

**SIĞIR MASTİTİSLERİNDEN İZOLE EDİLEN  
STAFİLOKOKLARDA METİSİLİN DİRENCİ VE  
PANTON-VALENTINE LÖKOSİDİN VARLIĞININ  
ARAŞTIRILMASI**

**Veteriner Hekim Cansu GEZGEN  
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
DANIŞMAN  
Doç. Dr. Esra ŞEKER  
Tez no: 2015-027  
2015-AFYONKARAHİSAR**

T.C.  
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIĞIR MASTİTİSLERİNDEN İZOLE EDİLEN  
STAFİLOKOKLARDA METİSİLİN DİRENCİ VE  
PANTON-VALENTINE LÖKOSİDİN VARLIĞININ  
ARAŞTIRILMASI**

**Veteriner Hekim Cansu GEZGEN**

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Esra ŞEKER**

**Bu tez, Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon  
Birimi tarafından 14.SAĞ.BİL.03 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**Tez No: 2015-027**

**2015 - AFYONKARAHİSAR**

**KABUL ve ONAY**

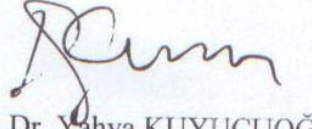
Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**Mikrobiyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı**

çerçevesinde yürütülmüş bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından

**Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 15 / 12 / 2015



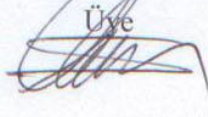
Prof. Dr. Yahya KUYUCUOĞLU

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Jüri Başkanı

Doç. Dr. Esra ŞEKER

Afyon Kocatepe Üniversitesi



Üye

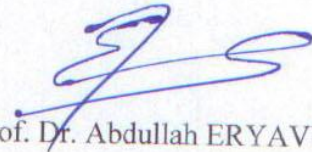
Doç. Dr. Ferdağ ÇOLAK

Dumlupınar Üniversitesi



Üye

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programı öğrencisi Cansu GEZGEN'in "Sığır Mastitislerinden İzole Edilen Stafilokoklarda Metisilin Direnci ve Panton-Valentine Lökosidin Varlığının Araştırılması" başlıklı tezi..24.12.2015...günü saat..16.00.'da Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Abdullah ERYAVUZ

Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

Meme dokusundaki patolojik değişiklikler ve sütteki somatik hücre sayısındaki artış ile karakterize, meme bezlerinin infeksiyonu olarak tanımlanan mastitis, fizyolojik ve metabolik değişiklikler, travmalar ve mikroorganizmalar gibi her türlü irritan etkiye karşı meme dokusunun oluşturduğu yangısal bir cevaptır. Hastalık, sürekli yapılan araştırmalar ve geliştirilen kontrol metotlarına rağmen; tüm dünyada modern işletmeler de dahil olmak üzere tüm işletmelerde görülebilen, süt yönlü yetiştiriciliğin en önemli problemi olmaya devam etmekte, ekonomik kayba neden olan sorunların da başında gelmektedir. Stafilocok türleri gerek ülkemizde, gerekse dünyada sığır mastitislerinden en sık izole edilen türler olarak bilinmektedir. Mastitislerinin sağaltımında çeşitli antibiyotik ya da antibiyotik kombinasyonları terapötik veya proflaktik amaçla yaygın olarak kullanılmakta ve mastitisin kontrolünde önem taşımaktadır. Ancak, tedavi amaçlı kullanılan bu ilaçlara karşı gelişen dirençlilik, hastalık etkenleri ile mücadeleyi güçleştiren, sağaltımdaki başarıyı azaltan, tedavi etkinliklerini sınırlayan ve giderek yaygınlaşan önemli bir problem haline dönüşmüştür. Sunulan çalışmanın temel amacı, sığır mastitislerinin Stafilocok türlerine bağlı etiyojilerinin belirlenmesi, izole edilen suşlarda metisilin dirençliliğinin ve önemli virulens faktörlerinden PVL toksin varlığının genotipik düzeyde araştırılmasıdır. Araştırmanın örneklemenin yapıldığı İzmir ili Ödemiş ilçesi bölge hayvanlarında mastitis etkeni patojen Stafilocok türlerinde bu genlerin araştırılacağı ilk çalışma olması ayrıca önem taşımaktadır. Bu anlamda, çalışmamın bölge hayvancılığına da faydası olacağı düşünülmektedir.

Sığır mastitislerinden izole edilen Stafilocoklarda metisilin direnci ve Panton-Valentine lökosidin varlığının araştırılması konulu yüksek lisans tez çalışmamda, değerli destekleriyle her zaman yanımda olan danışmanım Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Esra ŞEKER başta olmak üzere, bu güne gelmemde katkıda bulunarak, yüksek lisans eğitimimde değerli bilgilerini benimle paylaşan Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Yahya KUYUCUOĞLU'na ve Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Beytullah KENAR'a teşekkür ederim. Ayrıca PZR çalışmaları sırasında yardımcı olan Veteriner Hekim Müesser YILMAZ'a teşekkür ederim. Son olarak; daima yanımda olan ve beni hep destekleyen yol arkadaşım, meslektaşım Caner GEZGEN'e teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

Kabul ve Onay	
Önsöz .....	i
İçindekiler .....	ii
Simgeler ve Kısaltmalar .....	iv
Şekiller .....	vi
Tablolar .....	vii
<b>1.GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Staphylococcus</i> Türleri .....	4
1.2. <i>Staphylococcus</i> Mastitisleri .....	18
1.3. Stafilokoklarda Metisilin Direnci .....	20
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>26</b>
2.1. Gereç .....	26
2.1.1. Hayvanların Seçimi ve Süt Örneklerinin Toplanması .....	26
2.1.2. Standart Suşlar .....	26
2.1.3. Besiyerleri, Solüsyonlar, Çözeltiler, İdentifikasyon Kitleri ve Antibiyotik Diskleri .....	27
2.1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda (PZR) Kullanılan Buffer, Solüsyon, Ekipman ve Cihazlar .....	28
2.2. Yöntem .....	28
2.2.1. Örneklerden <i>Staphylococcus</i> Türlerinin İzolasyon ve İdentifikasyonu .....	28
2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	29
2.2.2.1. DNA Ekstraksiyonu.....	29
2.2.2.2. Amplifikasyon Koşulları.....	30
2.2.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri .....	32
<b>3. BULGULAR.....</b>	<b>33</b>
3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları.....	33
3.2. PZR Bulguları.....	35

3.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri.....	36
<b>4. TARTIŞMA.....</b>	<b>38</b>
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>46</b>
<b>ÖZET.....</b>	<b>48</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>49</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>50</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>60</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

