düzenleyici genlerinin kontrolü altındadır (Lowy, 2003).

1.7.1.2. Metisilin direnci

Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA), Avrupa, Amerika, Kuzey Afrika, Ortadoğu ülkeleri ve Orta Asya'da en yaygın antibiyotik dirençli patojen olarak tanımlanmaktadır. Metisilin 1959 yılında penisilin dirençli *S. aureus*'un neden olduğu infeksiyonların tedavisi için üretilmiştir. Danimarka'da 1967 ile 1971 yılları arasında yaklaşık %15 *S. aureus* izolatında metisilin direnci yanında penisilin, tetrasiklin, streptomisin ve nadiren de eritromisin direnci görülmüştür. Avrupa'da 1970-1980 yılları arasında MRSA sayısında azalma olmasına karşın, aynı yıllarda Amerika Birleşik Devletleri, İrlanda ve İngiltere'de artış göstermesiyle endişenin tekrarlanmasına neden olmuştur (Grundmann ve ark, 2006; Ippolito ve ark, 2010).

Günümüzde tüm dünyada nozokomiyal infeksiyonların en önemli etkenleri başında MRSA gelmektedir. İntravenöz katater ile ilgili infeksiyonlar, suni solunum cihazı ile ilgili pnömoniler ve cerrahi yara infeksiyonları Amerika Birleşik Devletleri gibi endüstrileşmiş ülkelerde görülen MRSA'nın neden olduğu en yaygın nozokomiyal infeksiyonlardır. Ayrıca son zamanlarda MRSA'ya bağlı infektif endokardit büyük endişe olmaya başlamıştır (Uhlemann ve ark, 2014). Amerika Birleşik Devletleri'nde 2005 yılında yaklaşık 478.000 hospitalizasyon vakasının *S. aureus* infeksiyonlarıyla ilişkili olduğu, Avrupa'da ise 2010 yılında 150.000'den fazla insanın, MRSA'nın neden olduğu hastalıklardan dolayı hospitalize olduğu belirtilmektedir (Doyle ve ark, 2012). Metisiline direnç mekanizması 1981 yılında

penisilin bağlayıcı proteinin (PBP) azalmış afinitesinin tespit edilmesiyle ortaya çıkmıştır. Peptidoglikanın çapraz bağlanmasını engelleyen ve hücre duvarı biyosentezi için gerekli olan PBP'e beta laktam antibiyotikleri bağlanmaktadır. MRSA'da beta laktamlara direnç, taşınabilir genetik eleman olan stafilokokal kaset kromozomu (*SCCmec*) kazanılmasıyla görülmektedir. PBP'nin değiştirilmesiyle oluşan PBP2a/PBP2' *mecA* geni tarafından kodlanmaktadır. *mecA* geni de *SCCmec* tarafından taşınmaktadır ve beta laktam antibiyotiklere afinite azalmaktadır. Sonuç olarak, beta laktam antibiyotiklerin farklı inhibitör seviyelerinin varlığında bile MRSA'da hücre duvarı sentezi devam etmektedir (Paterson ve ark, 2014).

1.7.1.3. Aminoglikozid direnci

Aminoglikozidler 1944 yılında üretilmesine karşın; 1950'li yıllarda *S. aureus*'un aminoglikozid dirençli suşları tespit edilmiştir. Gentamisin, tobramisin ve netilmisin stafilokoklara karşı kullanılan en aktif aminoglikozidlerdir. Aminoglikozidler hücre duvarına etkili ajan olarak da kullanılmaktadır (Smith ve Jarvis, 1999; Schito, 2006).

S. aureus'un aminoglikozidlere karşı birçok direnç mekanizması vardır. Aminoglikozidlere karşı görülen en yaygın direnç, enzimatik modifikasyondur. Birçok metisilin dirençli suş aminoglikozidi modifiye eden enzim üretmektedir. Böylece aminoglikozidler etkisini kaybederek direnç oluşmaktadır. Enzimatik modifikasyon, fosfotransferaz'lar, asetiltransferaz'lar ya da nükleotidiltransferaz'lar tarafından katalize edilerek O-fosforilasyon, N-asetilasyon ya da O- nükleotidilasyon ile meydana gelmektedir. Çok sayıda aminoglikozid modifiye eden genler aminoglikozid üreten bakterilerden kaynaklanmaktadır. Bu genler transpozonlarda ve taşınabilir elemanlarda tespit edilmiştir olup, Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler arasında geniş olarak yayılmıştır (Mccallum ve ark, 2010).

1.7.1.4. Kinolon direnci

Florokinolonlar ilk olarak 1980'li yıllarda, Gram negatif bakteriyel infeksiyonların tedavisi amacıyla üretilmiştir. Ancak, Gram pozitif bakteriyel spektrumunda sahip olması nedeniyle, ayrıca pnömokokal ve stafilokokal infeksiyonların tedavisinde de kullanılmaktadır. Kinolon direnci, metisilin dirençli suşlar arasında daha belirgin olmak üzere, *S. aureus* suşları arasında hızla meydana gelmiştir. Sonuç olarak, antistafilokokal ajan olarak florokinolonların kullanımı önemli ölçüde azalmıştır (Lowy, 2003).

Florokinolonlar, translasyon ve transkripsiyon için gerekli olan DNA'nın çözülmesini engeller. Florokinolon direnci kromozomal mutasyon sonucu ya da efflux pompasının harekete geçmesi ile kazanılmıştır. Yüksek bakteriyel yoğunluk, dirençli alt populasyonların muhtemelen önceden de var olması ve bazen de çevrede meydana gelen sınırlı kinolon konsantrasyonlarının stafilokokal infeksiyon alanlarında elde edilmesi sonucu dirençli mutantlar gelişmektedir (Smith ve Jarvis, 1999; Lowy, 2003). *S. aureus*'ta ikinci kinolon direnç mekanizması ise *norA* çoklu ilaç direnci efflux pompasının indüksiyonudur. *S. aureus*'da bu pompada artmış ifade düşük seviyede kinolon direncine yol açabilir. Çoklu ilaç taşıyıcısı *norA* sadece norfloksasin direnci değil; ayrıca beta laktamlara, kloramfenikole ve tetrasiklinlere karşı da dirence neden olur (Lowy, 2003; Mccallum ve ark, 2010).

1.7.1.5. Tetrasiklin direnci

Tetrasiklinler, 1950 yılında keşfedilmiş bakteriyostatik etkili, toprak kökenli olan birçok *Streptomyces* türünden elde edilen, bakteri protein sentezini inhibe eden antibiyotik grubudur. Tetrasiklinler, protein sentezini ribozomun 30S alt ünitesine bağlanarak engellemektedirler (Smith ve Jarvis, 1999).

Tetrasiklin direncinin genel olarak artması ve yayılması aktarılabılır plazmidler, transpozonlar ve integronlar ile desteklenmektedir. *Staphylococcus aureus*'ta, taşınabilir tet geninin kodladığı iki farklı türde tetrasiklin direnç proteinleri ile iki farklı tipte direnç mekanizmaları oluşturmaktadır. Bunlardan birincisi, aktif efflux pompası mekanizmasıdır. Bu direnç *tet* geninin kodladığı yaklaşık 46 kDa ağırlığında olan ve sırasıyla 459 ve 458 aminoasitten meydana gelen *tetK* ve *tetL* proteinleri ile oluşmaktadır. Bu proteinlerin varlığında tetrasiklinler efflux pompası yoluyla enerji kullanılarak hücre dışına atılmaktadırlar. Yakın zamanda tanımlanan kromozomal olarak kodlanan *tet38* efflux pompası, *S. aureus*'da tetrasiklin direncine katılmaktadır. Tet38, *mgrA* geni tarafından düzenlenmektedir (Mccallum ve ark, 2010; Wendlandt ve ark, 2013). Bu proteinler ribozoma bağlanarak yapısını değiştirip tetrasiklinlerin bağlanmasını engellemektedirler. Bu direnç türü minosiklinler de dahil olmak üzere tüm tetrasiklinleri kapsamaktadır (Wendlandt ve ark, 2013).

1.7.1.6. Trimetoprim sülfametoksazol direnci

Trimetoprim ilk kez İngiltere’de 1962 yılında kullanılmaya başlanmış, bunu takiben 1968 yılından itibaren ise sülfametoksazol ile birlikte kullanılmaya başlanmıştır. Trimetoprim ve sülfametoksazol, timidin, pürin, DNA ve bazı aminoasitlerin üretilmesi için gerekli olan tetrahidrofolat sentezini inhibe ederek etkilerini gösterirler. Sülfonamid direnci, dihidropteroat sentetaz enziminin değişimi ya da para benzoik asidin fazla üretimine bağlı olarak oluşmaktadır (Smith ve Jarvis, 1999). Trimetoprime karşı oluşan direnç ise, dihidrofolat enziminin fazla üretilmesi, dihidrofolat redüktaz enzimi için yapısal genlerin mutasyonu ve dihidrofolat redüktaz enziminde direnci kodlayan *dfr* genlerinin kazanılması ile gelişmektedir. *dfrA* geni *Tn4003* transpozonu ile ilişkili olup stafilokoklar arasında en yaygın bulunan genidir. Trimetoprim lokal olarak kullanıldığında hızlı dirence neden olmaktadır. Buna ilişkin 1992 yılındaki yayınlanan raporlara göre, MRSA izolatlarının %28’inin trimetoprime, %35’inin ise sülfonamide karşı dirençli olduğunu ortaya koymaktadır (Smith ve Jarvis, 1999).

1.7.1.7. Linezolid direnci

Linezolid, oksazolinidon grubunda yer alan gram pozitif infeksiyonların tedavisinde kullanılan sentetik bir antimikrobiyal ajandır. Linezolid, 50S ribozomal alt ünitesinin 23S ribozomal RNA’sına bağlanarak protein sentezini inhibe eder. Etki mekanizmasının farklılığından dolayı diğer protein sentez inhibitörleriyle arasında çapraz direnç görülmemektedir (Stryjewski ve Corey, 2009; Sancak, 2011). Hastane ve toplumsal kaynaklı MRSA suşlarını da içeren *S. aureus* suşları arasında, linezolid direnci pek yaygın değildir. Ancak, MRSA infeksiyonlu hastalarda linezolid ile tedavi boyunca direnç geliştiği rapor edilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri ve diğer ülkelerde, *S. aureus* izolatlarında linezolid direncinin MIC değeri %0,1 olarak belirlenmiştir. Direnç, *S. aureus*’un esas olarak 23S rRNA geninin mutasyonu ile ilişkilidir. MRSA izolatları arasında linezolide en yaygın direnç mekanizması 23S rRNA’daki beşinci alanın merkez düğümündeki spesifik nükleotid değişimidir. En çok *G2576T*, *T2500A* ve *G2447T* mutasyonlarına rastlanılmaktadır. Ayrıca ribozomal proteinlerde (L3 ve L4) meydana gelen değişikliklerde dirence neden olabilmektedir (Stryjewski ve Corey, 2009; Mccallum ve ark, 2010; Sancak, 2011).

1.7.1.8. Makrolid, linkozamid ve streptogramin direnci

Bu grupta bulunan antibiyotikler kısaca MLS (Makrolid, Linkozamid, Streptogramin) antibiyotikleri olarak da bilinirler. Bunlar etkilerini bakteri hücrelerinin 50S ribozomal alt ünitesini hedef alıp, bu bölgede protein sentezini inhibe ederek gösterirler. Penisiline aşırı duyarlı hastalar için, MLS antibiyotikleri stafilokokal infeksiyonların tedavisinde alternatif oluştururlar. Klinik olarak MLS antibiyotiklerine karşı en sık rastlanan direnç, metiltransferaz enzimi tarafından rRNA'nın metilasyonu ya da dimetilasyonu sonucu oluşmaktadır. Bir diğer direnç tipi ise *msrA* geni ile ilgilidir. Bu direnç tipinde antibiyotikler, aktif efflux pompası ile bakteri dışına atılarak, hücre içi konsantrasyonu korunmaktadır. Böylece MLS antibiyotikleri ribozoma bağlanmak için gerekli seviyeye ulaşamamaktadır (Schito, 2006; Mccallum ve ark, 2010). Makrolid direnci, 23S rRNA'nın nükleotid sekansındaki spesifik adeninin metilasyonu sonucu oluşmaktadır. Bu direnç en çok plazmid ya da kormozomlarda bulunan *ermA*, *ermB*, *ermC* genleri tarafından kontrol edilmektedir (Schito, 2006).

1.7.1.9. Vankomisin direnci

Vankomisin, metisilin dirençli stafilokokların neden olduğu infeksiyonların tedavisi için kullanılan ilaç seçeneklerinden biridir. Vankomisine dirençli *S. aureus* suşlarının ortaya çıkışı, 1988'de vankomisine dirençli enterokokların saptanmasından sonra beklenmekteydi ancak 2002 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde görülen ilk klinik infeksiyona kadar rapor edilmemiştir. Vankomisin dirençli *S. aureus* büyük olasılıkla bakteriler arası genetik materyalin değişimi nedeniyle, direnç kazanmasıyla vankomisin duyarlı *S. aureus*'a göre farklı biçimde meydana geldiği düşünülmüştür. Amerika Birleşik Devletleri'nde ortaya çıkan ilk olayda belirlenen izolatta *vanA* geninin kazanımı VRE suşlarından *Tn1546* transpozonu ile transferi sonucu meydana gelmektedir. Transpozon daha sonrasında, bu VRSA izolatında çoklu direnç gösteren konjugatif plazmid dahilinde barınmaktadır. Vankomisine direnç, D-alanil-D-alanin yerine D-alanil-D-laktat sentezlenmesi sonucu gelişmektedir (Appelbaum, 2007).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. İzolasyon Örnekleri

Bu çalışmanın materyalini 2017 yılı Ocak-Haziran ayları arasında Denizli iline kayıtlı 20 süt sığırcılığı işletmesinde bulunan, 380 sağmal ineğe Kaliforniya Mastitis Test (CMT) uygulanması sonucunda CMT pozitif reaksiyon (1+, 2+, 3+) vererek subklinik mastitis tanısı konulan meme loblarından alınan 200 adet süt örneği oluşturdu. Süt örnekleri subklinik mastitisli ineklerden laktasyon döneminde alınmış olup yaklaşık son 4 hafta antibiyotik kullanılmamış, Simental ırkı ve yaşları 3-12 arasında değişen ineklerden alınmıştır. Öncesinden süt örnekleri toplanacak ineklerin meme lobları veteriner hekim tarafından muayene edilmiş sonrasında tek tek tüm ineklere uygulanmıştır.

2.1.2. Standart Suşlar ve Pozitif Kontroller

Çalışmada polimeraz zincir reaksiyonunda (PZR) *S. aureus*'ların belirlenebilmesi için *nuc* geni taşıyan izolatların tespit edilmesinde pozitif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 29213, negatif kontrol olarak *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, incelenen toksin genlerinin pozitif kontrolü olarak bu genleri içerdiği tespit edilen sekanslanmış saha izolatları ve antibiyogram çalışmalarında kalite kontrol suşu olarak da *S. aureus* ATCC 29213 suşu kullanıldı.

2.1.3. Kullanılan Besiyerleri

Toplanan süt örneklerinden izolasyon ve identifikasyon için stafilokok izolasyonu için geliştirilmiş spesifik bir agar olan Mannitol Salt Phenol Red Agar (MSA) (Merck 1.05404), izolatların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde ise Mueller-Hinton Agar (MHA) (Oxoid CM 129), izolatların saklanması için ise yağsız süt tozu (Skim Milk Powder– Fluka Analytical 70166-500G) kullanıldı.

2.1.3.1. Mannitol salt agar (MSA)

Besiyeri 108 g tartıldıktan sonra üzerine 1 lt distile su eklenip mikrodalga fırında eritildi. Besiyerinin pH'sı 7.2 ± 0.2 olarak ayarlanıp otoklavda 121°C 'de 15 dakikada sterilize edildikten sonra yaklaşık $50-55^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutulup her bir petriye yaklaşık 20 ml kadar döküldü.