ATCC	American Type Culture Collection
$\beta$	Beta
bç	Baz çifti
BORSA	Borderline resistant <i>S. aureus</i>
cAMP	Siklik Adenozinmonofosfat
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMT	California Mastitis Testi
DNA	Deoksiribonükleik asit
Fc	Kristalize fragment
FTS	Fizyolojik tuzlu su
g	Gram
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
HK-MRSA	Hastane kaynaklı Methicillin-Resistant <i>S. aureus</i>
IL-1	İnterlökin-1
KNS	Koagülaz Negatif Stafilokok
KPS	Koagülaz Pozitif Stafilokok
$\mu$ g	Mikrogram
$\mu$ l	Mikrolitre
ml	Mililitre
MHA	Mueller Hinton Agar
MRS	Metisilin Dirençli Stafilokok
MRSA	Methicillin Dirençli <i>S. aureus</i>
MSS	Metisiline Duyarlı Stafilokok
MSSA	Metisiline Duyarlı <i>S. aureus</i>
NaCl	Sodyum klorür
NAGA	N-asetilglukozamin
NAMA	N-asetilmuramikasit
NB	Nutrient Broth
O/F	Oksidasyon/ Fermentasyon
PBP	Penisilin Bağlayan Protein
PVL	Panton-Valentine Lökosidini
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit

SCC	Stafilokokal Kromozom Kaseti
SE-like, SEI	Stafilokokal enterotoksin benzeri toksinler
SEs	Stafilokokal enterotoksinler
SHS	Somatik Hücre Sayısı
TK-MRSA	Toplum Kaynaklı-Methicillin Resistant <i>S. aureus</i>
TSA	Trypticase Soy Agar
TSB	Trypticase Soy Broth
TSST-1	Toksin Şok Sendrom Toksini-1
VP	Voges Prouskauer



## ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 3.1. 16S rDNA ve <i>mecA</i> genlerine ait PZR bulguları.....	35
Şekil 3.2. <i>pvl</i> toksin geni pozitif kontrol suşuna ait PZR bulguları.....	36

## TABLULAR

Sayfa

Tablo 1.1. Gram pozitif kokların ayırt edilmesinde kullanılan başlıca özellikler.....	7
Tablo 1.2. Hayvanlardan izole edilen Stafilokokların ayırımında kullanılan biyokimyasal reaksiyonlar ve özellikler.....	8
Tablo 1.3. Patojen Stafilokok türlerinin neden olduğu hastalıklar.....	9
Tablo 1.4. Hayvanlardan izole edilen bazı KNS türleri ve kaynakları.....	10
Tablo 2.1. Kullanılan primerlere ait oligonükleotid sekansları.....	30
Tablo 2.2. PZR karışımını oluşturan bileşenler ve miktarları (16S rDNA ve <i>mecA</i> ).....	31
Tablo 2.3. PZR karışımını oluşturan bileşenler ve miktarları ( <i>pvl</i> ).....	31
Tablo 2.4. 16S rDNA, <i>mecA</i> ve <i>pvl</i> genleri için uygulanan amplifikasyon koşulları.....	31
Tablo 3.1. İdentifiye edilen <i>Staphylococcus</i> türleri ve türlerin izolasyon oranları.....	34
Tablo 3.2. İdentifiye edilen <i>Staphylococcus</i> türlerinin CMT skorlamasına göre dağılımları.....	34
Tablo 3.3. Metisiline dirençli <i>S. intermedius</i> suşlarında antibiyotik dirençliliği.....	37

## 1. GİRİŞ

Meme dokusundaki patolojik değişiklikler ve sütteki somatik hücre sayısındaki artış ile karakterize, meme bezlerinin yangısı olarak tanımlanan mastitis (IDF, 1987; Bradley, 2002; Blowey ve Edmondson, 2010), Yunancada meme anlamına gelen ‘mastos’ ve yangıyı ifade eden ‘itis’ kelimelerinin birleştirilmesi ile oluşmuş bir terimdir (Baştan, 2007). Mastitis; fizyolojik ve metabolik değişiklikler, travmalar ve mikroorganizmalar gibi her türlü irritan etkiye karşı meme dokusunun oluşturduğu yangısal bir cevaptır (Albenzio ve ark., 2002; Macun ve ark., 2011). Hastalık, sürekli yapılan araştırmalar ve geliştirilen kontrol metotlarına rağmen; tüm dünyada modern işletmeler de dahil olmak üzere tüm işletmelerde görülebilen, süt yönlü yetiştiriciliğin en önemli problemi olmaya devam etmekte, ekonomik kayba neden olan sorunların da başında gelmektedir (Bradley, 2002; Halasa ve ark., 2007; Hata ve ark., 2008; Bhutto ve ark., 2012). Mastitis nedenli ekonomik kayıpların büyük bir kısmı süt kaybı kaynaklı iken, hastalığın reproduktif sisteme, inek ve buzağıya, halk sağlığına etkileri ile teşhis ve sağaltım giderleri, veteriner hekim ve laboratuvar ücretleri de göz önüne alındığında ekonomik kayıplar daha da artmaktadır (Kossaibati, 2000; Halasa ve ark., 2007; Blowey ve Edmondson, 2010). İnfeksiyonlar dünya çapında çiftlikler arasında farklılık göstermekle birlikte, mastitislerin yıllık olarak inek başına ortalama 61€-97€ zarara neden olduğu bildirilmektedir (Hogeveen ve ark., 2011).

**Mastitisin etiyolojisinde** çok çeşitli mikroorganizmalar rol oynamakla birlikte, major patojenler geleneksel olarak bulaşıcı (kontagiyöz) ve çevresel mastitis etkenleri olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Bulaşıcı patojenler (*Staphylococcus aureus*, **Koagulaz negatif *Staphylococcus spp.***, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Mycoplasma spp.*) konakçada, özellikle meme bezinde hayatta kalmaya adapte olabilmiş mikroorganizmalar olarak değerlendirilmektedir. Bu grup mikroorganizmalar, tipik olarak epitel hücre ve somatik hücre sayısındaki (lökositler, ağırlıklı olarak

nötrofiller) artışla ortaya çıkan subklinik infeksiyonlara yol açarlar. İnfeksiyon, hijyenik olmayan sağım sırasında inekten ineğe ve memeden memeye geçer. Çevresel patojenler (*Streptococcus uberis*, koliform grubu bakteriler özellikle *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Bacillus lincheniformis*, *Streptococcus faecalis*, mantar ve mayalar), meme bezinin en iyi fırsatçı mikroorganizmaları olarak tanımlanırlar. Etkenler, konakçı vücudunda hayatta kalmaya adapte olmazlar, genelde memeyi istila ettikten sonra, burada çoğalarak immun yanıtı neden olurlar ve kolaylıkla bertaraf edilirler (Bradley, 2002; Blowey ve Edmondson, 2010; Scott ve ark., 2011). Ancak son yıllarda yapılan araştırma bulgularında, bulaşıcı ve çevresel mastitis etkenlerinin ayrımı konusunda net olmayan veriler vardır. Çevresel patojen olarak kabul edilen *E. coli* ve *S. uberis*'in tekrarlayan kronik infeksiyonlarda konakçı vücuduna adapte olabildiği ve bulaşıcı patojen olarak kabul edilen *S. dysgalactiae*'nin ise çevrede persiste kalabildiği bildirilmiştir (Scott ve ark., 2011).

Dünyada ve ülkemizde en önemli mastitis patojenleri arasında yer alan Stafilokoklar, geleneksel olarak, tavşan ve insan plazmasını koagule etme yeteneklerine göre koagulaz pozitif Stafilokoklar (KPS) ve koagulaz negatif stafilokoklar (KNS) olarak 2 grupta incelenmektedirler (Brown, 1999; Quinn ve ark., 2004; Kaliwal ve ark., 2011). KPS grubunda mastitis etkeni olarak *S. aureus*, *Staphylococcus intermedius* ve *Staphylococcus hyicus* bulunurken (Quinn ve ark., 2004), 50'den fazla tür ve alt türü içeren KNS grubunda ise 10'dan fazla türün mastitis vakalarından izole edildiği bildirilmiştir (Gillespie ve ark., 2009; Pyörälä ve Taponen, 2009; Thorberg ve ark., 2009).

Memenin, mastitise yol açan etkiyi nötralize etmek, yıkımlamak, kendini yenilemek ve normal fonksiyonlarına yeniden dönebilmek için gösterdiği fiziksel, kimyasal, bakteriyolojik ve patolojik değişiklikler çeşitli mastitis formlarının ortaya çıkmasına neden olur. Mastitisler, hastalığın meme dokusunda ve sütte oluşturduğu değişikliklere göre **linik** ve **sublinik mastitisler** olarak sınıflandırılmaktadır. **Klinik mastitisler**, hem meme dokusunda, hem de sütte gözle görülebilir değişikliklerin olduğu mastitislerdir. Meme dokusunda şişlik, ağrı, kızarıklık ve süt veriminde azalma vardır. Sütte de renk değişimleri, koku, sulanma ve pıhtı

görülebilmektedir. Klinik mastitisler olgunun süresine göre perakut, akut, subakut ve kronik mastitisler olarak klasifiye edilirler. **Subklinik mastitisler**, infeksiyon etkenlerinin meme dokusunda bulunmasına karşın, memede ve sütte gözle görülebilir bir bozukluğun olmadığı mastitislerdir. Ancak sütte somatik hücre sayısının (SHS) artması, süt veriminde %15-45'lik bir düşüş ve patojen etkenlerin izolasyonu ile teşhis edilebilen, infeksiyöz etkenleri taşıyan ve yayan bir kaynak durumundadırlar (Ak, 2000; Bhutto ve ark., 2012). Kolay teşhis edilemedikleri için sürü içinde hızla yayılır, süt verimini düşürürler ve sağaltımları zordur (Bradley ve ark., 2002). Sütçü işletmelerde oldukça büyük ekonomik kayıplara yol açan mastitislerde, kaybın %70-80'i subklinik mastitislere bağlanmaktadır (National Mastitis Council, 1996; Akan, 2006; Baştan, 2007; Halasa ve ark., 2007). Sütün mililitresindeki SHS'nin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerden biri olan California Mastitis Test (CMT), reaksiyonların gözle görülebilmesine imkan tanınması, yorumlanmasının kolay olması, karmaşık ekipmanlara gerek duyulmaması ve sürü bazında taramada kullanılabilmesi nedeniyle subklinik mastitisli hayvanların tanısında hızlı, ucuz ve etkili bir test olarak kabul edilmektedir (Bhutto ve ark., 2012).

Bakterilerin neden olduğu laktasyon ve kuru dönem mastitislerinin sağaltımında beta laktam grubu antibiyotik ya da antibiyotik kombinasyonları yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, son yıllarda tedavi amaçlı kullanılan bu grup antibiyotiklere karşı artan direnç oranları bildirilmektedir (Lowy, 2003; Sawant ve ark., 2005; Saldago, 2010). Stafilokoklarda beta-laktamaz enzimine dayanıklı penisilinlere karşı şekillenen direnç, genel olarak metisilin direnci olarak adlandırılmakta ve bu direnç, tüm beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı genel direncin ifadesi olarak kabul edilmektedir (Lowy, 2003; Vanderhaeghen ve ark., 2010; CLSI, 2013).

Bazı Stafilokok türleri, özellikle *S. aureus*, tarafından sentezlenebilen, insan ve tavşan polimorf nükleer lökositleri ve makrofajları üzerinde litik etkiye sahip bir lökositin olan Panton-Valentine Lökositini (PVL), Stafilokokların neden olduğu infeksiyonların patogeneğinde önemli bir virulens faktörü olarak

değerlendirilmektedir (Rainard ve ark., 2003; Barrio ve ark., 2006; Boyle-Vavra ve Daum, 2007; Lo ve Wang, 2011).

Tüm hijyenik uygulamalara rağmen, modern işletmeler de dahil olmak üzere mastitis probleminin sürmesi, medikal koruma yollarını gündeme getirmiş ve aşı uygulamalarını da içeren kontrol programlarının geliştirilmesini zorunlu kılmıştır. Ancak bir enfeksiyona karşı etkili bir mücadele yürütebilmek için, kesin etiyopatogenezisin ve bununla ilişkili epidemiyolojinin, bölge hatta sürü bazında bilinmesi gerekmektedir.