Mannitollü tuzlu Agar, koagülaz negatif stafilocoklardan koagülaz pozitif stafilocokların (örn. *S. aureus*) ayrıştırılması için Chapman tarafından tasarlanan bir formülasyondur. Mannitollü tuzlu Agar, klinik örneklerden ve kozmetik ürünlerinden stafilocokların izole edilmesi amacıyla kullanılır. Mannitollü tuzlu Agar, peptonları ve temel besinleri sağlayan sığır ekstraktını içerir. %7,5 sodyum klorür konsantrasyonu stafilocoklar dışındaki bakteriyel organizmaların kısmi veya tam inhibisyonu ile sonuçlanır. Fenol kırmızısı indikatöründeki renk değişimi ile görülen, mannitol fermantasyonu stafilocok türlerinin ayrıştırılmasını sağlar. Koagülaz pozitif stafilocoklar (örn; *S. aureus*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus simulans*), sarı koloniler ve çevresinde sarı besiyeri oluştururken koagülaz negatif stafilocoklar kırmızı koloniler oluşturur ve fenol kırmızısı indikatörde hiç renk değişimi olmaz (Chapman, 1945)

2.1.3.2. Mueller hinton agar (MHA)

Besiyeri 38 g tartıldıktan sonra üzerine 1 lt distile su eklenip mikrodalga fırında eritildi. Besiyerinin pH'sı $7,2\pm 0,2$ olarak ayarlanıp otoklavda 121°C 'de 15 dakikada sterilize edildikten sonra yaklaşık $50-55^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutulup her bir petriye yaklaşık 20 ml kadar döküldü.

2.1.3.3. Skim milk powder

1 lt distile suyun üzerine distile su miktarının %10'u kadar besiyeri tartılıp ilave edildi ve mikrodalga fırında eritildi. Mikrodalga eritildikten sonra 1,5 ml lik ependorf tüplere 1'er ml dağıtıldıktan sonra besiyerinin pH'sı $7,2\pm 0,2$ olarak ayarlanıp otoklavda 121°C 'de 15 dakikada sterilize edildi.

2.1.4. Boyalar ve Ayıraçlar

2.1.4.1. Gram boyama seti

İzolatların Gram boyanma morfolojilerinin belirlenebilmesi amacı ile kullanılmış olup ticari olarak temin edilen Gram Boyama Seti oda ısısında muhafaza edildi.

2.1.4.2. Katalaz testi

Gram pozitif kokların (*Staphylococcus*, *Streptococcus*) ayırımında kullanılmış olup bu test için hidrojen peroksit (H₂O₂) kullanıldı.

2.1.4.3. Koagülaz testi

Katalaz pozitif olarak belirlenen *Staphylococcus* spp.'lerin patojenitesini belirlemek amacıyla kullanıldı. Bu test için tavşan plazması kullanıldı.

2.1.5. Antibiyotik diskleri

Çalışmada tüm antibiyotik diskleri Oxoid marka olup ampisilin (10 µg), penisilin G (10 IU), trimetoprim-sülfametaksazol (23,75/1,25 µg), tetrasiklin (30 µg), sefoksitin (30 µg), enrofloksasin (5 µg), linezolid (30 µg), eritromisin (15 µg) ve vankomisin (30 µg) diskleri kullanıldı. Bu disklerin hepsi kullanılana kadar buzdolabı ısısında (+4°C) muhafaza edildi.

2.1.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

2.1.6.1. Solüsyon ve boyalar

2.1.6.1.1. TBE (Tris, Borik Asit, EDTA, pH:8,0) buffer

10X TBE Stok Solüsyonu

Tris Base [tris (hydroxymethyl) aminomethane].....	108 g
Borik Asit.....	55 g
EDTA.....	7,5 g

800 ml distile suda eritildikten sonra hacim 1000 ml'ye tamamlandı. pH: 8,0'e ayarlanıp 121°C'de 15 dk otoklavda sterilize edilip oda ısısında muhafaza edildi.

0.5X TBE Kullanma Solüsyonu

10X TBE..... 50 ml
Distile su..... 950 ml

Karıştırılarak solüsyon hazırlandı. Hazırlanan bu solüsyon, hem agaroz hazırlamada hem de elektroforez tankı içerisinde kullanıldı.

2.1.6.1.2. Yükleme tamponu (Loading Buffer) (6X) (ThermoFisher R0611)

Agaroz jele örnek yüklemek amacı ile karışım toplam 7 µl (1 µl yükleme tamponu 6 µl ampikon) olacak şekilde kullanıldı. Ticari olarak temin edilen boya buzdolabı ısısında (+4°C) saklandı.

2.1.6.2. Primerler

PZR ile ilk olarak izolatların *S. aureus* olup olmadıklarını belirlemek için termonükleaz geni (*nuc*) primerleri kullanılarak teyit edildi.

Sonrasında ise tüm *S. aureus* suşlarının ürettiği eksfoliyatif toksin genleri (*eta*, *etb*, *etd*), süperantijen niteliğinde olan toksik şok sendrom toksin geni (*tst-1*) ve sitolitik aktiviteye sahip Pantone-Valentine lökositin toksin (*luk-PV*) genleri incelendi. Çalışmada kullanılan primerler, dizilimleri, ampikon büyüklükleri ve kaynakları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılmış olan primerler

Gen	Primer	Dizi (5'-3')	Ampikon büyüklüğü (bp)	Kaynak
<i>nuc</i>	NUC-1 NUC-2	GCGATTGATGGTGATACGGTT AGCCAAGCCTTGACGAACATAAAGC	279	Kim ve ark. 2001
<i>eta</i>	ET-1 ET-2	CTATTTACTGTAGGAGCTAG ATTTATTTGATGCTCTCTAT	741	Yamaguchi ve ark. 2002
<i>etb</i>	ET-3 ET-4	ATACACACATTACGGATAAT CAAAGTGTCTCCAAAAGTAT	629	
<i>etd</i>	ET-14 ET-15	AACTATCATGTATCAAGG CAGAATTTCCCGACTCAG	376	
<i>tst-1</i>	TST1 TST2	AGCATCTACAAACGATAATAT CATTGTTATTTCCAATAAAGC	481	Seier-Petersen ve ark. 2015
<i>luk-PV</i>	PVL-1 PVL-2	ATCATTAGGTAATAATGTCTGGACATGATCCA GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAAGC	433	Lina ve ark. 1999

2.1.6.3. Kullanılan cihazlar

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), 96 örnek kuyucuklu Boeco (USA) marka kademeli termal döngüleme cihazında, elektroforez VWR marka, 64 kuyucuk kapasiteli elektroforez tankında, görüntüleme Vilber Lourmat (Infinity VX2, Almanya) marka görüntüleme cihazında gerçekleştirildi.

2.1.6.4. Agarose jel

Agarose (Sigma)..... 1,5 g
TBE (0,5X)..... 100 ml

Tartılan agaroz şişe içerisine alındıktan sonra üzerine 0,5X'lik Buffer'dan 100 ml ilave edilip karıştırıldı ve mikrodalga fırında yaklaşık 3 dk kadar kaynatıldı. Kaynadıktan sonra homojenize olan karışım yaklaşık 50°C'ye kadar soğutuldu. Elektroforez işleminde kullanılacak olan bu homojenize olmuş agaroz jelin boyanmasında ise Safe View (ABM, Canada) boyası, 100 ml %1,5'lik agarose jelin içerisine 7 µl miktarında eklenerek kullanıldı. Sıvı halde bulunan homojenize karışım jel kalıbına yavaşça ve hava kabarcığı oluşturmayacak şekilde döküldü ve kuyucukları oluşturan taraklar yerleştirilip yaklaşık 20 dk kadar soğutulmaya bırakıldı. Soğutulduktan sonra taraklar çıkarılıp elektroforez tankına yerleştirildi.

2.1.6.5. Marker

Marker olarak 100 bp'lik (Fermentas®) DNA Ladder kullanıldı.

2.2. Yöntem

2.2.1. Örneklerin Alınması

Mastitisli olduğu belirlenmiş ineklerden sütler alınmadan önce eller antiseptikli solüsyonla yıkandı ve eldiven giyildi. Tüm meme lobları bol temiz suyla yıkandıktan sonra %70'lik alkolle temizlendi. Saprofit mikroorganizmaları uzaklaştırmak amacıyla birkaç ml süt atıldıktan sonra bir enjektöre yaklaşık 3-5 ml olacak şekilde alındı (Baştan, 2002). Toplanan bu süt örnekleri, izolasyon ve identifikasyon yapılmak üzere, soğuk

zincir altında Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarı'na ulaştırıldı.

2.2.2. Stafilokok İzolasyonu

Stafilokok izolasyonu için ise steril biçimde toplanan süt örneklerinden MSA'ya ekildi. 37°C'de 48-72 saat inkübasyon sonucunda üreyen koloniler değerlendirildi.

2.2.3. *S. aureus*'un İdentifikasyonu

İzole edilmiş olan *S. aureus*'ların biyokimyasal testlerle fenotipik olarak belirlendikten sonra identifikasyon, PZR ile de genotipik olarak teyit edildi. Genotipik identifikasyonda, *S. aureus* kromozomunda lokalize olmuş olan termonükleaz enzimini kodlayan *nuc* geninin varlığı tüm izolatlarda araştırıldı. *nuc* geni, endonükleaz özelliğe sahip olup hem DNA hem de RNA indirgeyici özelliğe sahiptir ve enzimatik aktivitesi 100°C'de 1 saate kadar devam edebilir (Lachica ve ark, 1972). Ayrıca moleküler olarak 17.000 moleküler dalton ağırlığındadır (Tucker ve ark, 1978).

2.2.3.1. Fenotipik identifikasyon

İzolatların identifikasyonu Mannitollü tuzlu Agar'da üreyebilme yeteneği, Gram boyama morfolojileri ve katalaz testi ile belirlendi.

2.2.3.1.1. Biyokimyasal testler

Mannitollü tuzlu Agar'da üreyebilme yeteneği gösteren kolonilerden direkt olarak Gram boyama yapıldı. Gram pozitif kok olduğu belirlenen kolonilere sonrasında katalaz testi yapıldı.

2.2.3.1.1.1. Katalaz testi

Mannitollü tuzlu Agar'da üreyen 24 saatlik saf kolonilerden temiz bir lam üzerine damlatılan hidrojen peroksit ile muamele edildi. Katalaz pozitif olan kolonilerde muamele sonrası bir köpürme aktivitesi görüldü.

2.2.3.1.1.2. Lam koagülaz testi

Lam koagülaz testinde ise bağı koagülaz = kümeleştirme faktörü (clumping factor) gösterilmektedir. Bağı koagülaz kültür filtratlarına geçmez, hücreye bağıdır. Besiyerinden öze ile alınan stafilokok kolonisi lam üzerinde bir damla distile su ile homojenize edilir ve üzerine bir damla plazma damlatılıp elde çevrilerek karıştırılır. Olumlu sonuçlarda gözle görülen kümeleşmeler oluşur (Anderson, 1983).

2.2.3.2. Genotipik identifikasyon

Moleküler çalışmalarda kullanılmak amacıyla ilk olarak tüm bakterilerden aşağıda bildirildiği şekilde DNA ekstraksiyonları yapıldı.

2.2.3.2.1. DNA ekstraksiyonu

İlk olarak *S. aureus* suşlarından PZR’de kullanılmak üzere DNA ekstraksiyonu ticari bir genomik DNA ekstraksiyon kiti (Fermentas®) kullanılarak üretici firmanın önerdiği şekilde aşağıdaki gibi uygulandı:

- * 200 µl saf su ile bir öze dolusu bakteri ependorf içinde süspanse edilip üzerine 400 µl lizis solüsyonu eklendi ve 65°C’de 5 dakika inkübe edildi.
- * İnkübasyonun ardından karışıma 600 µl kloroform ilave edildi ve 10.000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi.
- *Santrifüjden sonra üstte kalan sıvı yeni bir ependorfa aktarıldı ve yeni ependorf üzerine 800 µl presipitasyon solüsyonu ilave edildi. Presipitasyon solüsyonu, 720 µl steril distile su ile 80 µl 10x konsantrasyonlu presipitasyon solüsyonu ile karıştırılarak elde edildi.
- *10.000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi.
- *Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra, tüp dibinde kalan pelete 100 µl 1,2 M NaCl ilave edilerek vortekslendi.
- *300 µl soğuk %96’lık etanol eklenerek 10 dakika -20°C’de DNA’nın presipitasyonu sağlandı.
- *10.000 rpm’de 3-4 dakika santrifüj edildi.
- *Üstteki etanol dökülerek pelet %70’lik 300 µl soğuk etanol ile yıkandı ve etanol uzaklaştırılarak kurutma kağıdı üzerinde ependorf içindeki pelet kurutuldu.

*Pelet kurutulduktan sonra DNA 100 µl steril distile suda çözdürülerek vortekslendi. Her bir PZR reaksiyonu için 1,5 µl template DNA kullanıldı.

İzolatlardan elde edilen genomik DNA'ların bütünlük kontrolü %1'lik agaroz jel elektroforezi ile yapıldıktan sonra, saflık ve miktar tayinleri spektrofotometre ile yapıldı. Spektrofotometrede DNA'ların 260 nm ve 280 nm'deki absorpsanları (OD260 ve OD280) hesaplanıp, OD260/OD280 oranı 1,8-2,0 arasında olan DNA'lar saf olarak değerlendirildi ve PZR'da kullanıldı (Sambrook ve ark, 1989).

2.2.3.2.2. PZR

Tüm PZR'larında mastermikslerin hazırlanması, DNA amplifikasyonu, elektroforezis ve PZR ürünlerinin görüntülenmesi üzere dört farklı basamak uygulanmıştır.

Mastermikslerin hazırlanışı: Bir örnek için PZR amplifikasyonu 50 µl toplam hacimde, son konsantrasyon 10X Taq enzimi tampon çözeltisi 1X, 25 mM MgCl₂ 2 mM, 10 mM dNTP 0,2 mM, 100 pmol primer (her biri için) 0,4 pmol, 5U Taq DNA polymerase 1,5 U (Fermentas) olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Mastermikslere hazırlandıktan sonra 0,2 ml'lik tüpler, örnek sayısı kadar numaralandırılıp, içlerine 50'er µl hazırlanılan mastermiksten ilave edilip üzerine DNA'dan 2'er µl alınıp, ilgili tüplerin içlerine ilave edildi ve ağzıları sıkı bir şekilde kapatıldı. Hazırlanan tüpler daha sonra termal döngüleme cihazlarına yüklenip, programlandı. Kullanılan malzemeler ve miktarları Tablo 2'de belirtilmiştir.

Tablo 2. Mastermikslere hazırlanma oranları

Malzeme (Konsantrasyon)	Son Konsantrasyon	10 örnek için kullanılan miktar (µl)
Buffer (10X)	1 X	50
MgCl ₂ (25 mM)	2 mM	40
dNTP (10 mM)	0,2 mM	10
Primer-F (100 pmol)	0,4 pmol	2
Primer-R (100 pmol)	0,4 pmol	2
Taq Polimeraz (5 U)	0,3 µl/ 50 µl	3
dH ₂ O	Son miktara tamamlanır	392,5
TOPLAM		500

DNA amplifikasyonu: Hazırlanan tüpler termal döngüleme cihazlarına yüklenip, programlandı. Sikluslar 94°C'de 3 dakika başlangıç denatürasyonu takiben; 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 55°C (*eta, etd*), 57°C (*tst-1, etb, luk-PV*) 30 saniye bağlanma, 72°C 60 saniye uzama, toplam 35 siklus, 72°C'de 7 dakika son uzama olacak şekilde ayarlandı.

Elektroforez: Elde edilen amplifikasyon ürünlerinden 5 µl alınarak, 1 µl 6X loading dye boyası ile karıştırıldı. Toplamda 6 µl olan bu karışımın tamamı alınarak jeldeki uygun

pozisyondaki kuyucuğa yüklenmesinden sonra elektroforez tankının kapağı kapatılıp DNA örnekleri 100 voltta 45 dakika elektroforez işlemine tabi tutuldu.

Görüntüleme ve Değerlendirme: Elektroforez süresinin bitiminin ardından görüntüleme işlemine geçildi. Çıkarılan %2'lik jel bilgisayara bağlı durumdaki transilluminatör cihazındaki odacığa yerleştirildi. UV ışığı altında fotoğraflandıktan sonra bant uzunlukları her PZR için ayrı ayrı incelendi. Değerlendirme daha önce bildirilen şekilde (Tablo 1) yapıldı. Buna göre değerlendirmede *nuc* PZR için 279 bp, *tst-1* PZR için 481 bp, *luk-PV* PZR için 433 bp, *eta* PZR için 741 bp, *etb* PZR için 629 bp, *etd* PZR için 376 bp uzunluklarında bant uzunluklukları arandı (Tablo 1).

Sekans Analizi: Saha izolatları içerisinde toksin genlerini taşıyanların varlığını belirlemek için gerçekleştirilen PZR işlemi sonrasında elde edilen amplikonlardan birer tanesi sekans analizlerinin gerçekleştirilmesi için özel bir firmaya (Macrogen, Korea) gönderildiler. Firmada saflaştırmayı takiben ABI Primse cihazı ile sekans analizi gerçekleştirildi. Elde edilen bu sekansları pozitif kontrol olarak kullanmak için gen bankası ile karşılaştırıldı. Bu amaçla National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Nucleotide-Nucleotide BLAST programı kullanıldı.