### 1.1. *Staphylococcus* Türleri

İnsan ve hayvanlarda çeşitli hastalıklara yol açabilen Stafilocokların, ilk kez ışık mikroskopunda görülüp tanımlanması 1878'de Robert Koch tarafından, sıvı besi yerinde üretilmesi ise 1880'de Pasteur tarafından gerçekleştirilmiştir. Etkenlerin, 1881'de Alexander Ogston tarafından fare ve kobaylar için patojen olduğu vurgulanmış ve 1884'te Rosenbach tarafından üretilen beyaz renkli koloniler *Staphylococcus albus*, sarı-portakal rengi kolonilerse *Staphylococcus aureus* olarak isimlendirilmiştir (Altemeier ve ark., 1981). Daha sonra *S. albus*'un ismi *Staphylococcus epidermidis* olarak değiştirilmiştir (Winn ve ark., 2006). Bakteriler, mikroskopik olarak üzüm salkımına benzeyen düzensiz kümeler oluşturmaları nedeniyle, Yunancada üzüm salkımı anlamına gelen "Staphylè" kelimesi türetilerek *Staphylococcus* ismini almıştır (Altemeier ve ark., 1981; Akan, 2006). Takip eden yıllarda yapılan araştırmaların temeli, patojen *S. aureus*'un patojen olmayan Stafilocoklardan ayrımı üzerine kurulmuş ve 1930'lu yıllarda koagülaz reaksiyonu *S. aureus*'un ayrımında kullanılabilecek bir test olarak kabul görmüştür. Diğer Stafilocok türlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar ise 1960'lı yılların ortalarında Baird-Parker ile başlamış, 1970'li yılların ortalarına kadar apatojen olarak kabul edilen KNS türlerinin klinik vakalardan sıklıkla izolasyonu sonrası, bu bakterilere bakış açısı değişmiştir. Stafilocok cinsi içinde 1994 yılı itibariyle 31 tür belirlenmiş

iken, bugün 50'nin üzerinde tür ve alt tür tanımlanmıştır (Kloos ve Bannerman, 1994; Winn ve ark., 2006).

Stafilokok türleri; Eubacteria alemi, Firmicutes şubesi, Bacilli sınıfı, Bacillales takımı, Staphylococcaceae ailesi ve *Staphylococcus* cinsi içerisinde yer alırlar (Akan 2006; Winn ve ark., 2006). Günümüze kadar *Staphylococcus* genusunda 50'yi aşkın tür ve alt tür tanımlanmasına karşın insan ve hayvanlar için en patojen tür *S. aureus* olarak kabul edilmektedir (Holt ve ark., 1994; Akan, 2006; Peacock, 2006).

Stafilokoklar, Gram pozitif, 0,5-1,5 µm çapında yuvarlak şekilli, hareketsiz, sporsuz, bazı suşları kapsüllü, *Staphylococcus saccharolyticus* ve *S. aureus* subsp. *anaerobius* hariç fakültatif anaerobik özellikte bakterilerdir. Mikroskopik olarak tekli, ikili, dörtlü koklar halinde bulunabilir, üç veya dört koktan oluşan kısa zincirler yapabilir veya düzensiz üzüm salkımı benzeri şekiller oluşturabilirler (Holt ve ark., 1994; Quinn ve ark., 2004; Akan, 2006; Peacock, 2006).

Etkenler, nutrient agar ve kanlı agar gibi genel besiyerlerinde 37 °C'de 24-48 saat içerisinde hafif konveks, kenarları düzgün, parlak, pürüzsüz, S-tipli (smooth) ve gözle görülebilir büyüklükte koloniler oluştururlar. *S. aureus* suşlarının bazıları sarı ve sarı-portakal renginde pigment oluşturabilirken, bazıları ise beyaz-gri renkte koloni oluştururlar. *Staphylococcus simulans*, *S. intermedius*, *S. epidermidis*, *S. hyicus*, *Staphylococcus capitis*, *S. saccharolyticus* ve *Staphylococcus cohnii* pigment oluşturmayan türlerdir. *S. aureus* suşlarının çoğu ve KNS türlerinin bazıları koyun kanlı agarda hemolitik koloniler oluştururken, tüm türler buyyonda homojen bulanıklık oluşturarak ürerler (Quinn ve ark., 1999; Akan, 2006; Peacock, 2006). Aerobik koşullarda optimal üreme ısıları 37 °C, optimal üreme pH'sı ise 7,4 olmakla birlikte, 7,0 °C-48,5 °C'ler arasında ve pH 4,2-9,3 arasında da üreyebilmektedirler. Etkenler, yüksek tuz konsantrasyonlarına dayanıklılık göstermekte ve içerisinde % 7,5-10 sodyum klorür (NaCl) içeren ortamlarda canlılığını sürdürebilmektedirler (Quinn ve ark., 2004; Peacock, 2006).

Biyokimyasal özellikleri açısından oksidaz negatif (*Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus vitulinus* ve *Staphylococcus fleurettii* hariç) ve katalaz pozitif olan Stafilocoklar, insan ve tavşan plazmasını koagule etme yeteneklerine göre KPS ve KNS olarak iki gruba ayrılırlar (Quinn ve ark., 2004; Kaliwal ve ark., 2011). *S. aureus* ve *S. intermedius* koagulaz pozitif, *S. hyicus* %11-89 oranında pozitif olmak üzere; diğer Stafilocok türleri koagulaz negatiftir (Quinn ve ark., 1999; Akan, 2006). Stafilocoklar glukozu fermentatif olarak parçalayıp, gaz oluşturmaksızın son ürün olarak laktik asit açığa çıkartırlar. Genellikle nitratları nitritlere indirgeyen bakterilerdir (Quinn ve ark., 2004; Winn ve ark., 2006).

Stafilocok türlerinin identifikasyonunda, oksidaz, katalaz, lamda (clumping faktör) ve tüpte koagulaz testleri, karbonhidrat fermentasyon testleri (glukoz, mannitol, maltoz, sukroz, laktoz, mannoz, arabinoz, trehaloz, ksiloz, rafinoz, sellobiyoz, ve N-asetil glukozamin), Voges-Proskauer (Asetoin testi, VP), üreaz, oksidasyon/fermentasyon (O/F), nitrat indirgenme, eskülin hidrolizasyon, DNaz, beta-glukuronidaz, beta-galaktosidaz, beta-glukosidaz, alkalın fosfataz, ornitin dekarboksilaz, arjinin dihidrolaz testleri, novobiosin ve polimiksin B'ye duyarlılık testleri ile hemoliz ve pigment oluşturma yetenekleri gibi özelliklerden yararlanılmaktadır (Holt ve ark., 1994; Quinn ve ark., 1999; Winn ve ark., 2006).



**Tablo 1.1.** Gram pozitif kokların ayırt edilmesinde kullanılan başlıca özellikler (Quinn ve ark., 1999).

Gram pozitif kok	Koagülaz	Katalaz	Oksidaz	O-F (glukoz)	Hemoliz	Basitrasin (0.04 U disk)	Furazolidon (100 µg disk)
Patojenik Stafilokoklar	+	+	-	F	+(-)	R	S
Patojenik olmayan Stafilokoklar	-	+	-	F	-(+)	R	S
Enterokoklar	-	-	-	F	(+)	R	S
Streptokoklar	-	-	-	F	(+)	R	S
Mikrokoklar	-	+	+*	O	-(+)	S	R

+: %90 ya da daha fazlası pozitif; -: %90'dan daha fazlası negatif; (+): Bazıları pozitif; (-): Bazıları negatif; F: Fermantatif; O: Oksidatif; R: Dirençli (Resistant); S: Duyarlı (Susceptible); \*: Modifiye oksidaz testi; Basitrasin duyarlılığı: Zon 10-25 mm; Furazolidon duyarlılığı: Zon 15-35 mm

**Tablo 1.2.** Hayvanlardan izole edilen Stafilokokların ayırımında kullanılan biyokimyasal reaksiyonlar ve özellikler (Holt ve ark., 1994; Quinn ve ark., 1999).