2.2.4. Antibiyotik Duyarlılık Testinin Yapılışı ve Değerlendirilmesi

S. aureus olarak tanımlanmış olan izolatlar Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI)'nin önerdiği şekilde Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak antibiyotik duyarlılık testi uygulandı. Bunun için izolatlar MSA'da canlandırıldıktan sonra brohtaki bakteri kültürü %0,9'luk NaCl içinde 0,5 McFarland (1×10^8 kob/ml) bulanıklığına denk gelecek şekilde ayarlandı. Hazırlanmış bakteri süspansiyonlarına steril swap daldırılıp tüp içerisinde süzülerek MHA yüzeyine yayıldı. Besiyeri kuruduktan sonra antibiyotik diskleri agar yüzeyi ile temas edecek şekilde ve aralarındaki mesafe 20 mm'den yakın olmayacak biçimde petrilere yerleştirildi. Daha sonra $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucu her bir izolat için disk etrafındaki inhibisyon zon çapları cetvelle ölçülerek değerlendirme daha önce bildirilen kriterlere göre yapıldı (CLSI, 2017). Antibiyogram çalışmalarında kalite kontrol suşu olarak da *S. aureus* ATCC 29213 suşu kullanıldı.

Antibiyotik duyarlılık testlerinde, sahada mastitis enfeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla kullanılan 9 antimikrobiyal aileye ait 9 adet antibiyotik kullanıldı. Kullanılan antimikrobiyal ajanlar, disk içerikleri ve değerlendirme kriterleri Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan antimikrobiyal ajanlar, disk içerikleri ve değerlendirme kriterleri

Antibiyotik grubu	Antimikrobiyal ajan	Disk İçeriği	Duyarlı	Orta Duyarlı	Dirençli	Kaynak
Beta Laktam	Ampisilin	10 µg	≥ 29		< 28	CLSI 2016
Penisilin	Penisilin G	10 IU	≥ 29		< 28	CLSI 2017
Sulfonamidler	Sulphametaxazole/ Trimethoprim	1,25 / 23,75 µg	≥ 16	11-15	≤ 10	CLSI 2017
Tetrasiklinler	Tetrasiklin	30 µg	≥ 19	15-18	≤ 14	CLSI 2017
Sefalosporinler	Cefoxitin	30 µg	≥ 22		< 22	CLSI 2016
Florokinolon	Enrofloksasin	5 µg	≥ 22		<22	CLSI 2001
Oksazolidinon	Linezolid	30 µg	≥ 21		< 21	CLSI 2017
Makrolid	Eritromisin	15 µg	≥ 23	14-22	≤ 13	CLSI 2017
Glikopeptid	Vankomisin	30 µg	≥ 15		< 15	CLSI 2010

3. BULGULAR

3. 1. İzolasyon ve İdentifikasyon

Bu çalışmada 200 mastitisli süt örneğinin Mannitollü tuzlu Agar'a ekilmesi sonucunda bu besiyerinde sarı ve pembe renkli üreyen tüm kolonilere Gram boyama yapıldı. Gram pozitif kok görünümünde olan tüm izolatlar katalaz testi uygulandı. Katalaz pozitif olduğu tespit edilen 65 izolat *Staphylococcus* spp. (%32,5) olarak değerlendirildi. Bu izolatların 31 (%15,5) tanesi lam koagulaz testi pozitif olması nedeni ile *S. aureus* olarak tanımlandı.



Resim 1. MSA'da mannitol negatif (üstte) ve mannitol pozitif (altta) üreyen stafilocoklar

İdentifiye edilen tüm izolatlar moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere %20'lük Skim Milk Media'da -20°C'de muhafaza edildi.

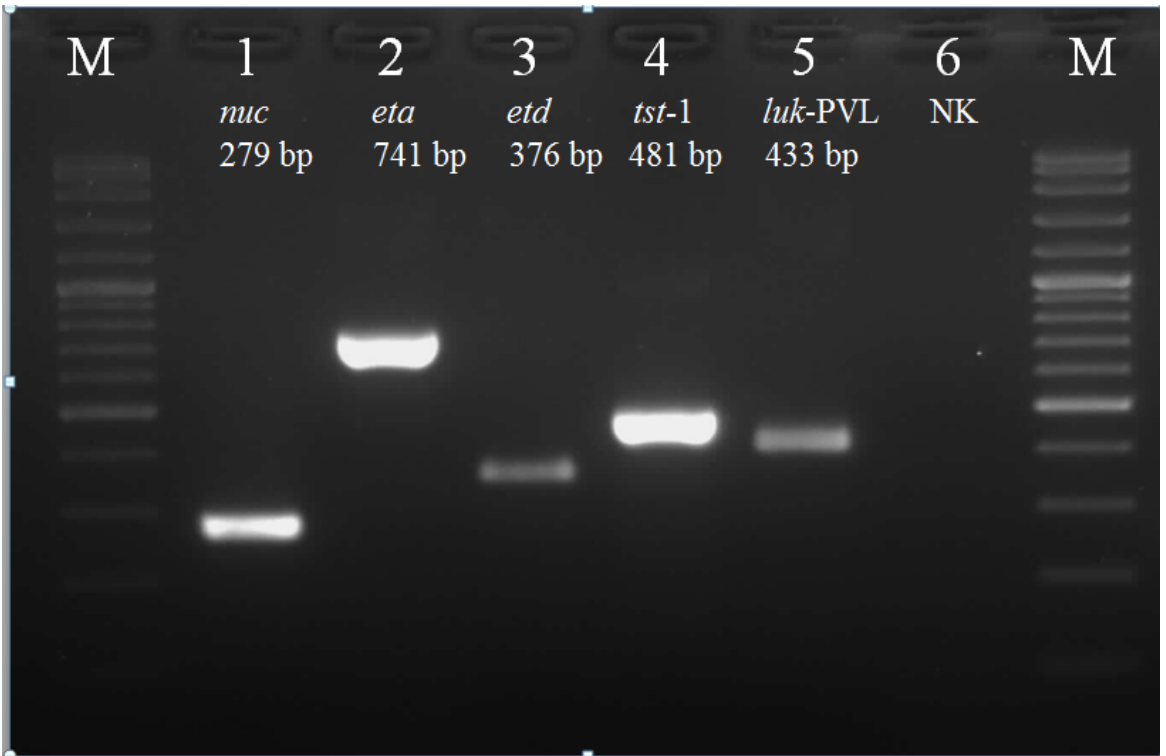
3.2. Genotipik İdentifikasyon

Mevcut *S. aureus* izolatlarının fenotipik identifikasyonlarının genotipik olarak teyit edilmesi için tüm *S. aureus*'larda bulunan termonükleaz genini içeren "nuc" geninin varlığı PZR ile incelendi. nuc genine spesifik primerle yapılan PZR sonrasında, 31 izolatın tamamında 279 bp uzunluğunda PZR ürünü elde edilip izolatların *S. aureus* oldukları teyit edildi. Bundan sonra 31 izolatın toksin genleri PZR ile ve antibiyotik dirençlilikleri disk difüzyon yöntemi ile incelendi.

3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Bu çalışmada *nuc* geni ile *S. aureus* oldukları doğrulanmış izolatlarda toplamda 5 önemli toksin geni (*eta*, *etb*, *etd*, *tst-1*, *luk-PV*) varlığı PZR ile incelendi.

Yapılan çalışmada *S. aureus* olarak tanımlanan 31 adet izolatın toksin genlerinin PZR ile incelenmesi sonucu olarak izolatların %48,38 (15/31)'inin bu toksin genlerinin en az bir tanesinin bulunduğu gösterildi. Toksin geni taşıyan izolatların %73,3 (11/15)'ünün *etd*, %33,3 (5/15)'ünün *luk-PV*, %26,6 (4/15)'sının *tst-1*, %13,3 (2/15)'ünün *eta* genlerini taşıdığı belirlendi. İzolatların hiçbirisi *etb* geni taşıyordu (Tablo 4, Tablo 5, Resim 2).



Resim 2. Toksin genlerinin jel elektroforez görüntüleri. 1. *nuc* geni pozitif *S. aureus* ATCC 29213 suşu 2. *eta* geni pozitif sekanslanmış saha izolatı 3. *etd* geni pozitif sekanslanmış saha izolatı 4. *tst-1* geni pozitif sekanslanmış saha izolatı 5. *luk-PV* geni pozitif sekanslanmış saha izolatı 6. Negatif kontrol (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212) M: 100 bp DNA ladder.

Çalışmada polimeraz zincir reaksiyonunda incelenen toksin genlerinin pozitif kontrolü olarak bu genleri içerdiği tespit edilen sekanslanmış saha izolatları kullanıldı. Aşağıda sırasıyla *eta*, *etd*, *luk-PV*, *tst-1* genlerinin PZR ürünlerinin sekans sonuçları verilmiştir (Resim 3, Resim 4, Resim 5, Resim 6).

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results						
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Staphylococcus aureus strain 08-02119, complete genome	809	809	89%	0.0	91%	CP015645.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus phage B236, complete genome	809	809	89%	0.0	91%	KP893290.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus phage B166, complete genome	809	809	89%	0.0	91%	KP893289.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus phage phiETA3 DNA, complete genome, strain: TY32	809	809	89%	0.0	91%	AP008954.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus phage phiETA2 DNA, complete genome, strain: TY94	809	809	89%	0.0	91%	AP008953.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus aureus exfoliative toxin A (eta), complete cds	809	809	89%	0.0	91%	L25372.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus phage phiETA DNA, complete genome	809	809	89%	0.0	91%	AP001553.1
<input type="checkbox"/> S.aureus eta gene encoding epidermolytic toxin A, complete cds	809	809	89%	0.0	91%	M17357.1
<input type="checkbox"/> S.aureus exfoliative toxin A (ETA), complete cds	809	809	89%	0.0	91%	M17347.1

Resim 3. eta geni sekans sonucu

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Staphylococcus aureus DNA, complete genome, strain: JP080	551	551	94%	5e-153	96%	AP017922.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus aureus strain ST20130943, complete genome	551	551	94%	5e-153	96%	CP012974.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus aureus strain ST20130942, complete genome	551	551	94%	5e-153	96%	CP012976.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus aureus subsp. aureus strain GR2, complete genome	551	551	94%	5e-153	96%	CP010402.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus aureus genome assembly NCTC13435, chromosome: 1	551	551	94%	5e-153	96%	LN831036.1
<input checked="" type="checkbox"/> Staphylococcus aureus strain DK-B3 exfoliative toxin D (etd), glutamyl-endopeptidase, and epidermal cell differentiation inhibitor B (edin-B) genes, complete cds	551	551	94%	5e-153	96%	KC609427.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus aureus subsp. aureus 11819-97, complete genome	551	551	94%	5e-153	96%	CP003194.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus aureus IS256, ORF5, ORF6, etd, ORF2, edin-B, ORF7, ORF8, ORF9, ORF10, ORF11 genes, complete cds	551	551	94%	5e-153	96%	AB057421.1

Resim 4. etd geni sekans sonucu

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
CP002110.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus TCH60, complete genome	654	2568	84%	0.0	99%
AB532026.1	Staphylococcus aureus lukPVS, lukPVF genes for Panton-Valentine le	654	654	37%	0.0	99%
AB532025.1	Staphylococcus aureus lukPVS, lukPVF genes for Panton-Valentine le	654	654	37%	0.0	99%
AB532024.1	Staphylococcus aureus lukPVS, lukPVF genes for Panton-Valentine le	654	654	37%	0.0	99%
FJ821791.1	Staphylococcus aureus strain ER4 panton-valentine leukocidin S (lukS	654	654	37%	0.0	99%
AB488779.1	Staphylococcus aureus lukPVS, lukPVF genes for Panton-Valentine le	654	654	37%	0.0	99%
FJ713816.1	Staphylococcus phage phiPVL-CN125, complete genome	654	654	37%	0.0	99%
AP009363.1	Staphylococcus phage phi2958PVL proviral DNA, complete sequeunce	654	654	37%	0.0	99%
EU518770.1	Staphylococcus aureus strain HT20060855 LukS-PV (lukS-PV) gene,	654	654	37%	0.0	99%
EU518769.1	Staphylococcus aureus strain HT20050287 LukS-PV (lukS-PV) gene,	654	654	37%	0.0	99%
EU518768.1	Staphylococcus aureus strain HT20030826 LukS-PV (lukS-PV) gene,	654	654	37%	0.0	99%
EU518766.1	Staphylococcus aureus strain HT20040994 LukS-PV (lukS-PV) gene,	654	654	37%	0.0	99%
EU518765.1	Staphylococcus aureus strain HT20020383 LukS-PV (lukS-PV) gene,	654	654	37%	0.0	99%
EU518764.1	Staphylococcus aureus strain HT20010461 LukS-PV (lukS-PV) gene,	654	654	37%	0.0	99%
EU518763.1	Staphylococcus aureus strain HLY19990053 LukS-PV (lukS-PV) gene,	654	654	37%	0.0	99%
EF571836.1	Staphylococcus aureus strain US78 PVL toxin gene, partial cds	654	654	37%	0.0	99%

Resim 5. luk-PV geni sekans sonucu

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Staphylococcus aureus strain CFSAN007847 chromosome, complete genome	804	804	96%	0.0	99%	CP017684.1
Staphylococcus aureus tst gene for toxic shock syndrome toxin-1, complete cds	804	804	96%	0.0	99%	AB084255.1
S.aureus toxic shock syndrome toxin-1 gene, complete cds	787	787	96%	0.0	99%	J02615.1
Staphylococcus aureus isolate VBI-M1443 toxic shock syndrome toxin-1 precursor (tst) gene, complete cds	754	754	96%	0.0	98%	EF531615.1
Staphylococcus aureus pathogenicity island SaPIbov, complete sequence	754	754	96%	0.0	98%	AF217235.1
Staphylococcus aureus RF122 complete genome	754	754	96%	0.0	98%	AJ938182.1
Staphylococcus aureus subsp. aureus ED133, complete genome	749	749	96%	0.0	97%	CP001996.1
Staphylococcus aureus isolate VBI-M1424 toxic shock syndrome toxin-1 precursor (tst) gene, complete cds	745	745	96%	0.0	97%	EF531614.1

Resim 6. *tst-1* geni sekans sonucu.

Tablo 4. *S. aureus* izolatlarının içerdikleri toksin gen sayıları ve oranları

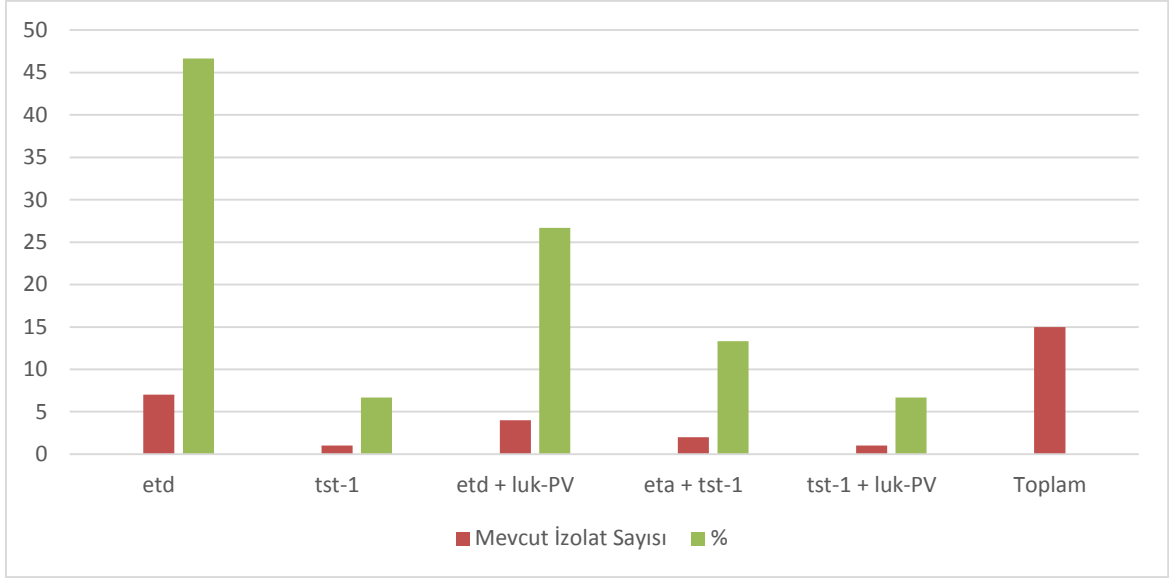
	<i>eta</i>	<i>etb</i>	<i>etd</i>	<i>tst-1</i>	<i>luk-PV</i>
1	-	-	+	-	-
2	-	-	+	-	-
3	-	-	+	-	-
4	-	-	+	-	-
5	-	-	+	-	-
6	-	-	+	-	+
7	-	-	+	-	+
8	-	-	+	-	+
9	-	-	+	-	-
10	-	-	+	-	+
11	+	-	-	+	-
12	+	-	-	+	-
13	-	-	-	+	-
14	-	-	-	+	+
15	-	-	+	-	-
Toplam	2 (13,3)	0 (0,0)	11 (73,3)	4 (26,6)	5 (33,3)

En az bir virulens geni taşıyan izolat sayısı=15

Tablo 5. *S. aureus* izolatlarının toksin genlerinin dağılımı

Genotip	Toksin gen(ler)	Mevcut izolat sayısı (%)
1	<i>etd</i>	7 (46,6)
2	<i>tst-1</i>	1 (6,6)
3	<i>etd</i> + <i>luk-PV</i>	4 (26,6)
4	<i>eta</i> + <i>tst-1</i>	2 (13,3)
5	<i>tst-1</i> + <i>luk-PV</i>	1 (6,6)
TOPLAM		15

İzolatların toksin genlerinin dağılımına baktığımızda %46,6 (7/15)'sı yalnızca *etd* ve %6,6 (1/15)'sının yalnızca *tst-1* genlerini taşıdıkları; %26,6 (4/15)'sının hem *etd* hem *luk-PV*, %13,3 (2/15)'ünün ise hem *eta* hem *tst-1*, %6,6 (1/15)'sının da hem *tst-1* hem *luk-PV* genlerini birlikte taşıdıkları saptandı (Şekil 1).



Şekil 1. *S. aureus* izolatlarının taşıdıkları toksin genlerin sayısı ve oranları

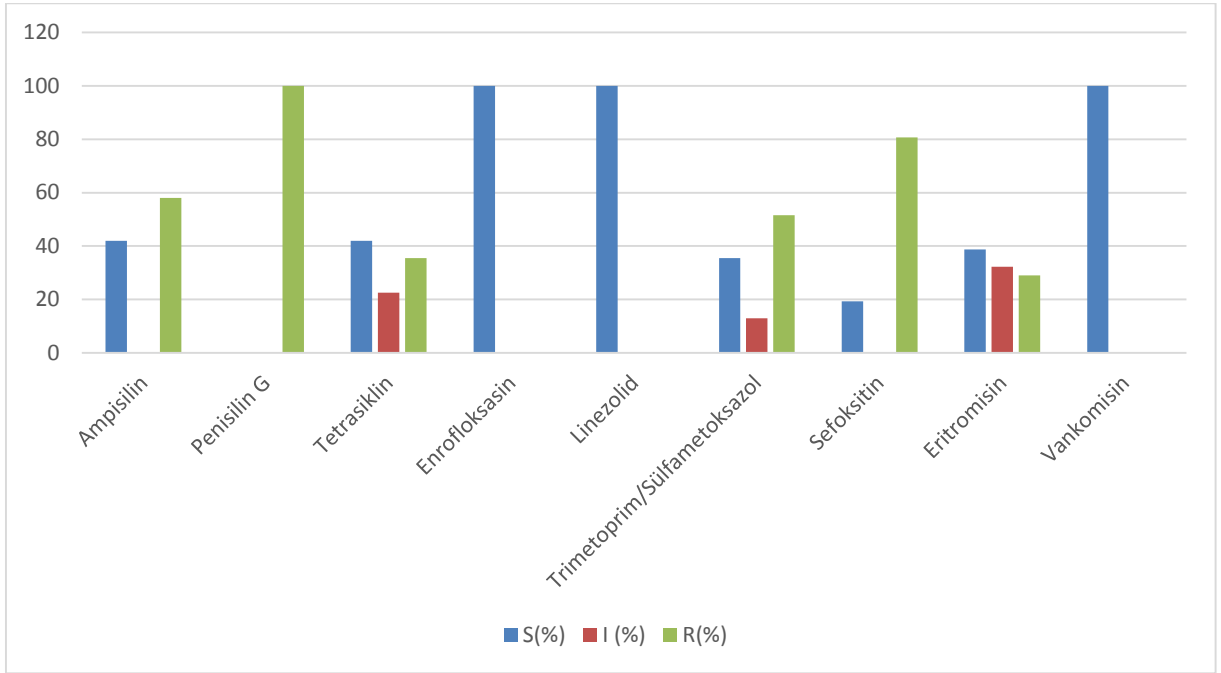
3.4. Antibiyotik Dirençlilik

Mevcut tüm *S. aureus* izolatları dokuz antimikrobiyal aileye ait dokuz antibiyotiğe karşı dirençlilikleri incelendi. Otuzbir izolatın %58,1 (18/31)'i ampisiline, %51,6 (16/31)'sı trimetoprim/sülfametoksazole, %35,5 (11/31)'i tetrasikline, %29,1 (9/31)'i eritromisine, %80,6 (25/31)'sının sefoksitine karşı dirençli olduğu belirlendi. İzolatların tümü penisilin G'ye karşı dirençli olup aynı zamanda enrofloksasin, linezolid ve vankomisine karşı duyarlı olduğu saptandı (Tablo 6, Şekil 2).

Tablo 6. İzolatların antimikrobiyellere karşı direnç oranları

Antibiyotik adı	Duyarlı S (%)	Orta Duyarlı I (%)	Dirençli R (%)
Ampisilin	13 (41,9)	0 (0,0)	18 (58,1)
Penisilin G	0 (0,0)	0 (0,0)	31 (100,0)
Tetrasiklin	13 (41,9)	7 (22,6)	11 (35,5)
Enrofloksasin	31 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Linezolid	31 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Trimetoprim/sülfametoksazol	11 (35,5)	4 (12,9)	16 (51,6)
Sefoksitin	6 (19,4)	0 (0,0)	25 (80,6)
Eritromisin	12 (38,7)	10 (32,2)	9 (29,1)
Vankomisin	31 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

*Toplam izolat sayısı n=31



Şekil 2. *S. aureus* izolatlarının antibiyotiklere duyarlılık ve direnç oranları

Genel bir değerlendirme yapıldığında incelenen izolatların tümünün penisiline karşı dirençli oldukları tespit edilmiş olup ayrıca izolatların hepsinin oksazolidinon, kinolon ve glikopepted grubu antimikrobiyel maddelere karşı tümünün duyarlı olduğu belirlenmiştir.

En az üç antimikrobiyel aileye karşı bakterilerde dirençlilik oluştuğunda çoklu direnç olarak kabul edilmektedir (Theuretzbacher, 2013). Buna göre 31 izolatın 23'ü (%74,1) çoklu antimikrobiyel dirençli idi. Bununla birlikte izolatların %16,1 (5/31)'i 4, %32,2 (10/31)'si 5 antimikrobiyel aileye karşı dirençli olduğu belirlendi (Tablo 7).

Tablo 7. *S. aureus* izolatlarının antibiyotik direnç fenotipleri

No	Dirençli antimikrobiyal aile	Antibiyotik direncinin fenotipi	Dirençli izolat sayısı (%)
1	Penisilin Sülfonamid Sefalosporin	Penisilin G Trimetoprim sülfametoksazol Sefoksitin	2 (8,6)
2	Tetrasiklin Penisilin Sefalosporin	Tetrasiklin Penisilin G Sefoksitin	4 (17,3)
3	Sefalosporin Beta laktam Penisilin	Sefoksitin Ampisilin Penisilin G	1 (4,3)
4	Sülfonamid Penisilin Beta laktam	Trimetoprim sülfametoksazol Penisilin G Ampisilin	1 (4,3)
5	Penisilin Sülfonamid Sefalosporin Makrolid	Penisilin G Trimetoprim sülfametoksazol Sefoksitin Eritromisin	1 (4,3)
6	Sefalosporin Penisilin Makrolid Beta laktam	Sefoksitin Penisilin G Eritromisin Ampisilin	3 (13,0)
7	Beta laktam Penisilin Sülfonamid Sefalosporin	Ampisilin Penisilin G Trimetoprim sülfametoksazol Sefoksitin	1 (4,3)
8	Penisilin Makrolid Sülfonamid Sefalosporin Beta laktam	Penisilin G Eritromisin Trimetoprim sülfametoksazol Sefoksitin Ampisilin	4 (17,3)
9	Tetrasiklin Sefalosporin Sülfonamid Penisilin Beta laktam	Tetrasiklin Sefoksitin Trimetoprim sülfametoksazol Penisilin G Ampisilin	6 (26,6)
TOPLAM			23 (100,0)

4. TARTIŞMA

Küresel olarak mastitis, süt sığırcılığını etkileyen en korku verici bulaşıcı bir hastalıktır ve süt endüstrisinde varlığını sürdürmektedir. Sığır mastitisinin önlenmesi, tedavisi ve başarılı bir yönetimi, her çiftlik sahibi için vazgeçilmez bir görevdir. *S. aureus* kaynaklı mastitislerin sonuçları oldukça değişken olmakla birlikte kısmen suş özelliklerine bağlıdır.

Türkiye’de yılda 11 milyon ton süt üretildiği, süt ineklerinin %30’unun mastitisli olduğu, mastitis sebebiyle süt verimindeki azalmanın %10 civarı olduğu belirtilmektedir. Mastitisler, toplam sığır hastalıklarının %26’sını oluşturmaktadır. Ülkemizde önceki yıllarda yapılan araştırmalarda çokça mastitis vakası belirlenmiş, tespit edilen vakaların %21,4’ünün klinik, %78,6’sının subklinik olarak seyrettiği belirlenmiştir.

Mastitisin etiolojisinde rol oynayan mikrobiyal etkenlerin önemleri ülkelere ve aynı ülke içinde değişik bölgelere göre farklılık göstermekle birlikte, gerek ülkemizde gerekse dünyada klinik ve subklinik mastitis olgularından izole edilen mikroorganizmalar arasında *S. aureus*’un ilk sıralarda olduğu yapılan birçok araştırmada ortaya konmuştur.

Mastitisli süt örneklerinde yürütülen araştırmalarda ise, Hazari ve ark. (2018), Hindistan’ın Chhattisgarh eyaletinde yaptığı çalışmada 300 adet mastitisli süt örneğinden 164 (%54,6) *S. aureus* izole ettiğini bildirmiştir. Sharma ve Brinty (2014), Hindistan’da yaptığı bir çalışmada 120 süt örneğinden CMT pozitif olan 43 adet süt örneğinden 36 (%83,7) *S. aureus* izole ettiklerini tespit etmişlerdir. Wirtu ve ark (2018), Etiyopya’nın Bishoftu şehrinde yaptığı çalışmada 46 çiftlik hayvanın toplamda 128 meme kanalının 21’i CMT pozitif olarak belirleyip, 9 meme kanalından (%42,8) *S. aureus* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Hamid ve ark. (2017) Hindistan’ın Jamnu şehrinde yaptıkları çalışmada 160 adet mastitisli süt örneğinden 36 (%22,5) *S. aureus* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Hoque ve ark. (2018) yaptığı bir çalışmada Bangladeş’te tesadüfi olarak taranan 175 inekten 50 tanesi CMT ile mastitis olduğunu belirlemişler ve bu süt örneklerinden izole edilen *S. aureus* oranını %62 olarak bildirmişlerdir. Sağlam ve ark. (2017) Kars’ta yaptıkları çalışmada CMT pozitif olan 235 süt örneğinden 117 (%49,7) *Staphylococcus* izole ettiklerini tespit etmişlerdir. Tel ve ark. (2009) Şanlıurfa’da yaptıkları çalışmada subklinik mastitisli ineklerden aldıkları 258 süt örneğinden 84 (%32,5) *S. aureus* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Sevinti ve Şahin (2009)’in Kars’ın Sarıkamış ilçesinde yaptıkları bir çalışmada CMT pozitif 61 inekten alınan 79 süt örneği mikrobiyolojik muayeneye tabi tutuldu ve 61’inde üreme gözlemlendi ve %34,3 oranında *S. aureus* izole ettiklerini bildirdiler. Kaynarca ve Türkyılmaz (2010)’ın Aydın yöresinde

yaptıkları bir çalışmada 152 sağmal inekten aldıkları 339 süt numunesinden %24,5 oranında koagülaz negatif stafilokok ve %20,9 oranında ise koagülaz pozitif stafilokok izole ettiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise mastitisli 200 adet inek süt örneğinden 31 adet (%15,5) *S. aureus* izole edilmiş olup bu oran, . Bunun sebebi olarak hayvanın yaşı, çalışılan numune sayısı, hijyen şartları, farklı coğrafik bölgeler, iklim çeşitlilikleri, farklı yöntemle yapılmış çalışmalar olabileceği düşünülmüştür.

Bu çalışmada mastitise sebep olan *S. aureus*'ların bazı toksin genlerinin belirlenmesinde PZR kullanıldı. Avustralya'da Gogoi-Tiwari ve ark. (2015) mastitisli ineklerden izole ettiği 154 *S. aureus* izolatından %8,44 *tst-1* ve %2,6 *luk-PV* geni tespit etmiştir. Çin'de Wang ve ark. (2014) yaptığı çalışmada 3 ayrı Holştayn çiftliğinden toplanan toplam 353 süt örneğinden izole edilen 29 *S. aureus* izolatının %41,5'inde *luk-PV* genine rastladıklarını bildirmişlerdir. Kot ve ark. (2016) yaptığı bir çalışmada Polonya'da, virülens gen profili incelenmek üzere subklinikli mastitisli ineklerden izole edilen 124 *S. aureus* suşlarından %2,4'ünde *tst-1* geni, %5,6'sında *eta* geni, %8,9'unda ise *etd* geni varlığını bildirmişlerdir. Xie ve ark. (2011) yaptığı çalışmada Çin'de 14 ayrı şehirdeki 16 ayrı hastanedeki hasta insanlardan izole edilen 108 *S. aureus* izolatlarında toksin genlerinin dağılımını %48,1 *tst-1* geni, %1,8 *eta* geni, %8,3 *etd* rapor etmişlerdir. Tokaijan ve ark.(2011) Lübnan'da yaptıkları bir çalışmada hastaneden izole edilen 93'ü metisilin dirençli (MRSA), 37'si ise metisilin duyarlı (MSSA) toplam 130 adet *S. aureus* izolatının *eta* ve *etb* genlerinin varlığını incelemişler ve her iki grupta *eta* prevalansı %11 iken, *etb* prevalansı ise metisilin dirençli *S. aureus* izolatında %3, metisilin duyarlı *S. aureus* izolatında %9 olarak bulunduğunu bildirmişlerdir. Baniardalan ve ark. (2017) İran'ın Hamedan şehrinde yaptığı bir çalışmada 7 adet süt ineği sürüsünden toplanan süt örneklerinden 76 adet *S. aureus* izolatında %1,3'ünde *tst-1* geni saptamışlardır. Arias ve ark. (2016)'ın Kolombiya'da Kolombiya Hastanesi'nden izole ettikleri 81 *S. aureus* izolatında %2,5 oranında *eta* geni, %42 oranında *etd* geni ve %6,2 oranında *tst-1* geni tespit etmişlerdir. Hayakawa ve ark. (1998) Japonya'da yaptıkları bir çalışmada mastitisli inek sütünden izole edilen 162 adet *S. aureus* izolatından 2 tanesinde (%1,2) *eta* geni bulunduğunu saptamışlardır. Farahmand-Azar ve ark. (2012) İran'ın Doğu ve Batı Azerbaycan şehirlerinde yaptıkları çalışmada 9 ayrı çiftlikten izole edilen 58 *S. aureus* izolatında, 9 izolatta (%15,5) *tst-1* geni tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise %13,3 oranında *eta*, %73,3 oranında *etd*, %26,6 oranında *tst-1* ve %33,3 oranında *luk-PV* geni belirlenmiş olup izolatlarda *etb* genine rastlanmamıştır.

Enfeksiyon hastalıklardan koruma ve tedavi amacıyla hayvanlarda genellikle amoksisilin, tetrasiklinler, aminoglikozidler, florokinolonlar, sulfonamid, tilosin,

linkozamidler, kolistin ve pleuromutilinler gibi çeşitli antimikrobiyeller kullanılmaktadır (Gyles 2008, Hendriksen ve ark. 2008). Çiftlik hayvanlarında antimikrobiyel kullanımı, bu hayvanlarda bulunan bakterilerde antimikrobiyel direncin oluşmasına ve prevalansının artmasına neden olmaktadır. Bu bakteriler, doğrudan temas veya bu hayvanlardan elde edilen ürünlerle dolaylı olarak insanlara geçebilmekte ve insanlarda kullanılan antimikrobiyellerin etkisini azaltabilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda *S. aureus* izolatlarının penisiline %19-90,7, amoksisiline %36,6-45,6, metisiline %0-17,5, eritromisine %3,3-21,5, gentamisine %0-56,3, tetrasikline %3,3-26,1, trimetoprim-sulfometaksazole %1,8-45,6, linkomisine %22,3 ve kinolonlara %0-13 oranlarında dirençli oldukları belirlenmiştir (Çelik ve Solmaz 2010, Güler ve ark 2005, Macun ve ark 2011, Sevinti ve Şahin 2009, Tel ve Keskin 2011, Türütöğlü ve ark 2006, Ünal ve ark 2012, Ünal ve İstanbulluoğlu 2009).