Stafilokok türleri	Koagülaz	DNase	Hemoliz	Pigment oluşumu	Alkalin fosfataz	Üreaz	Mannitol fermentasyonu	Eskülin hidrolizi	Novobiosin (5µg disk)	B Polimiksin (300 U disk)
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+*	+	d	+	-	S	R
<i>S. intermedius</i>	+	+	+	-	+	+	(d)	-	S	S
<i>S. hyicus</i>	d	+	+	-	+	d	-	-	S	R
<i>S. epidermidis</i>	-	d	(d)	-	d	+	-	-	S	R
<i>S. saprophyticus</i>	-	-	-	(d)	-	+	d	-	R	S
<i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i>	+	+	+	-	+	?	?	-	S	?
<i>S. caprae</i>	-	-	(d)	-	(+)	+	d	-	S	S
<i>S. gallinarum</i>	-	-	(d)	(d)	(+)	+	+	+	R	S
<i>S. arlettae</i>	-	-	-	+	(+)	-	+	-	R	?
<i>S. lentus</i>	-	-	-	d	(±)	-	+	+	R	S
<i>S. equorum</i>	-	-	(d)	-	(+)	+	+	d	R	?
<i>S. simulans</i>	-	-	(d)	-	(d)	+	+	-	S	S
<i>S. delphini</i>	?	-	+	-	+	+	(+)	?	S	?
<i>S. chromogenes</i>	-	-	-	+	+	+	d	-	S	R

+: %90 ya da daha fazlası pozitif; ± :%90 ya da daha azı pozitif; d: %11-89 pozitif; -: %90'dan daha fazlası negatif; (d): gecikmiş reaksiyon; ?: Bilinmiyor; \*: Köpeklerden izole edilen koloniler genellikle beyaz; R: Dirençli (Resistant); S: Duyarlı (Susceptible); Novobiosine dirençlilik: Zon ≤16mm.; Polimiksin B'ye dirençlilik: Zon < 10mm.

**Tablo 1.3.** Patojen Stafilokok türlerinin neden olduğu hastalıklar (Quinn ve ark. 1999; Quinn ve ark., 2004).

Tür	Konakçı	Hastalık
<i>S. aureus</i>	Sığır	Mastitis: subklinik, kronik, akut perakut veya gangrenöz Meme impetigosu Meme başında küçük püstüller
	Koyun	Mastitis: akut, perakut veya gangrenöz Kene piyemisi Periorbital egzama Stafilokokkal dermatitis
	Keçi	Mastitis: subakut veya perakut Stafilokokkal dermatitler
	Domuz	Mastitis: akut, subakut ve kronik Botriyomikoz Nekrotik stafilokokkal endometritis Meme impetigosu
	At	Mastitis: akut Botriyomikoz (kastasyonu takiben)
	Tavşan	Yeni doğanlarda eksudatif dermatitis Apse, konjuktivitis, piyemi
	Kümes hayvanları	Bumble-foot: Subkutan dokunun granülatöz infeksiyonu Hindilerde artritis ve septisemi Omfalitis (nadir)
	Kedi-Köpek	<i>S. intermedius</i> nedenli hastalıklara benzer supuratif lezyonlar
<i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i>	Koyun	Kazeöz lenfadenitise benzer lezyonlar
<i>S. intermedius</i>	Kedi-Köpek	Piyoderma, piyometra, endometritis, sistitis Otitis eksterna (diğer patojenler ile birlikte) Solunum yolu, kemik, eklem, yara, göz kapağı ve konjuktiva infeksiyonları
	At, sığır	Nadir infeksiyonlar
<i>S. hyicus</i>	Domuz	Eksudatif epidermidis, septik poliartritis
	Sığır	Mastitis (nadir)
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	Köpek	Otitis eksterna
<i>S. delphini</i>	Yunus	Supuratif deri lezyonları

**Tablo 1.4.** Hayvanlardan izole edilen bazı KNS türleri ve kaynakları (Quinn ve ark., 2004).

Türler	Konakçı	Kaynak
<i>S. arlettae</i>	Keçi	Burun
	Kanatlı	Deri
<i>S. capitis</i>	Keçi	Süt
<i>S. caprae</i>	Keçi	Deri
<i>S. caseolyticus</i>	Sığır	Süt ve süt ürünleri
<i>S. chromogenes</i>	Sığır	Süt
	Domuz	Deri
	Kanatlı	Deri
<i>S. cohnii</i>	Sığır	Süt
<i>S. epidermidis</i>	Sığır	Süt
	Köpek	Yara infeksiyonları
	At	Yara infeksiyonları
<i>S. equorum</i>	At	Deri
<i>S. felis</i>	Kedi	Otitis eksterna, deri infeksiyonu
<i>S. gallinarum</i>	Kanatlı	Deri infeksiyonu
<i>S. haemolyticus</i>	Sığır	Süt
<i>S. hominis</i>	Sığır	Süt
<i>S. lentus</i>	Domuz	Deri infeksiyonu
	Koyun	Deri infeksiyonu
	Keçi	Deri infeksiyonu
<i>S. saprophyticus</i>	Kedi	Deri
<i>S. sciuri</i>	Kedi	Deri infeksiyonu
<i>S. simulans</i>	Sığır	Süt
	Köpek	Deri
	Kedi	Deri
	Domuz	Deri
<i>S. vitulinus</i>	Sığır	Deri
	Koyun	Deri
	Domuz	Deri
<i>S. warneri</i>	Sığır	Süt
<i>S. xylosus</i>	Sığır	Süt
	Koyun	Süt
	Kedi	Deri
	Kanatlı	Deri
	Domuz	Deri
	At	Deri

Stafilokok türleri, iki önemli mekanizma ile infeksiyona neden olmaktadır. Bunlardan birisi, etkenlerin konak hücre ve dokularına kolonizasyonu ve konak savunma mekanizmalarından kaçışını sağlayan ekstraselüler moleküllerin sentezini kapsayan invazyon ve sonrasında yangı, diğeri ise toksin üretimidir (Gordon ve

Lowy, 2008; Liu, 2009). Etkenler, bu mekanizmaların işlemlerini sağlayarak infeksiyonların patogeneğinde genellikle kombine olarak rol alan ve duyarlı konakçısında klinik hastalıkları oluşturma becerisinde payı bulunan birbirinden farklı **virulens faktörlerine** sahiptir. Bu virulens faktörlerine, hücre duvarında bulunan toksik şok sendrom toksini gibi ekzotoksinler, lökositin gibi fagositlerin yıkımlanmasına aracılık eden endotoksinler, katalaz, koagülaz enzimleri ve etkenin dokulara invazyonunu, buralarda hayatta kalmasını destekleyen hiyaluronidaz enzimi dahildir. Özellikle ilgi çekici olan doku nekrozu ve lökosit yıkımlanmasından sorumlu olan sitotoksinin serbest bırakılmasını kodlayan Panton-Valentine lökositin (PVL) genidir. Bu genin varlığı infeksiyonun daha ciddi seyretmesi ile ilişkilidir (Quinn ve ark., 2004; Peacock, 2006).