S. aureus suşlarının çeşitli antibiyotiklere karşı direnç profilleri birçok çalışma ile belirlenmiştir. Genç ve Kaya (2015)'nin yaptığı bir çalışmada, subklinik mastitisli ineklerden topladığı 100 adet süt numunesinden 28 adet *S. aureus* izole edilmiş olup bu izolatların %70'i enrofloksasin ve %100 oranında penisiline dirençlilik göstermiş olup aynı zamanda izolatların %60'ı ampisiline ve tamamı trimetoprim sülfametoksazole duyarlı bulunmuştur. Wang ve ark. (2018)'in yaptığı çalışmada, mastitisli çiğ sütlerden izole ettiği 96 *S. aureus* izolatında penisiline %31,3, enrofloksasine %15,6, eritromisine %5,2 ve tetrasikline %1 oranında dirençlilik bildirmişlerdir. Yang ve ark. (2016)'in Kuzeybatı Çin'de yaptıkları çalışmada, mastitisli ineklerden izole edilen 44 adet *S. aureus* izolatında tetrasikline %15,9, penisiline %84,1, eritromisine ise %20,4 oranında dirençlilik bildirmişlerdir. Güney Etiyopya'da Daka ve ark. (2012)'in yaptıkları bir çalışmada 78 *S. aureus* izolatının %38,5'inin vankomisine dirençli olduğunu tespit etmişlerdir. Rosario ve ark. (2017)'in Uruguay'da 12 farklı şehirden subklinik ve klinik mastitisli ineklerden 8 yıllık periyotlarca (2008-2015) izole ettikleri toplam 1631 *S. aureus* izolatından disk diffüzyon yöntemi ile antibiyogram yapılmış olup penisiline en yüksek dirençlilik 2010 yılında %36,9 olarak belirlenmişken eritromisin direnç oranı 2015 yılında %5,7 olarak bildirilmiştir. Mehmeti ve ark. (2016)'in Kosova'da klinik mastitisli ineklerden izole ettikleri 89 adet *Staphylococcus* spp. izolatından disk diffüzyon yöntemiyle yaptıkları antibiyogram sonucunda eritromisine %3,3, tetrasikline %50,6, penisiline %91,0 ve ampisiline %68,5 oranında dirençlilik bildirmişlerdir. Dokutan ve ark. (2016)'in klinik örneklerden izole ettikleri 183 adet *S. aureus* izolatının tamamı linezolide duyarlı olduğu bildirilmiştir. Arias ve ark. (2016)'in Kolombiya'da hasta insanlardan izole ettikleri 81 adet *S. aureus* izolatından, disk diffüzyon yöntemiyle yaptıkları antibiyogram sonucunda tetrasikline %27,2 oranında dirençlilik oranı mevcutken, trimetoprim

sülfametoksazole dirençli izolata rastlanmadığını bildirmişlerdir. Ertem ve ark. (2013)'ın yaptıkları çalışmada hastane kaynaklı toplam 172 izolat değerlendirilmiş olup izolatların 60'ı metisilin dirençli *S. aureus*, 60'ı metisilin dirençli koagülaz negatif *Staphylococcus* spp. ve 52 tanesi *Enterococcus* spp. olarak tanımlanmış ve çalışmadaki tüm *Staphylococcus*'lar linezolide duyarlı bulunmuştur. Garipcin ve Seker (2015)'in Afyonkarahisar'da 35 farklı özel çiftliklerden topladıkları toplam 400 (150 insan, 250 çiftlik hayvanı) nazal svab örneği aldılar. İnsan nazal svablardan %8,7 (13/150) ve çiftlik hayvanlarından %1,2 (3/250) oranında MRSA izole ettiler ve çiftlik hayvanlardan izole edilen MRSA'larda yapılan antibiyogram sonucunda tüm izolatlar eritromisine dirençli iken, trimetoprim sülfametoksazole ve tetrasikline duyarlı bulunmuştur. Tassew ve ark. (2016)'ın Etiyopya'da klinik ve subklinik mastitisli ineklerde yaptığı çalışmada 40 inekten alınan toplamda 53 örnekten izole edilen *S. aureus* izolatlarından disk difüzyon yöntemiyle antibiyogram yapıldı ve izolatların hiçbirinde eritromisine dirençlilik rastlanmazken tetrasikline %77,4, sefoksitine %47,2, penisiline %100 oranında dirençliliğe rastlandı. Yaptığımız çalışmada ise toplam 31 *S. aureus* izolatlarında ampisilin, penisilin G, tetrasiklin, enrofloksasin, linezolid, trimetoprim sülfametoksazol, sefoksitin, eritromisin ve vankomisine dirençlilik oranları sırasıyla %58,1, %100, %35,5, %0, %0, %51,6, %80,6, %29,1 ve %0 olarak bulunmuştur.

Yaptığımız bu çalışmada izolatların %74,1'inin çoklu antibiyotik direncine sahip olması önemli ve dikkat çekici bir bulgudur. Dirençli izolatlar, direkt temas sonucu diğer çiftlik hayvanlarına bulaşabileceği gibi farklı yollarla (damlacık, hastane kaynaklı, sindirim) insanlara da bulaşabilmektedir. Patojen mikroorganizmaların çoklu antibiyotik direnç özelliklerinin çeşitli yollarla (konjugasyon, transdüksiyon) diğer mikroorganizmalara aktarılması ve artması ve benzer antibiyotik gruplarının insan ve hayvan tedavisinde kullanılıyor olması, hayvan ve insan tedavisinde kullanılacak antibiyotik çeşidinde bir azalmaya yol açacağı sonucunu da kuşkusuz beraberinde getirmektedir. Bu durumda dirençli bakteri suşlarının ortaya çıkmasına neden olan antibiyotiğin etkinliği azalmakta, buna bağlı olarak ilaç kullanımı da artmaktadır. Konu bu yönü ile önemli bir halk sağlığı problemidir. Özellikle Türkiye gibi gelişmekte olan ülkelerde çiftlik hayvanlarında MDR (çoklu ilaca dirençli) suşların sayısının artmış olması hayvancılık ve insan sağlığı için ciddi bir tehdit olmakla birlikte ayrıca patojenik olan bu izolatların antimikrobiyal dirençliliklerinin düzenli aralıklarla izlenmesi gerekmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada *S. aureus* identifikasyonunda fenotipik ve genotipik yöntemler birlikte kullanılmıştır. Her ne kadar konvansiyonel yöntemler kullanılarak gerçekleştirilen izolasyon ve identifikasyon, altın standart olarak kabul edilse de, moleküler çalışmaların daha kısa sürede ve daha güvenilir sonuçlar vermesi gibi sebepleriyle zamandan tasarruf bakımından laboratuvarlarda daha sık kullanımı yararlı olmaktadır.

Bu çalışmada subklinik mastitisli ineklerden alınan süt örneklerinden elde edilen *S. aureus* izolatlarında önemli toksin genlerinin varlığı incelendi ve 31 *S. aureus* izolatının 15 tanesinde en az bir adet toksin geni saptandı.

Enterotoksin üreten *S. aureus* izolatları insanlarda gıda zehirlenmelerine yol açmaktadır. Yeterli pastörizasyon işlemi görmemiş sütlerde bu toksinleri üreten patojenin bulunması halk sağlığı açısından potansiyel bir tehlikedir. Bu nedenle çalışmamızda elde edilen stafilokok izolatlarında belirlenen toksin genlerini (*eta*, *etd*, *luk-PV*, *tst-1*) taşıyan izolatların oranının azımsanmayacak düzeyde olması önem arz etmektedir. Çünkü, *S. aureus*'un toksinleri ile insan ve hayvan hastalıkları arasında önemli bir korelasyon mevcuttur. Sindirim sistemi yolu ile alınan toksik şok sendrom toksin-1 taşıyan sütler insanlarda septik şoka bağlı olarak çoklu organ yetmezliğine, eksfoliyatif toksin (ETA, ETB, ETD) taşıyan sütler insanlarda deride eksfoliyasyon, büllöz impetigo ve yenidoğanlarda stafilokokkal haşlanmış deri sendromu gibi deri hastalıklarına, Panton-Valentine Lökosidin toksini taşıyan sütler alındığında bakterinin konak lökosidal etkisinden kurtulmasına neden olması açısından önemlidir. Bu toksinlerin etki mekanizmalarının tam olarak anlaşılmasıyla birlikte, bu toksinlere özel inovatif terapötikler (nötralizan antikorlar) ve aşılar geliştirilebilir.

Çalışmamızda izole edilen *S. aureus* izolatlarının %74,1 oranında çoklu antibiyotik direncine sahip olması da önemli bir diğer konudur. Özellikle çiftlik sahiplerinin rastgele uyguladıkları antibiyotikler sonucunda oluşan antimikrobiyal direncin yayılması nedeni ile çoklu antibiyotik direncine sahip izolat sayısı da azımsanmayacak düzeydedir. Tedavi başarısızlığını önlemek amacıyla; antibiyotik kullanma kalitesi iyileştirilmeli, antibiyotik kullanımı konusunda klinisyenler bilgilendirilmeli, bölgesel direnç oranları saptanmalı ve buna göre antibiyotik kullanım politikaları oluşturulmalıdır.

Materyal topladığımız işletmedeki *S. aureus* orijinli mastitis vakalarının sağaltımında ampisilin, penisilin, sefoksitin, eritromisin ve trimetoprim sülfametoksazole karşı dirençlilik oranları yüksek olması nedeniyle bu antibiyotikler artık bu işletmelerde kullanılması tavsiye

edilmemektedir. Bu antibiyotikler yerine dirençlilik oranları daha düşük olan tetrasiklin, linezolid, enrofloksasin, vankomisin gibi antibiyotiklerin tedavi amacı ile kullanımı işletme açısından daha yararlı olacaktır. Mastitis etkenlerinin antimikrobiyal dirençliliklerinin belirli periyotlarla kontrol edilmesi başarılı ampirik tedaviler için gereklidir.

Sonuç olarak; materyal alınan işletmede mastitisli ineklerin sütlerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarında çoklu antibiyotik dirençli izolatların varlığı işletmede ciddi bir direnç probleminin bulunduğunu ortaya koymuş ve çeşitli toksin genlerine sahip patojenik *S. aureus* izolatlarının olması bu hayvanlardan elde edilen sütlerin halk sağlığı açısından ciddi bir tehdit oluşturabileceğini kanaatini doğurmuştur. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda izole edilen tüm *S. aureus* izolatlarının önemli diğer virülens genlerinin incelenmesi ve eğer mevcut ise izolatlar arasındaki klonal yayılımın ortaya konulmasının patojenik suşların epidemiyolojilerinin ortaya konulması açısından yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

- Aarestrup FM, Larsen HD, Eriksen NH, Elsberg CS, Jensen NE.** Frequency of alpha- and beta-haemolysin in *Staphylococcus aureus* of bovine and human origin. A comparison between pheno and genotype and variation in phenotypic expression. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* 1999, 107: 425-430.
- Adlam C, Ward PD, Turner WH, Craig GR, Edkins S, Knights JM.** The role of toxins and antitoxins in staphylococcal mastitis. *Zentralbl Bakteriologie Mikrobiologie Hygiene Supplementum* 1981, 10: 647-650.
- Aksoy DY, Tanrıöver MD, Ünal S.** Antimicrobial resistance: Preventable or inevitable? Problem of the era from two perspectives. Ed: Gould, I. M., van der Meer, J. W. *Antibiotic Policies: Fighting Resistance*. 2007, *Springer Verlag*. p: 113-133.
- Almeida RA, Matthews KR, Cifrian E, Guidry AJ, Oliver SP.** *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *Journal Dairy Sciences* 1996, 79: 1021-1026.
- Alonzo F, Torres VJ.** The bicomponent pore-forming leucocidins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2014, 78, 199–230.
- Aly S, Levit R.** Adherence of *Staphylococcus aureus* to squamous epithelium: role of fibronectin and teichoic acid. *Reviews of Infectious Diseases* 1987, 9: 341-350.
- Amagai M, Matsuyoshi N, Wang ZH, Andl C, Stanley JR.** Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded-skin syndrome targets desmoglein 1. *Nature Medicine* 2000, 6: 1275–1277.
- Anderson JC.** Mechanisms of staphylococcal virulence in relation to bovine mastitis. *British Veterinary Journal* 1976, 132: 229-245.
- Anderson JC.** Progressive pathology of staphylococcal mastitis with a note on control, immunisation and therapy. *Veterinary Record* 1982, 110: 372-376.
- Anderson JC, Adlam C, Knights JM.** The effect of staphylocoagulase in the mammary gland of the mouse. *British Journal Experimental Pathology* 1982, 63: 336-340.
- Anderson JC.** Veterinary aspects of staphylococci. In: Easmon CSF, Adlam C (eds) *Staphylococci and staphylococcal infections*, vol 1: Clinical and epidemiological aspects. London, Academic Press. 1983, 193-241.
- Anderson JC.** Absence of encapsulation in strains of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Research in Veterinary Science* 1984, 37: 359-361.

- Appelbaum PC.** Reduced glycopeptide susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *International Journal of Antimicrobial Agents* 2007, 30 (5): 398- 408.
- Arbuthnott JP, Billcliffe B.** Qualitative and quantitative methods for detecting staphylococcal epidermolytic toxin. *Journal of Medical Microbiology* 1976, 9: 191–201.
- Arias LFC, Espinal JSL, Ortiz JIM, Ibarra JJS, Aldana AA.** Relationship between super antigenicity, antimicrobial resistance and origin of *Staphylococcus aureus* isolated. *Colombia Medica* 2016, 47(1).
- Arvidson SO.** Extracellular enzymes of *Staphylococcus aureus*. In: Easmon CSF, Adlam C (eds) *Staphylococci and staphylococcal infections*, vol 2: The organism in vivo and in vitro. London, Academic Press 1983, 745-808.
- Arvidson S.** Extracellular enzymes. In: Gram-positive pathogens. Fischetti, V. A., R. P. Novick, J. J. Ferreti, D. A. Portnoy, and J. I. Rood, (eds). *American Society for Microbiology*, Washington, DC 2000, pp. 379-385.
- Bailey CJ, Smith TP.** The reactive serine residue of epidermolytic toxin A. *Biochemical Journal* 1990, 269: 535–537.
- Balwit JM, van Langevelde P, Vann JM, Proctor RA.** 1994. Gentamicin-resistant menadione and hemin auxotrophic *Staphylococcus aureus* persist within cultured endothelial cells. *The Journal of Infectious Diseases* 1994, 170: 1033-1037.
- Baniardalan S, Mohammedzadeh A, Pajohi-Alamoti M, Mahmoodi P, Sadeghinasab A.** Detection of toxic shock toxin (*tst*) gene in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk samples. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 2017, 20(3): 236-243.
- Barrío M, Rainard P, Prévost G.** LukM/LukF'-PV is the most active *Staphylococcus aureus* leukotoxin on bovine neutrophils. *Microbes and Infection* 2006, 8: 2068–2074.
- Baştan A.** İneklerde Meme Hastalıkları. *Hatipoğlu Basım ve Yayım Sanayi Ticaret Limited Şirketi* Ankara 2002, 25-78.
- Bayles KW, Iandolo JJ.** Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin. *Journal of Dairy Bacteriology* 1989, 171: 4799–4806.
- Betley MJ, Mekalanos JJ.** Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage. *Science* 1985, 229: 185–187.
- Betley MJ, Borst DW, Regassa LB.** Staphylococcal enterotoxins, toxic shock syndrome toxin and streptococcal pyrogenic exotoxins: a comparative study of their molecular biology. *Chemical Immunology* 1992, 55: 1–35.
- Bhakdi S, Tranum-Jensen J.** Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiological Reviews* 1991, 55: 733-751.