Diğer Gram pozitif bakterilerde olduğu gibi Stafilokokların hücre duvarı virulens faktörlerinden olan **peptidoglikan tabakası**, hücre duvarı kuru ağırlığının %50'sini oluşturur. N-asetilglukozamin (NAGA) ve N-asetilmuramik asit (NAMA) polimerlerinden oluşan bu tabaka, mikroorganizmaların ozmotik stabilitesini sağlar ve bakteriye şeklini verir. Ayrıca, Stafilokokların peptidoglikan tabakası, insanda Gram negatif bakterilerin endotoksinlerine benzer aktivite gösterir. Yani makrofajlardan sitokin salınımını uyararak, komplementin aktivasyonuna ve trombosit agregasyonuna neden olur. Ayrıca, monositlerden interlökin (IL)-1 salınımını uyararak polimorfnükleer lökositlerin infeksiyon bölgesine toplanmalarına ve sonuçta apse oluşumuna da yol açar (Peacock, 2006).

Sadece Gram pozitif bakterilerde bulunan **teikoik asit**, Stafilokokların hücre duvarı peptidoglikan tabakası içerisinde yer alır ve mukozalarda bulunan spesifik reseptörler (fibronektin, fibrinojen, laminin, elastin ve kollajen) ile birleşerek Stafilokokların konağa adherensini sağlar. *S. aureus*'ta iki tür teikoik asit bulunur. Birincisi, peptidoglikan tabakaya kovalent bağlarla tutunmuş olan hücre duvarı teikoik asididir. Diğeri ise, stoplazmik membranın lipitleri ile ilişkilidir ve membran teikoik asidi olarak isimlendirilir. Teikoik asit tek başına zayıf bir immunojen, ancak peptidoglikan ile birlikte bulunduğu spesifik antikor yanıtını uyarabilir (Tünger, 2004; Peacock, 2006).

Birçok *S. aureus* suşunda hücre duvarını saran bir tabaka halinde, polisakkarit yapıda bir **mikrokapsül** bulunur. Bu ekzopolisakkarit yapı bakteriyi fagositozdan koruduğu gibi, etkenin konak hücrelerine ve özellikle de kateterler gibi yabancı cisimlere tutunmasını sağlar (Sutra ve Poutrel, 1994; Tünger, 2004). *S. aureus* suşlarında 11 farklı kapsül serotip arasında özellikle tip 8 ve tip 5'in, insanlardaki klinik hastalıkların ve sığır mastitislerinin %70-80'inden sorumlu olabileceği bildirilmiştir (Sutra ve Poutrel, 1994; Dego ve ark., 2002; Verdier ve ark., 2007).

**Yüzey proteinleri**, MSCRAMM (microbial surface proteins recognizing adhesive matrix molecules) olarak tanımlanır ve Stafilocokların konak dokularında kolonize olmasında en önemli faktörlerdir. Protein A, elastin, kollajen ve fibronektin bağlayan proteinler ve kümeleştirme faktörü (clumping factor), kimyasal yapıları ve hücre duvarı yerleşimleri birbirine benzeyen Stafilokokal yüzey proteinleridir (Tünger, 2004). Protein A'nın en önemli özelliği bazı immunglobulinlerin (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>4</sub>) Fc (kristalize fragment) reseptörleri ile birleşebilmesidir. Bu nedenle protein A'nın antikomplementer ve antifagositer etkinliği vardır, opsonizasyonu önler (Gordon ve Lowy, 2008). Yani protein A immunglobulinlerin Fc reseptörlerine bağlanarak bakteriyi antikora bağlı fagositozdan, ayrıca hücre dışına salgılanan protein A da aynı reseptörlere bağlanarak bakteriyi komplemente bağlı vücut savunmasından korur (Sutra ve Poutrel, 1994; Dego ve ark., 2002; Tünger, 2004). Sığır mastitislerinden izole edilen suşlarda kollajen ve fibronektin bağlayan reseptörlerin varlığı gösterilmiştir (Sutra ve Poutrel, 1994).

Stafilokoklar, hiyaluronidaz, fosfataz, nükleaz, lipaz, katalaz, stafilokinaz, DNaz, fibrinolizin, penisilinaz (beta laktamaz) ve proteaz gibi pek çok enfeksiyonda olduğu gibi, sığır mastitislerinin patogenezinde de önemli yer tutan **enzimler** üretirler. Bu enzimler Stafilocokların komşu dokulara yayılmasını kolaylaştırarak enfeksiyonların oluşumunda rol alırlar (Peacock, 2006). *S. aureus*'un süt içinde hızla çoğalabilmesinde de bu enzimlerin önemli katkısı vardır (Sutra ve Poutrel, 1994). Tüm Stafilocok türleri toksik hidrojen peroksidi toksik olmayan hidrojen ve suya ayırıştırıcı **katalaz** enzimini üretir. Stafilocokların benzer şekilde Gram pozitif kok görünümünde olan Streptokoklardan en önemli ayırım yöntemi katalaz testidir.