- Bilgehan H.** Gram Olumlu Koklar. Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. Fakülteler Kitabevi, İzmir, TÜRKİYE 2000, s: 239–268.
- Birhanu M, Leta S, Mamo G, Tesfaye S.** Prevalence of bovine subclinical mastitis and isolation of its major causes in Bishoftu Town, Ethiopia. *BMC Research Notes* 2017, 10: 767.
- Blaiotta G, Fusco V, von Eiff C, Villani F, Becker K.** Biotyping of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* by enterotoxin gene cluster (*egc*) polymorphism and spa typing analyses. *Applied and Environmental Microbiology* 2006, 72: 6117–6123.
- Blum G, Ott M, Lischewski A, Ritter A, Imrich H, Tschape H, Hacker J.** Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. *Infection and Immunity* 1994, 62: 606–614.
- Bramley AJ, King JS, Higgs TM, Neave FK.** Colonization of the bovine teat duct following inoculation with *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *British Veterinary Journal* 1979, 135: 149.
- Bramley AI, Dodd FH.** Reviews of the progress of dairy science: mastitis control progress and prospects. *Journal of Dairy Sciences* 1984, 51: 481-512.
- Bramley AJ, Patel AH, O'Reilly M, Foster R, Foster TJ.** Roles of alpha-toxin and beta-toxin in virulence of *Staphylococcus aureus* for the mouse mammary gland. *Infection and Immunity* 1989, 57: 2489-2494.
- Brouillette E, Martinez A, Boyll BJ, Allen NE, Malouin F.** Persistence of a *Staphylococcus aureus* small-colony variant under antibiotic pressure in vivo. *FEMS Medical Microbiology and Immunology* 2004, 41: 35-41.
- Bunce C, Wheeler L, Reed G.** Murine model of cutaneous infection with gram- positive cocci. *Infection and Immunity* 1992, 60: 2636-2640.
- Butler JE.** Bovine immunoglobulins: an augmented review. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1983, 4: 43-152.
- Caffin JP, Poutrel B.** Physiological and pathological factors influencing bovine immunoglobulin G2 concentration in milk. *Journal of Dairy Sciences* 1988, 71: 2035-2043.
- Caiazza NC, O'Toole GA.** Alpha-toxin is required for biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 2003, 185: 3214-3217.
- Cavarelli J, Prevost G, Bouquet W, Moulinier L, Chevrier B, Delagoutte B, Bilwas A, Mourey L, Rifai S, Piemont Y, Moras D.** The structure of *Staphylococcus aureus* epidermolytic toxin A, an atypic serine protease, at 1,7 Å resolution. *Structure* 1997, 5: 813–824.

- Chandler RL, Smith K, Turfrey BA.** Studies on the phagocytic potential of secretory epithelial cells in experimental mastitis. *Journal of Comparative Pathology* 1980, 90: 385-394.
- Chapman GH.** The significance of sodium chloride in studies of staphylococci. *Journal of Bacteriology* 1945, 50: 201-203.
- Cifrian E, Guidry AJ, Bramley AJ, Norcross NL, Bastilda-Corcuera FD, Marquardt WW.** Effect of staphylococcal beta-toxin on the cytotoxicity, proliferation and adherence of *Staphylococcus aureus* to bovine mammary epithelial cells. *Veterinary Microbiology* 1996, 48: 187-198.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-sixth informational supplement. CLSI document, 2016 M100-S26.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 27th Informational Supplement, 2017 M100-S26.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).** Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. CLSI document, 2010 M 100-18, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
- Couch JL, Soltis MT, Betley MJ.** Cloning and nucleotide sequence of the type E staphylococcal enterotoxin gene. *Journal of Bacteriology* 1988, 170: 2954–2960.
- Cribier B, Piemont Y, Grosshans E.** Staphylococcal scalded skin syndrome in adults. *Journal of American Academy of Dermatology* 1994, 30: 319–324.
- Daka D, Solomon G, Dawit Y.** Antibiotic-resistance *Staphylococcus aureus* isolated from cow's milk in the Hawassa area, South Ethiopia. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2012, 11: 26.
- Dancer SJ, Noble WC.** The epidermolytic toxins are serine proteases. *FEBS Letters* 1990, 268: 129–132.
- Deurenberg RH, Stobberingh EE.** The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution* 2008, 8: 747-763.
- Diker S, Akan M, Çarlı KT, Yardımcı H, Şen A, Ülgen M, Sareyyüpoğlu B, Çetin C.** Veteriner Mikrobiyoloji ve Epidemiyoloji Açık Öğretim Yayınları, 2011.
- Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM.** Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews* 2000, 13: 16-34. Review.
- Doery HM, Magnusson BJ, Gulasekharan J, Pearson JE.** The properties of phospholipase enzymes in staphylococcal toxins. *Journal of General Microbiology* 1965, 40: 283-296.

- Dokutan A, Haciseyitođlu D, Çađ Y, Yıldırım EP, Batrel A, Özer S, Gönüllü N.** Klinik örneklerden izole edilen stafilokoklarda linezolid direnci ve antibiyotik duyarlılıkları. *Ortadoğu Tıp Dergisi* 2017, 9(1): 19-23.
- Donlan RM, Costerton JW.** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* 2002, 15: 167–193. doi: 10.1128/CMR.15(2): 167-193.
- Dossett JH, Kronvall G, Williams RC, Quie PG.** Antiphagocytic effects of staphylococcal protein A. *The Journal of Immunology* 1969, 103: 1405-1410.
- Doyle ME, Hartmann FA, Lee Wong AC.** Methicillin-resistant staphylococci: implications for our food supply? *Animal Health Research Reviews* 2012, 13(02): 157-180.
- Du Preez JH.** Teat canal infections. *Kiel Milchwirtsch Forschungsber* 1985, 37: 267-273.
- DuMont AL, Yoong P, Day CJ, Alonzo F, McDonald WH.** *Staphylococcus aureus* LukAB cytotoxin kills human neutrophils by targeting the CD11b subunit of the integrin Mac-1. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 2013, 110: 10794–10799.
- Dziewanowska K, Patti JM, Deobald CF, Bayles KW, Trumble WR, Bohach GA.** Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infection and Immunity* 1999, 67: 4673-4678.
- Elek SD, Levy E.** Distribution of haemolysis in pathogenic and non-pathogenic staphylococci. *The Journal of Pathology and Bacteriology* 1950, 62: 541-554.
- Elemo KK, Sisay T, Shiferaw A, Fato MA.** Prevalence, risk factors and multidrug resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in selected dairy farms in and around Asella town, Arsi Zone, South Eastern Ethiopia. *African Journal of Microbiology Research* 2017, 11(45): 1632-1642.
- Ertem GT, Öztürk B, Hatipoğlu ÇA, İpekkan K, Erdem F, Adilođlu AK, Tülek N.** Stafilokok ve Enterokok İzolatlarının Linezolid, Daptomisin, Teikoplanin ve Fusidik Aside In Vitro Duyarlılığı. *Journal of Medical Sciences* 2013, 33(6): 1381-1387.
- Farahmand-Azar S, Ahmadi M, Dastmalchi SH, Anassori E.** Identification of Toxic Shock Syndrome Toxin-1 (TSST-1) gene in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis milk. *Archives of Razi Institute* 2012, 68(1): 17-22.
- Feil EJ, Cooper JE, Grundmann H, Robinson DA, Enright MC, Berendt T, Peacock SJ, Smith JM, Murphy M, Spratt BG, Moore CE, Day NP.** How clonal is *Staphylococcus aureus*? *Journal of Bacteriology* 2003, 185: 3307-3316.

- Ferens WA, Davis WC, Hamilton MJ, Park YH, Deobald CF, Fox L, Bohach G.** Activation of bovine lymphocyte subpopulations by staphylococcal enterotoxin C. *Infection and Immunity* 1998, 66: 573-80.
- Ferens WA, Bohach GA.** Persistence of *Staphylococcus aureus* on mucosal membranes: superantigens and internalization by host cells. Review. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 2000, 135: 225-230.
- Fitzgerald JR, Musser JM.** Evolutionary genomics of pathogenic bacteria. *Trends in Microbiology* 2001, 9: 547-553.
- Fleischer B, Schrezenmeier H.** T cell stimulation by staphylococcal enterotoxins. Clonally variable response and requirement for major histocompatibility complex class II molecules on accessory or target cells. *The Journal of Experimental Medicine* 1988, 167(5): 1697-1707.
- Forbes D.** The pathogenesis of bovine mastitis. *The Veterinary Bulletin* 1969, 39: 529-541.
- Forsgren A, Ghetie V, Lindmark R, Sjoquist J.** Protein A and its exploitation. In: Easmon CSF, Adlam C (eds) *Staphylococci and staphylococcal infections*, vol 2: The organism in vivo and in vitro. London, *Academic Press* 1983, 429-480.
- Foster TJ, Höök M.** Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiology* 1998, 6: 484-488. Review.
- Fournier JM, Bouvet A, Boutonnier A.** Predominance of capsular polysaccharide type 5 among oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 1987a, 25: 1932-1933.
- Fournier JM, Hannon K, Moreau M, Karakawa WW, Van WF.** Isolation of type 5 capsular polysaccharide from *Staphylococcus aureus*. *Annales de Institut Pasteur Microbiologie* 1987b, 138: 561-567.
- Fournier B.** Global regulators of *Staphylococcus aureus* virulence genes. In: *Staphylococcus molecular genetics*. Lindsay, J. A. (ed), Caister *Academic Press* 2008, Norfolk, pp. 131-183.
- Frost AJ.** Selective adhesion of microorganisms to the ductular epithelium of the bovine mammary gland. *Infection and Immunity* 1975, 12: 1154-1156.
- Frost AJ, Wanasinghe DD, Woolcock JB.** Some factors affecting selective adherence of microorganisms in the bovine mammary gland. *Infection and Immunity* 1977, 15: 245-253.
- Garipçin M, Şeker E.** Nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in cattle and farm workers in Turkey. *Veterinarski Arhiv* 2015, 85(2): 117-129.
- Genç F, Kaya O.** Sublinik Mastitisli Sığırlardan *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* ve *Streptococcus dysgalactiae* Etkenlerinin İzolasyonu ve Antibiyotiklere Duyarlılıklarının Belirlenmesi. *Animal Health Production ana Hygiene* 2015, 4(2): 415-419.

Gogoi-Tiwari J, Williams V, Waryah CB, Eto KY, Tau M, Costantino P, Tiwari HK, Mukkur T. Comparative studies of the immunogenicity and protective potential of biofilm vs planktonic *Staphylococcus aureus* vaccine against bovine mastitis using non-invasive mouse mastitis as a model system. *Biofouling* 2015, 31(7): 543-554.

Goodyear CS, Silverman GJ. Staphylococcal toxin induced preferential and prolonged in vivo deletion of innate-like B lymphocytes. *Proceeding of the National Academy of Science* 2004, USA. 101: 11392-11397.

Goudswaard J, Van der Donk JA, Noordzij A, van Dam RH, Vaerman JP. Protein A reactivity of various mammalian immunoglobulins. *Scandinavian of Journal Immunology* 1978, 8: 21-28.

Gröhn Y, Wilson DJ, Gonzalez RN, Hertl JA, Schulte H, Bennett G, Schukken YH. Effect of pathogen-specific clinical mastitis on milk yield in dairy cows. *Journal of Dairy Sciences* 2004, 87: 3358-3374.

Grumann D, Nubel U, Broker BM. *Staphylococcus aureus* toxins—their functions and genetics. *Infection, Genetics and Evolution* 2014, 21: 583-592.

Gudding R, McDonald JS, Cheville NF. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* mastitis: bacteriologic, histologic, and ultrastructural pathologic findings. *American Journal of Veterinary Research* 1984, 45: 2525-2531.

Guinane CM. Evolutionary Genomics of *Staphylococcus aureus* Reveals Insights into the Origin and Molecular Basis of Ruminant Host Adaptation. *Genome Biology and Evolution* 2010, 2: 454–466.

Hamid S, Bhat MA, Mir IA, Taku A, Badroo GA, Nazki S, Malik A. Phenotypic and genotypic characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *Veterinary World* 2017, 10(3): 363-367.

Hayakawa Y, Hayashi M, Shimano T, Komae H, Takeuchi K, Endou M, Igarashi H, Hashimoto N, Takeuchi S. Production of exfoliative toxin A by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cow's milk and farm bulk milk. *The Journal of Veterinary Medical Science* 1998, 60(11): 1281-1283.

Hazari R, Hirpurkar SD, Sannat C, Rawat N, Kushwaha K. Antimicrobial drug resistance of *Staphylococcus aureus* from clinical bovine mastitis in Chhattisgarh state. *The Pharma Innovation Journal* 2018, 7(8): 600-603.

Heald CW. Morphometric study of experimentally induced *Staphylococcus bovis* mastitis in the cow. *American Journal of Veterinary Research* 1979, 40: 1294-1298.

- Heilmann C, Niemann S, Sinha B, Herrmann M, Kehrel BE, Peters G.** *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein (FnBP)-mediated adherence to platelets, and aggregation of platelets induced by FnBPA but not by FnBPB. *The Journal of Infectious Diseases* 2004, 190: 321-329.
- Hochkeppel HK, Braun DG, Vischer W.** Serotyping and electron microscopy studies of *Staphylococcus aureus* clinical isolates with monoclonal antibodies to capsular polysaccharide types 5 and 8. *Journal of Clinical Microbiology* 1987, 25: 526-530.
- Holden MTG, Lindsay JA.** Whole genomes: sequence, microarray and systems biology. In: *Staphylococcus* molecular genetics. Lindsay, J. A. (ed), *Caister Academic Press*, 2008, Norfolk, pp. 1-28.
- Holderbaum D, Hall GS, Ehrhart LA.** Collagen binding to *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity* 1986, 54: 359-364.
- Hoque MN, Das ZC, Rahman ANMA, Haider MG, Islam MA.** Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains in bovine mastitis milk in Bangladesh. *International Journal of Veterinary Science and Medicine* 2018, 6(1): 53-60.
- Horsburgh MJ.** The response of *Staphylococcus aureus* to environmental stimuli. *Staphylococcus* molecular genetics. Lindsay, J. A. (ed), *Caister Academic Press*, Norfolk, 2008, pp. 185-206.
- Jones GM, Pearson RE, Clabaugh GA, Heald CW.** Relationships between somatic cell counts and milk production. *Journal of Dairy Science* 1984, 67(8): 1823-1831.
- Jonsson P, Wadstrom T.** Cell surface hydrophobicity of *Staphylococcus aureus* measured by the salt agglutination test (SAT). *Current Microbiology* 1984, 10: 203-210.
- Jørgensen HJ, Mørk T, Rørvik LM.** The occurrence of *Staphylococcus aureus* on a farm with small-scale production of raw milk cheese. *Journal of Dairy Science* 2005a, 8: 3810-3817.
- Jørgensen HJ, Mørk T, Caugant DA, Kearns A, Rørvik LM.** Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from Norwegian bulk milk. *Applied and Environmental Microbiology* 2005b, 71: 8352-8361.
- Juhász-Kaszanyitzky É, Jánosi S, Somogyi P, Dán Á, van der Graaf-van Bloois L, van Duijkeren E, Wagenaar JA.** MRSA Transmission between cows and humans. *Emerging Infectious Diseases* 2007, 13: 630-632.
- Kamio Y, Rahman A, Nariva H, Ozawa T, Izaki K.** The two staphylococcal bi- component toxins, leukocidin and gamma-hemolysin, share one component in common. *FEBS Letters* 1993, 321: 15-18.

- Kaper JB, Hacker J.** Pathogenicity islands and other mobile virulence elements. *American Society for Microbiology* 1999, Press, Washington, D.C.
- Karakawa WW, Sutton A, Schneerson R, Karpas A, Vann WF.** Capsular antibodies induce type-specific phagocytosis of capsulated *Staphylococcus aureus* by human polymorphonuclear leukocytes. *Infection and Immunity* 1988, 56: 1090-1095.
- Kaynarca S, Türkyılmaz S.** Sığır mastitislerinden izole edilen stafilokoklarda metisilin direnci ve slaym pozitifliği. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2010, 16: 567-572.
- Kenny K, Reiser RF, Bastida-Corcuera FD, Norcross NL.** Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 1993, 31: 706-707.
- Kim CH, Khan M, Morin DE, Hurley WL, Tripathy D, Kehrli MJ, Oluoch AO, Kakoma I.** Optimization of the PCR for detection of *Staphylococcus aureus nuc* gene in bovine milk. *Journal of Dairy Sciences* 2001, 84(1): 74-83.
- Kingwill RG.** The NIRD-CVL mastitis control method. In: Mastitis control and herd management. Reading, *National Institute of Rural Development* 1981, 24.
- Kinsman O, Jonsson P, Haraldsson I, Lindberg M, Arbuthnott JP, Wadstrom T.** Decreased virulence of alpha haemolysin negative and coagulase negative mutants of *Staphylococcus aureus* in experimental mastitis in mice. *Zentralbl Bakteriologie Mikrobiologie Hygiene Supply* 1981, 10: 651-659.
- Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H.** Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clinical Microbiology Reviews* 1997, Jul 1997, 505-520, Vol 10, No. 3.
- Kot B, Szweda P, Frankowska-Maciejewska A, Piechota M, Wolska K.** Virulence gene profiles in *Staphylococcus aureus* isolated from cows with subclinical mastitis in eastern Poland. *Journal of Dairy Research* 2016, 83: 228-235.
- Kuroda M, Takahashi N, Ohta T, Sawano T, Uchiyama I, Inoue R, Baba T, Kaito C, Yuzawa H, Sekimizu K, Kobayashi I, Hirakawa H, Cui L, Kuhara S, Oguchi A, Goto S, Aoki K, Yabuzaki J, Nagai Y, Kanehisa M, Lian J, Yamashita A, Ito T, Oshima K, Kanamori M, Furuya K, Matsumaru H, Yoshino C, Maruyama A, Shiba T, Murakami H, Hattori M, Hosoyama A, Ogasawara N, Mizutani-Ui Y, Hayashi H, Hiramatsu K.** Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 2001, 357: 1225-1240.
- Kuusela P.** Fibronectin binds to *Staphylococcus aureus*. *Nature* 1978, 276: 718-720.