Ayrıca bakteriler bu enzim sayesinde fagositlerin içinde toksik oksijen radikalleri tarafından öldürülmeye karşı da direnç kazanırlar (Peacock, 2006). Stafilocoklarda bağlı koagülaz (clumping faktör) ve serbest koagülaz olmak üzere iki şekilde bulunabilen bir diğer önemli enzim **koagülaz** enzimidir. Bağlı koagülaz (clumping faktör) *S. aureus*'un hücre duvarında bulunur ve fibrinojene bağlanarak onu fibrine dönüştürür. Ayrıca bu enzim Stafilocokların birbirine yapışmasını da sağlar ve kolonizasyona aracılık ederek infeksiyonların patogeneğinde önemli bir rol oynar (Fitzgerald ve ark., 2000). Serbest koagülaz ise bakteriden dışarıya salgılanarak, globulin yapısındaki bir plazma faktörü ile birleşip trombine benzer yapıdaki stafilotrombini oluşturur. Stafilotrombin de fibrinojeni fibrine dönüştürerek plazmayı pıhtılaştırır (Peacock, 2006). **Lipaz**, yağları hidrolize ederek vücudun lipid içeren bölgelerinde Stafilocokların yaşamalarını sağlar. Etkenin yüzeysel dokuları invaze ederek fronkül ve karbonkül gibi lezyonları oluşturmasına olanak sağlar (Akan, 2006). Etkenlerin sahip oldukları **hiyaluronidaz** enzimi ise, bağ dokunun mukoid koruma maddesi olan hiyaluronik asidi hidrolize ederek, etkenlerin dokulara yerleşmesi ve yayılmasını kolaylaştıran ve bu nedenle de uzun yıllardır “yayılma faktörü” olarak da bilinen bir enzimidir (Akan, 2006). **DNaz** enzimleri endo ve ekzonükleaz aktivitesine sahip, nükleik asitleri parçalayan fosfodiesterazlardır (Peacock, 2006). Rezistanslık plasmidleri (R-plasmidi) tarafından kodlanan **beta-laktamaz (penisilinaz)** enzimi, penisilin, sefalosporin, ampisilin, kloksasilin gibi antibiyotiklerin yapısında bulunan  $\beta$ -laktam halkasındaki C-N bağımlı hidrolize ederek, antibiyotiklerin etkisini inaktive eden ve Stafilocoklarda penisilin direncine neden olan bir enzimidir (Fuda ve ark., 2005).

Bakteri yüzeyine gevşek olarak bağlanmış bir ekzopolisakkarit olan **slaym faktör** bakteri için önemli bir kolonizasyon faktörüdür (Sutra ve Poutrel, 1994). Slaym karakterinden dolayı Stafilocoklar tıbbi aletlere tutunup kolonize olabilmektedir. *S. aureus*'un slaym faktörü bakterinin meme dokusu epitel hücrelerine, slaym faktörü üretmeyen Stafilocoklara göre daha hızlı adezyonunu sağlar. Çok güçlü antijenik yapıda olup, yüksek titrede antikor oluşumuna yol açar. Slaym pozitif Stafilocok suşları daha virülenttir, fagositoya daha dirençlidirler ve antibiyotiklerin bakteri içine

difüzyonunu inhibe ettiklerinden daha fazla oranda antibakteriyellere direnç göstermektedirler (Gordon ve Lowy, 2008).

*S. aureus*, alfa, beta, gama ve delta olarak dört sınıfa ayrılabilen birtakım **hemolizinler** ve **Panton-Valentine Lökosidin (PVL)** adı verilen ve özellikle toplumdan kazanılmış metisiline dirençli *S. aureus* (TK-MRSA) infeksiyonlarından sıklıkla izole edilen (Boyle-Vavra ve Daum, 2007; Lo ve Wang, 2011) sitotoksik molekülleri üretir (Dinges ve ark., 2000). Bunlardan bir kısmı toksik etkilerini enzimatik aktivite ile gösterirken, diğerleri süper antijen özellikleri nedeniyle sitokin salınımını indükler. Ayrıca bu toksinler sayesinde Stafilokoklar yoğun yangısal yanıt olan bölgelerde bile üremelerini sürdürebilirler (Dinges ve ark., 2000; Tünger, 2004).

Direkt olarak enzimatik hasara yol açan dört toksin (alfa, beta, gama ve delta) içinde en önemlisi ve en patojeni **alfa-toksin**dir. Bu toksinler memeli hücrelerinde (eritrositler, lökositler, trombositler, fibroblastlar gibi) por oluşumuna neden olarak yangısal yanıtı indükler. Ayrıca tavşanlara subkutan olarak verildiğinde nekroza yol açar, dermonekrotiktir ve potansiyel nörotoksin etkisi de vardır. Eritrositler alfa-toksine en duyarlı hücrelerdir. Özellikle tavşan eritrositlerine karşı güçlü litik etkiye sahiptir ve kanlı agarda üreyen *S. aureus* kolonilerinin çevresinde görülen tam hemolizden bu toksin sorumludur. Alfa-toksin hasarına sığır meme epitel hücreleri en dirençli hücreler olarak bilinmesine rağmen, meme infeksiyonlarına neden olan Stafilokokların yaklaşık %20-50'sinin alfa-toksin ürettiği bildirilmiştir. Antijeniktir ve formol ile toksoid haline getirilebilir (Dinges ve ark., 2000; Deگو ve ark., 2002; Tünger, 2004; Ebrahimi ve Taheri, 2009). Alfa-toksin sığırların gangrenöz mastitisi ile ilişkilendirilir. Bu toksin, lökositlerde lizozomal parçalanmaya neden olarak, düz kasları etkiler, kasılma, paraliz ve sonunda kan damarları duvarlarının düz kas epitellerinin nekrozuna yol açar (Quinn ve ark., 2004).

**Beta-toksin** (sfingomiyelinaz C), alfa-toksin ile birlikte sfingomiyelin üzerine etkilidir ve invaziv Stafilokok infeksiyonları için tipik olan doku hasarı ve apse oluşumundan sorumlu toksindir (Tünger, 2004). İlk kez Glenny ve Stevens (1935)



tarafından 1935 yılında tanımlanmış ve toksinin hemolitik aktivitesini 10 °C'nin altındaki inkubasyondan sonra artırması nedeniyle "sıcak-soğuk hemolizin" olarak kaydedilmiştir. Başlangıçta belli bir miktar hemoliz oluşturan Stafilokokların hemoliz yapma aktiviteleri bu toksin nedeniyle soğuk ısılarda artar. Beta-toksin, sığırların meme bezlerindeki sekresyon yapan epitel hücrelerini yıkımlar, alfa-toksinin yıkımlayıcı etkisini artırır, bakterinin meme epitel hücrelerine adezyonunu kolaylaştırır ve Stafilokokların bölgede proliferasyonunu artırır. En güçlü şekilde koyun ve sığır eritrositlerine karşı litik etki gösterir. Sığırların mastitis vakalarında rol oynayan önemli bir virülens faktörü olup alfa-toksin ile birlikte sitotoksiktir, doku yıkımı ve apse oluşumundan sorumludur (Sutra ve Poutrel, 1994; Dinges ve ark., 2000; Dego ve ark., 2002).

**Gama-toksinin** etki mekanizması tam olarak anlaşılmasa da insan da dahil olmak üzere birçok canlının eritrositleri üzerine toksik etkili olduğu bilinmektedir (Prévost ve ark., 1995; Tünger, 2004). Hemolitik ve lökositleri lize edebilir. Bu toksin, polimorfnükleer nötrofillere olan sitolitik etkisinden dolayı infeksiyonun erken safhalarında önemli rol oynar (Fitzgerald ve ark., 2000).