- Lachica RVF, Hoeprich PD, Riemann HP.** Tolerance of staphylococcal thermonuclease to stress. *Applied Microbiology* 1972, 23: 994-997.
- Ladhani S, Joannou CL, Lochrie DP, Evans RW, Poston SM.** Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. *Clinical Microbiology Reviews* 1999, 12: 224–242.
- Lammers A, Nuijten PJ, Smith HE.** The fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus* are required for adhesion to and invasion of bovine mammary gland cells. *FEMS Microbiology Letters* 1999, 180: 103-109.
- Larsen HD, Sloth KH, Elsberg C, Enevoldsen C, Pedersen LH, Eriksen NH, Aarestrup FM, Jensen NE.** The dynamics of *Staphylococcus aureus* intramammary infection in nine Danish dairy herds. *Veterinary Microbiology* 2000a, 71: 89-101.
- Larsen HD, Huda A, Eriksen NHR, Jensen NE.** Differences between Danish bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates in possession of superantigens. *Veterinary Microbiology* 2000b, 76: 153-162.
- Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AKM, Wertheim HFM, Sumpradit N, Vlieghe E, Hara GL, Gould IM, Goossens H, Greko C, So AD, Bigdeli M, Tomson G, Woodhouse W, Ombaka E, Peralta AQ, Qamar FN, Mir F, Kariuki S, Bhutta ZA, Coates A, Bergstrom R, Wright GD, Brown ED, Cars O.** Antibiotic resistance - the need for global solutions. *The Lancet Infectious Disease* 2013, 13: 1057-1098.
- Le Gall A, Plommet M.** Observations sur la croissance des staphylocoques et al rraction leucocytaire au cours des premikres heures de al mammite exphimentale de la brebis. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique* 1965, 5: 113-130.
- Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, Vandenesch F, Etienne J.** Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clinical Infectious Diseases* 1999, 29(5): 1128-1132.
- Lindahl M, Holmberg O, Jonsson P.** Adhesive proteins of haemagglutinating *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Journal of General Microbiology* 1990, 136: 935-939.
- Loeffler DA, Norcross NL.** Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of milk immunoglobulins to leukocidin toxin of *Staphylococcus aureus*. *American Journal of Veterinary Research* 1985, 46: 1728-1732.
- Loeffler DA, Schat KA, Norcross NL.** Use of ⁵¹Cr release to measure the cytotoxic effects of staphylococcal leukocidin and toxin neutralization on bovine leukocytes. *Journal of Clinical Microbiology* 1986, 23(3): 416-420.

- Loeffler DA, Norcross NL, Opdebeeck JP.** Determination by enzyme-linked immunosorbent assay of the optimal dose of staphylococcal leukocidin for systemic immunization of dairy cows. *American Journal of Veterinary Research* 1988, 49: 1452-1455.
- Lowy F.** *Staphylococcus aureus* infections. *The New England Journal of Medicine* 1998, 339: 520-532.
- Lowy FD.** Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Clinical Investigation* 2003, 111: 1265-1273.
- Macgovan A, Macnaughton E.** Antibiotic resistance. *Medicine* 2013, 41(11): 642-648.
- Mamo W, Rozgonyi F, Brown A, Hjerten S, Wadstrom T.** Cell surface hydrophobicity and charge of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. *Journal of Applied Bacteriology* 1987, 62: 241-249.
- Mamo W, Fröman G.** Adhesion of *Staphylococcus aureus* to bovine mammary epithelial cells induced by growth in milk whey. *Microbiology and Immunology* 1994, 38: 305-308.
- Marrack P, Kappler J.** The staphylococcal enterotoxins and their relative. *Science* 1990, 248: 705–711.
- Matos JS, White DG, Harmon RJ, Langlois BE.** Isolation of *Staphylococcus aureus* from sites other than the lactating mammary gland. *Journal of Dairy Science* 1991, 74: 1544-1549.
- Matozaki T, Nakanishi H, Takai Y.** Small G-protein networks: their crosstalk and signal cascades. *Cellular Signaling* 2000, 12: 515–524.
- Matsunaga T, Kamata S, Kakiuchi N, Uchida K.** Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. *The Journal of Veterinary Medical Science* 1993, 55: 297-300.
- Mccallum N, Berger-Bächi B, Senn MM.** Regulation of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology* 2010, 300: 118-129.
- McCarthy AJ, Lindsay J. A.** *Staphylococcus aureus* innate immune evasion is lineage-specific: a bioinformatics study. *Infection, Genetics and Evolution* 2013, 19: 7–14.
- McCormick J, Yarwood J, Schlievert PM.** Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annual Review of Microbiology* 2001, 55:77–104.10.1146/annurev.micro.55: 1-77.
- McDougall S, Agnew KE, Cursons R, Hou XX, Compton CRW.** Parenteral treatment of clinical mastitis with tylosin base or penethamate hydriodide in dairy cattle. *Journal of Dairy Sciences* 2007, 90(2): 779-789.

- McGuire TC, Musoke AJ, Kurtti T.** Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils and skin. *Immunology* 1979, 38: 249-256.
- Mehmeti I, Behluli B, Mestani M, Ademi A, Nes IF, Diep DB.** Antimicrobial resistance levels amongst staphylococci isolated from clinical cases of bovine mastitis in Kosovo. *The Journal of Infection in Developing Countries* 2016, 10(10): 1081-1087.
- Melish ME, Glasgow LA.** Staphylococcal scalded skin syndrome: the expanded clinical syndrome. *The Journal of Pediatrics* 1971, 78: 958–967.
- Melly MA, McGee ZA, Horn RG, Morris F, Glick AD.** An electron microscopic india ink technique for demonstrating capsules on microorganisms: studies with *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, and *Neisseria gonorrhoeae*. *The Journal of Infectious Diseases* 1979, 140: 605-609.
- Middleton J, Fox L, Gay J, Tyler J, Besser T.** Use of pulsed-field gel electrophoresis for detecting differences in *Staphylococcus aureus* strain populations between dairy herds with different cattle importation practices. *Epidemiology & Infection* 2002, 129: 387-395.
- Mpatswenumugabo JP, Bebora LC, Gitao GC, Mobegi VA, Iraguha B, Kamana O, Shumbusho B.** Prevalence of Subclinical Mastitis and Distribution of Pathogens in Dairy Farms of Rubavu and Nyabihu Districts, Rwanda. *Journal of Veterinary Medicine* 2017, Article ID 8456713, 8 pages.
- Mullarky IK, Su C, Frieze N, Park YH, Sordillo LM.** *Staphylococcus aureus* agr genotypes with enterotoxin production capabilities can resist neutrophil bactericidal activity. *Infection and Immunity* 2001, 69: 45-51.
- Munoz-Planillo R, Franchi L, Miller LS, Núñez G.** A critical role for hemolysins and bacterial lipoproteins in *Staphylococcus aureus*-induced activation of the Nlrp3 inflammasome. *The Journal of Immunology* 2009, 183: 3942–3948.
- Myllys V, Honkanen-Buzalski T, Huovinen P, Sandholm M, Nurmi E.** Association of changes in the bacterial ecology of bovine mastitis with changes in the use of milking machines and antibacterial drugs. *Acta Veterinaria Scandinavia* 1994a, 35: 363-369.
- Myllys V, Honkanen-Buzalski T, Virtanen H, Pyörälä S, Müller HP.** Effect of abrasion of teat orifice epithelium on development of bovine staphylococcal mastitis. *Journal of Dairy Science* 1994b, 77: 446-452.
- National Committee for Clinical Laboratory Standard.** Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests (M2-A7 and M7-A5) (6th ed., Vol. 21, No. 1). 11th informational supplement 2001 (M100-S11), 1997.

- Neave FK.** The control of mastitis by hygiene. In *The Control of Bovine Mastitis* (ed. by F.H. Dodd & E.R. Jackson) *British Cattle Veterinary Association* 1971, p. 55.
- Nickerson SC, Heald CW.** Histopathologic response of the bovine mammary gland to experimentally induced *Staphylococcus aureus* infection. *American Journal of Veterinary Research* 1981, 42: 1351-1355.
- Nilsson IM, Hartford O, Foster T, Tarkowski A.** Alpha-toxin and gamma-toxin jointly promote *Staphylococcus aureus* virulence in murine septic arthritis. *Infection and Immunity* 1999, 67: 1045-1049.
- Novick RP, Schlievert P, Ruzin A.** Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. *Microbes and Infection* 2001, 3: 585–594.
- Olde Riekerink RGM, Barkema HW, Veenstra S, Poole DE, Dingwell RT, Keefe GP.** Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Prince Edward Island. *Canadian Veterinary Journal* 2006, 47: 567–572.
- O'Neill E, Pozzi C, Houston P, Humphreys H, Robinson DA, Loughman A, Foster TJ, O'Gara JP.** A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. *Journal of Bacteriology* 2008, 190(11): 3835-3850 doi: 10.1128/JB.00167-08.
- Opdebeeck JP, Frost AJ, O'Boyle D.** Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to bovine udder epithelial cells. *Veterinary Microbiology* 1988, 16: 77-86.
- Otto M.** *Staphylococcus aureus* toxins. *Current Opinion in Microbiology* 2014, 17: 32–37.
- Owens WE, Nickerson SC, Washburn PJ, Ray CH.** Efficacy of a cephalosporin dry cow product for treatment of experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis in heifers. *Journal of Dairy Science* 1991, 74(10): 3376-3382.
- Paape MJ, Wergin WP.** The leukocyte as a defense mechanism. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1977, 170: 1214-1223.
- Paape MJ, Wergin WP, Guidry AJ, Pearson RE.** Leukocytes-second line of defense against invading mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science* 1979, 62: 135-153.
- Padmaja RJ, Halami PM.** Molecular Characterization and Toxicity Confirmation of *LukM/F'-PV* Producing *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis Samples in Mysore, India. *Indian Journal of Microbiology* 2013, 53: 276–282.
- Paphitou NI.** Antimicrobial resistance: action to combat the rising microbial challenges. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2013, 42: 25-28.
- Paterson GK, Harrison EM, Holmes MA.** The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology* 2014, 22(1): 42-47.

- Patti JM, Allen BL, McGavin M, Höök M.** MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annual Review of Microbiology* 1994, 48: 585.
- Peterson PK, Verhoef J, Sabath LD, Quie PG.** The effect of protein A on staphylococcal opsonization. *Infection and Immunity* 1977, 15: 760-764.
- Peterson PK, Wilkinson BJ, Kim Y.** The key role of peptidoglycan in the opsonization of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Clinical Investigation* 1978, 61: 597-609.
- Phonimdaeng P, O'Reilly M, Nowlan P, Bramley AJ, Foster TJ.** The coagulase of *Staphylococcus aureus* 8325-4. Sequence analysis and virulence of site-specific coagulase-deficient mutants. *Molecular Microbiology* 1990, 4: 393-404.
- Piccinini R, Binda E, Zecconi A, Zanini L.** Prevalence study on bulk tank milk cultures in 1000 dairy herds in Lombardia (Italy). 42nd Annual Meeting National Mastitis Council, Fort Worth, 2003, pp. 396-397.
- Plommet M, Le Gall A.** Mammite staphylococcique de la brebis. 111. Recherches sur l'immunité antitoxique et antimicrobienne. *Annales de l'Institut Pasteur* 1963, 104: 779-796.
- Postle DS, Roguinsky M, Poutrel B.** Incuded staphylococcal infections in the bovine mammary gland. *American Journal of Veterinary Research* 1978, 39: 29-35.
- Poutrel B, Ducelliez M.** Evaluation of three rapid tests for identification of *Staphylococcus aureus* isolated in bovine milk. *Annales de Recherches Veterinaires* 1979, 10: 125-129.
- Poutrel B, Caffin JP.** A sensitive microassay for the determination of hemolytic complement activity in bovine milk. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1983, 5: 177-184.
- Prasad LBM, Newbould FHS.** Initial response of the bovine mammary gland to invasion by *Staphylococcus aureus*. *Canadian Veterinary Journal* 1968, 9: 170-177.
- Prevost G, Rifai S, Chaix L, Piemont Y.** Functional evidence that Ser-195 residue of staphylococcal exfoliative toxin is essential for biological activity. *Infection and Immunity* 1991, 59: 3337-3339.
- Prevost G, Cribier B, Couppie P, Petiau P, Supersac G, Finck-Barbancon V, Monteil H, Piemont Y.** Panton-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infection and Immunity* 1995, 63: 4121-4129.
- Proctor R.A.** The staphylococcal fibronectin receptor: evidence for its importance in invasive infections. *Reviews of Infectious Diseases* 1987, 9 Suppl 4: 335-340.
- Projan SJ, Novick RP.** The molecular basis of pathogenesis. In: The staphylococci in human disease. Crossley, K. B. and G. L. Archer (Eds.). Churchill Livingstone, N. Y. 1997, pp. 55-82.

- Rabello RF, Moreira BM, Lopes RMM, Teixeira LM, Riley LW, Castro ACD.** Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from cows with mastitis in Brazilian dairy herds. *Journal of Medical Microbiology* 2007, 56: 1505-1511.
- Rainard P.** The complement in milk and defense of the bovine mammary gland against infections. *Veterinary Research* 2003, 34: 647-670. Review.
- Rainard P, Riollet C.** Mobilization of neutrophils and defense of the bovine mammary gland. *Reproduction Nutrition Development* 2003, 43: 439-457. Review.
- Rather PN, Davis AP, Wilkinson BJ.** Slime production by bovine milk *Staphylococcus aureus* and identification of coagulase-negative staphylococcal isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 1986, 23: 858-862.
- Redpath MB, Foster TJ, Bailey CJ.** The role of serine protease active site in the mode of action of epidermolytic toxin of *S. aureus*. *FEMS Microbiology Letters* 1991, 81: 151–156.
- Reksen O, Sølverød L, Branscum AJ, Østerås O.** Relationships between milk culture results and treatment for clinical mastitis or culling in Norwegian dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 2006, 89: 2928-2937.
- Reyes-Robles T, Alonzo F, Kozhaya L, Borden D, Unutmaz D.** *Staphylococcus aureus* Leukotoxin ED targets the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 to Kill leukocytes and promote infection. *Cell Host Microbe* 2013, 14: 453–459.
- Rigby KM, De Leo FR.** Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections. *Seminars in Immunopathology* 2012, 34: 237–259.
- Roberson JR, Fox KL, Hancock DD, Gay JM, Besser TE.** Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites of dairy farms. *Journal of Dairy Science* 1994, 77: 3354-3364.
- Rosaria IS, Pablo MZ, Andres DG, Adolfo L, Dario JH.** Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical and clinical mastitis in Uruguay during an eight-years period. *Austral Journal of Veterinary Sciences* 2017, 49: 191-194.
- Sağlam AG, Şahin M, Çelik E, Çelebi Ö, Akça D, Otlu S.** The role of staphylococci in subclinical mastitis of cows and lytic phage isolation against to *Staphylococcus aureus*. *Veterinary World* 2017, 10(12): 1481-1485.
- Salasia SI, Kushnan Z, Lämmler C, Zschöck M.** Comparative studies on pheno- and genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in central Java in Indonesia and Hesse in Germany. *Journal of Veterinary Science* 2004, 5: 103-109.

- Sambrook J, Fritsch EF, Shuman HA.** Molecular Cloning: a Laboratory Manual (2nd ed), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 1989, s: 3520.
- Sancak B.** *Staphylococcus aureus* ve antibiyotik direnci. *Mikrobiyoloji Bülteni* 2011, 45 (3): 565-576.
- Sandholm M, Kaartinen L, Hyvönen P, Veijalainen K, Kuosa PL.** Flotation of mastitis pathogens with cream from subclinically infected quarters. Prospects for developing a cream-rising test for detecting mastitis caused by major mastitis pathogens. *Zentralbl. Veterinarmed. [B]* 1989, 36: 27-34.
- Sasidharan S, Prema, B, Yoga LL.** Antimicrobial drug resistance of *Staphylococcus aureus* in dairy products. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2011, 130-132.
- Schalm OW, Lasmanis J, Jain NC.** Conversion of chronic staphylococcal mastitis to acute gangrenous mastitis after neutropenia in blood and bone marrow produced by an equine anti-bovine leukocyte serum. *American Journal of Veterinary Research* 1976, 37: 885-890.
- Schito GC.** The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection* 2006, 12(1): 3-8.
- Schlievert PM.** Enhancement of host susceptibility to lethal endotoxin shock by staphylococcal pyrogenic exotoxin type C. *Infection and Immunity* 1982, 36: 123-128.
- Schlotter K, Ehricht R, Hotzel H, Monecke S, Pfeffer M, Donat K.** Leukocidin genes *lukF-P83* and *lukM* are associated with *Staphylococcus aureus* clonal complexes 151, 479 and 133 isolated from bovine udder infections in Thuringia, Germany. *Veterinary Research* 2012, 43: 42.
- Schukken YH, Leslie KE, Barnum DA, Mallard BA, Lumsden JH, Dick PC, Vessie GH, Kehrlı ME.** Experimental *Staphylococcus aureus* intramammary challenge in late lactation dairy cows: quarter and cow effects determining the probability of infection. *Journal of Dairy Science* 1999, 82: 2393-2401.
- Schukken YH, Gonzalez RN, Tikofsky LL, Schulte HF, Santisteban CG, Welcome FL, Bennett GJ, Zurakowski MJ, Zadoks RN.** CNS mastitis: Nothing to worry about? *Veterinary Microbiology* 2009, 134(1-2): 9-14.
- Seier-Petersen MA, Nielsen LN, Ingmer H, Aarestrup FM, Agersø Y.** Biocide Susceptibility of *Staphylococcus aureus* CC398 and CC30 Isolates from Pigs and Identification of the Biocide Resistance Genes, *qacG* and *qacC*. *Microbial Drug Resistance* 2015, 21(5): 527-536.

- Sevinti DA, Şahin M.** Determination of beta-lactic activity and susceptibility of against some antibiotics staphylococci strains isolated from bovine mastitis. *Veteriner Bilimleri Dergisi* 2009, 25(1-2): 23-28.
- Sharma I, Brinty A.** Isolation and Identification of Staphylococcus Aureus from Bovine Mastitis Milk and Their Drug Resistance Patterns in Silchar Town Dairy Farms, N.E India. *Online International Interdisciplinary Research Journal*, 2014 Vol. IV.
- Singh G, Marples RR, Klingman AM.** Experimental *Staphylococcus aureus* infections in humans. *Journal of Investigative Dermatology* 1971, 57: 149-162.
- Sinha B, Francois PP, Nusse O, Foti M, Hartford OM, Vaudaux P, Foster TJ, Lew DP, Herrmann M, Krause KH.** Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasins via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1. *Cellular Microbiology* 1999, 1: 101-117.
- Smith MR, Yoshida K, Naito Y.** Use of the clumping factor reaction for the identification of encapsulated strains of *Staphylococcus aureus* from human sources. *Infection and Immunity* 1971, 3: 707-708.
- Smith H.** Microbial surfaces in relation to pathogenicity. *Bacteriological Reviews* 1977, 41: 475-500.
- Smith TL, Jarvis WR.** Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. *Microbes and Infection* 1999, 1 (10): 795-805.
- Smith EM, Green LE, Medley GF, Bird HE, Fox LK, Schukken YH, Kruze JV, Bradley AJ, Zadoks RN, Dowson CG.** Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 2005, 43: 4737-4743.
- Sompolinsky D, Samra Z, Karakawa WW, Vann WF, Schneerson R, Malik Z.** Encapsulation and capsular types in isolates of *Staphylococcus aureus* from different sources and relationship to phage types. *Journal of Clinical Microbiology* 1985, 22: 828-834.
- Sordillo LM, Doymaz MZ, Oliver SP.** Morphological study of chronic *Staphylococcus aureus* mastitis in the lactating bovine mammary gland. *Research in Veterinary Science* 1989, 47: 247-252.
- Spaan AN, Henry T, van Rooijen WJM, Perret M, Badiou C, Aerts PC, Kemmink J, de Haas CJC, van Kessel KPM, Vandenesch F, Lina G, van Strijp JAG.** The staphylococcal toxin panton-valentine leukocidin targets human C5a receptors. *Cell Host Microbe* 2013, 13: 584-594.

- Spaan AN, Vrielling M, Wallet P.** The staphylococcal toxins γ -haemolysin AB and CB differentially target phagocytes by employing specific chemokine receptors. *Nature Communications* 2014, 5: 5438.
- Srinivasan V, Gillespie BE, Lewis MJ, Nguyen LT, Headrick SI, Schukken YH, Oliver SP.** Prevalence of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows with mastitis. *Foodborne Pathogens and Diseases* 2006, 3: 274-283.
- Stein MA, Leung KY, Zwick M, Portillo FG, Finlay BB.** Identification of a *Salmonella* virulence gene required for formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins within epithelial cells. *Molecular Microbiology* 1996, 20: 151–164.
- Stryjewski ME, Corey GR.** New treatments for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Current Opinion in Critical Care* 2009, 15(5): 403-412.
- Suleiman TS, Karimuribo ED, Mdegela RH.** Prevalence of bovine subclinical mastitis and antibiotic susceptibility patterns of major mastitis pathogens isolated in Unguja island of Zanzibar, Tanzania. *Tropical Animal Health and Production* 2018, 50(2): 259-266.
- Supersac G, Prevost G, Piemont Y.** Sequencing of leucocidin R from *Staphylococcus aureus* P83 suggests that staphylococcal leucocidins and gamma-hemolysin are members of a single, two-component family of toxins. *Infection and Immunity* 1993, 61: 580-587.
- Sutra L, Poutrel B.** Detection of capsular polysaccharide in milk of cows with natural intramammary infection caused by *Staphylococcus aureus*. *American Journal of Veterinary Research* 1990, 51: 1857-1859.
- Sutra L, Poutrel B.** Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology* 1994, 40: 79-89. Review.
- Swinkels JM, Hogeveen H, Zadoks RN.** A partial budget model to estimate economic benefits of lactational treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science* 2005, 88: 4273-4287.
- Şeker E, Garipçin M.** İnsanlarda ve Hayvanlarda Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) İnfeksiyonları. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi Türkiye* 2013, 11(1): 44-60.
- Takeuchi S, Ishiguro K, Ikegami M, Kaidoh T, Hayakawa Y.** Production of toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cow's milk and farm bulk milk. *Veterinary Microbiology* 1998, 59: 251–258.
- Tassew A, Negash M, Demeke A, Feleke A, Tesfaye B, Sisay T.** Isolation, identification and drug resistance patterns of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from mastitic cow's

milk from selected dairy farms in and around Kombolcha, Ethiopia. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health* 2016, 8(1): 1-10.

Tel OY, Keskin O, Zonturlu AK, Kaya ANB. Şanlıurfa Yöresinde Subklinik Mastitislerin Görülme Oranı, Aerobik Bakteri İzolasyonu ve Duyarlı Antibiyotiklerin Belirlenmesi. *Firat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2009, 23(2): 101-106.

Tenhagen BA, Köster G, Wallmann J, Heuwieser W. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *Journal of Dairy Science* 2006, 89: 2542-2551.

Tenhagen BA, Hansen I, Reinecke A, Heuwieser W. Prevalence of pathogens in milk samples of dairy cows with clinical mastitis and in heifers at first parturition. *Journal of Dairy Research* 2009, 76(2): 179-187.

Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Infection Control* 2006, 34(5): 3-10.

Theuretzbacher U. Global antibacterial resistance: The never-ending story. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 2013, 1: 63-69.

Tokaijan S, Haddad D, Andraos R, Hashwa F, Araj G. Toxins and Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolated from a Major Hospital in Lebanon. *International Scholarly Research Network* 2011.

Tollersrud T, Kenny K, Caugant DA, Lund A. Characterization of isolates of *Staphylococcus aureus* from acute, chronic and subclinical mastitis in cows in Norway. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 2000, 108: 565-572.

Trinidad P, Nickerson SC, Adkinson RW. Histopathology of staphylococcal mastitis in unbred dairy heifers. *Journal of Dairy Science* 1990a, 73(3): 639-647.

Trinidad P, Nickerson SC, Alley TK. Prevalence of intramammary infection and teat canal colonization in unbred and primigravid dairy heifers. *Journal of Dairy Science* 1990b, 73(1): 107-114.

Tucker PW, Hazen EE, Cotton FA. Staphylococcal nuclease reviewed: a prototypic study in contemporary enzymology. I. Isolation, physical and enzymatic properties. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1978, 22: 67-77.

van Leeuwen W, Melles DC, Alaidan A, Al-Ahdal M, Boelens HAM, Snijders SV, Wertheim H, van Duijkeren E, Peeters JK, van der Spek PJ, Gorkink R, Simons G, Verbrugh HA, van Belkum A. Host and tissue-specific pathogenic traits of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 2005, 187: 4584-4591.

- van Wely KH, Swaving J, Freudl R, Driessen AJ.** Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 2001, 25: 437-454.
- Vann WF, Moreau M, Sutton R, Byrd RA, Karakawa WW.** Structure and immunochemistry of *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide. *UCLA Symposia on Molecular & Cellular Biology New Book Series* 1988, 64: 187-198.
- Vath GM, Earhart CA, Rago JV, Kim MH, Bohach GA, Schlievert PM, Ohlendorf DH.** The structure of the superantigen exfoliative toxin A suggests a novel regulation as a serine protease. *Biochemistry* 1997, 36: 1559–1566.
- Vath GM, Earhart CA, Monie DD, Iandolo JJ, Schlievert PM, Ohlendorf DH.** The crystal structure of exfoliative toxin B: a superantigen with enzymatic activity. *Biochemistry* 1999, 38: 10239–10246.
- Wanasinghe DD.** Adherence as a prerequisite for infection of the bovine mammary gland by bacteria. *Acta Veterinaria Scandinavica* 1981a, 22: 109-117.
- Wanasinghe DD.** In vitro adherence of *Staphylococcus aureus* to bovine mammary gland epithelial cells. *Acta Veterinaria Scandinavica* 1981b, 22: 99-108.
- Wang X, Wang X, Wang Y, Guo G, Usman T, Hao D, Tang X, Zhang Y, Yu Y.** Antimicrobial resistance and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* strains from Holstein milk. *Letters in Applied Microbiology* 2014, 58(6): 527-534.
- Wang W, Lin X, Jiang T, Peng Z, Xu J, Yi L, Li F, Fanning S, Baloch Z.** Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus* Cultured From Raw Milk Taken From Dairy Cows With Mastitis in Beijing, China. *Frontiers in Microbiology* 2018, 9: 1123.
- Watson DL.** Virulence of *Staphylococcus aureus* grown in vitro or in vivo. *Research in Veterinary Science* 1982, 32: 311-315.
- Watson DL, Watson NA.** Expression of pseudocapsule by *Staphylococcus aureus*: influence of culture medium and relevance to mastitis. *Research in Veterinary Science* 1989, 47: 152-157.
- Wendlandt S, Feßler AT, Monecke S, Ehricht R, Schwarz S, Kadlec K.** The diversity of antimicrobial resistance genes among staphylococci of animal origin. *International Journal of Medical Microbiology* 2013, 303(6): 338-349.
- Wilkinson BJ, Kim Y, Peterson PK, Quie PG, Michael AF.** Activation of complement by cell surface components of *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity* 1978, 20: 388-392.

- Wilkinson BJ.** Staphylococcal capsules and slime. In: Easmon CSF, Adlam C (eds) *Staphylococci and staphylococcal infections*, vol 2: The organism in vivo and in vitro. London, *Academic Press* 1983, 48: 1-523.
- Williams RE.** Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. *Bacteriological Reviews* 1963, 27(1): 2756-2771.
- Williams DM, Mein GA.** The role of machine milking in the invasion of mastitis organisms and implications for maintaining low infection rates. *Kiel Milchwirtsch Forschungsber* 1985, 37: 415-425.
- Wilson DJ, Gonzales RN, Sears PM.** Segregation or use of separate milking units for cows infected with *Staphylococcus aureus*: effects on prevalence of infection and bulk tank somatic cell count. *Journal of Dairy Science* 1995, 78: 2083-2085.
- Wirtu A, Abunna F, Duguma A.** Isolation and Identification of *Staphylococcus aureus* from Dairy Farms in Bishoftu Town, Ethiopia. *Juniper Online Journal of Public Health*, 2018 3(1).
- Woodin AM.** Staphylococcal leucocidin. In: Cohen JO (ed) *The staphylococci*. New York, *Wiley Intersciences* 1972, p. 281-299.
- Xie Y, He Y, Gehring A, Hu Y, Li Q, Tu SI, Shi X.** Genotypes and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* clinical isolates from China. *Public Library of Science One* 2011, 6(12): e28276.
- Yang F, Wang Q, Wang X, Wang L, Li X, Luo J, Zhang S, Li H.** Genetic characterization of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis cases in Northwest China. *Journal of Integrative Agriculture* 2016, 15(12): 2842-2847.
- Yamada T, Tochimaru N, Nakasuji S, Hata E, Kobayashi H, Eguchi M, Kaneko J, Kaidoh T, Takeuchi S.** Leukotoxin family genes in *Staphylococcus aureus* isolated from domestic animals and prevalence of *lukM-lukF-PV* genes by bacteriophages in bovine isolates. *Veterinary Microbiology* 2005, 110: 97–103.
- Yamaguchi T, Hayashi T, Takami H, Nakasone K, Ohnishi M, Nakayama K, Yamada S, Komatsuzawa H, Sugai M.** Phage conversion of exfoliative toxin A production in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology* 2000, 38: 694–705.
- Yamaguchi T, Hayashi T, Takami H, Ohnishi M, Murata T, Nakayama K, Asakawa K, Ohara M, Komatsuzawa H, Sugai M.** Complete nucleotide sequence of a *Staphylococcus aureus* exfoliative toxin B plasmid and identification of a novel ADP-ribosyltransferase, EDIN-C. *Infection and Immunity* 2001, 69: 7760–7771.
- Yamaguchi T, Nishifuji K, Sasaki M, Fudaba Y, Aepfelbacher M, Takata T, Ohara M, Komatsuzawa H, Amagai M, Sugai M.** Identification of the *Staphylococcus aureus* *etd*

pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. *Infection and Immunity* 2002, 70(10): 5835-5845.

Yamashita D, Sugawara T, Takeshita M, Kaneko J, Kamio Y, Tanaka I, Tanaka Y, Yao M. Molecular basis of transmembrane beta-barrel formation of staphylococcal pore-forming toxins. *Nature Communications* 2014, 5: 4897.

Yoshida K, Ekstedt RD. Relation of mucoid growth of *Staphylococcus aureus* to clumping factor reaction, morphology in serum-soft agar, and virulence. *Journal of Bacteriology* 1968, 96: 902-908.

Yoshida K, Smith MR, Naito Y. Biological and immunological properties of encapsulated strains of *Staphylococcus aureus* from human sources. *Infection and Immunity* 1970, 2: 528-532.

Zadoks R, van Leeuwen W, Barkema H, Sampimon O, Verbrugh H, Schukken YH, van Belkum A. Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 2000, 38: 1931-1939.

Zadoks RN, Allore HG, Barkema HW, Sampimon OC, Wellenberg GJ, Gröhn YT, Schukken YH. Cow and quarter level risk factors for *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science* 2001, 84: 2649–2663.

Zadoks RN, van Leeuwen WB, Kreft D, Fox LK, Barkema HW, Schukken YH, van Belkum A. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking-equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and binary typing. *Journal of Clinical Microbiology* 2002, 40: 3894-3902.

Zschöck M, Botzler D, BloKcher S, SommerhaKuser J, Hamann HP. Detection of genes for enterotoxins (*ent*) and toxic shock syndrome toxin-1 (*tst*) in mammary isolates of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *International Dairy Journal* 2000, 10: 569–574.

Zschöck M, Risse K, Sommerhäuser J. Occurrence and clonal relatedness of *sec/tst*-gene positive *Staphylococcus aureus* isolates. *Letters in Applied Microbiology* 2004, 38(6): 493-498.

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : SUR, Erdem
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : Denizli-1993
Telefon : 05549513551
E-mail : erdm.sur@hotmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Y. Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ABD	Devam
Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2016

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
-----	-----------	-------

AKADEMİK YAYINLAR

1. Proje

Sur E, Türkyılmaz S. Subklinik Mastitisli İnek Sütlerinden Elde Edilen *Staphylococcus aureus* İzolatlarında Bazı Toksin Genlerinin ve Antibiyotik Dirençliliğinin İncelenmesi. ADÜ, BAP VTF-18001.

2. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan bildiriler

1. Yılmaz Ö, **Sur E,** Türkyılmaz S. Broylerlerden izole edilen *Salmonella* spp.'nin antimikrobiyal direnç profilleri. I. International Health Science And Life Congress. Burdur, Türkiye. May 02-05, 2018. S: 268.