**Delta-toksin**, farklı memelilerin hücrelerinde deterjan benzeri bir etki ile biyolojik membranlarda hasar oluşturur. Bu toksin ayrıca kolera toksinine benzer bir etki göstererek adenilat siklazı aktive eder ve cAMP salınımına neden olur. Bu enzimatik aktivitenin toksik şok sendromu ve Stafilokokal besin zehirlenmeleri gibi hastalıklarda görülen diyarenin oluşumunda rol aldığı düşünülmektedir (Dinges ve ark., 2000; Tünger, 2004).

**Lökosidinler**, diğer bir deyişle lökotoksinler; olası immun savunmada görev alan fagositik hücreleri hedef alarak gözenek oluşturan toksinler (pore-forming toxins) ailesini oluştururlar (Dinges ve ark. 2000, Prévost ve ark 2001; Barrio ve ark., 2006). Sığır polimorf nükleer nötrofiller ve makrofajlar üzerine sitolitik ve lökositik etkiye sahip toksinlerdir (Loeffler ve ark., 1986; Dego ve ark., 2002). Bazı Stafilokok türleri tarafından sentezlenen ve bu toksin ailesinde yer alan lökosidinlerden en

önemlisi insan ve tavşan polimorf nükleer lökositleri ve makrofajları üzerinde litik etkiye sahip **Panton-Valentine Lökosidini** (**PVL**). Bu gözenek açan toksinlerin litik etkisi 100 yıldır bilinmesine rağmen, toksin, adını Panton ve Valentine adlı araştırmacılardan alır (van de Velde, 1894; Prévost ve ark., 2001; Lo ve Wang, 2011). PVL, hedef hücrelerde por oluşumuna neden olarak hücrenin başta potasyum olmak üzere katyonlara geçirgenliğini arttırmaktadır. Buna bağlı olarak da lökosidin insan granülosit stoplazmalarında degranülasyona ve hücrenin lizisine neden olur. İnsanlarda nekrotizan primer kutanöz infeksiyonlar, deri ve yumuşak doku infeksiyonları, nekrotizan pnömoni ve tekrarlayan osteomyelitiser ile ilişkilendirilmesi nedeniyle özellikle *S. aureus* ve MRSA infeksiyonlarının patogeneğinde rol alan virulens faktörleri arasında en önemlilerinden biri olarak kabul edilmektedir (Lina ve ark., 1999; Gillet ve ark., 2002; Vandenesch ve ark., 2003; Lo ve Wang, 2011). Panton ve Valentine, ciddi deri infeksiyonlarında özellikle karbonkülde (büyük apse) antibiyotik kullanılmadığında PVL'nin öldürücü etkiye sahip olabileceğini söylemişlerdir (Lo ve Wang, 2011). *lukS-PV* ve *lukF-PV* genleri tarafından kodlanan, moleküler ağırlıkları sırasıyla 32 ve 35 Kilodalton (kDa) olan F (fast) ve S (slow) adı verilen 2 protein komponentinden meydana gelen PVL, genellikle ard arda dizilmiş asıl ve yardımcı kopya genler şeklinde kodlanmıştır (Prévost ve ark., 2001; Kaneko ve Kamio, 2004). Stafilokokal toksin ailesi uzun zamandır bilinen PVL (*lukS-PV* + *lukF-PV*), hemolizinler (HlgA+HlgB ve HlgC+HlgB) ve yakın yıllarda tanımlanan *lukM* (*lukM+lukF-PV*) ve *lukE/D* (*lukE+lukD*)'den oluşmaktadır (Rainard ve ark., 2003). Ruminant mastitislerinden izole edilen suşlarda da *LukM/LukF-PV* genlerinin varlığı bildirilmiştir (Prévost ve ark., 2001; Rainard ve ark., 2003; Barrio ve ark., 2006). Polimorf nükleer lökositler tarafından yapılan fagositozun meme bezlerinin savunma mekanizmalarının en önemlilerinden biri olduğu dikkate alındığında; Stafilokoklar tarafından üretilen ve meme savunmasına müdahale eden toksinlerin, Stafilokokal mastitislerin patogeneğinde potansiyel önemi olabileceği düşünülmektedir (Rainard ve ark., 2003).

**Epidermolitik toksin, enterotoksinler ve toksik şok sendrom toksin-1 (TSST-1)** gibi pirojenik ekzotoksinler süper antijen yapısındadır. Süper antijenler,

antijen sunan hücreler tarafından peptidlerin sunulma aşamalarına gerek duyulmadan, yani MHC sınıf II reseptörlerine klasik antijen bağlanma bölgesinden değil, T-hücre reseptörlerinin değişken bölgesine (V $\beta$  bölgesine) bağlanarak aşırı miktarda IL-1, tümör nekrozis faktör ve interferon- $\gamma$  salınımına neden olur. Bu nedenle, vücutta bulunabilecek küçük bir süper antijen üreten *S. aureus* odağı bile ciddi sistemik etkilere neden olabilir (Tünger, 2004). **Epidermolitik toksinler** (eksfoliyatin), Stafilokokal haşlanmış deri sendromuna neden olur. Eksfoliyatif toksinler, protein karakterinde, ET-A ve ET-B olmak üzere yapıları ve immunolojik özellikleri birbirinden farklı, ancak aynı moleküler ağırlıkta (24 kDa) ve aynı biyolojik aktiviteye sahip iki bölümden oluşur. ET-A kromozomal kökenli, ısıya dayanıklı (100 °C'de 20 dakika), ET-B ise plazmid kökenli ve ısıya dayanıksızdır. Her iki toksin de insan için immünojenik özelliktedir ve toksinlere karşı üretilen antikorlar nötralizan ve koruyucu etkiye sahiptir (Akineden ve ark., 2001; Tünger, 2004). **Enterotoksinler**, genel olarak besin zehirlenmelerinden sorumlu olan toksinlerdir. Bazı Stafilokokal enterotoksinler (SEs), klasik enterotoksinler gibi primatlar üzerinde kusmaya neden olmadıklarından dolayı Stafilokokal enterotoksin benzeri toksinler (SE-like, SEI) olarak tanımlanmışlardır. Günümüzde toplam 19 SE ve SEI toksin belirlenmiştir. Bunlardan 5'i iyi tanımlanmış klasik Stafilokokal enterotoksinler (SEA, SEB, SEC (C1, C2, C3), SED ve SEE) ve 14'ü yeni Stafilokokal enterotoksinler (SEG, SEH, ve SEI) veya Stafilokokal enterotoksin benzeri toksinler (SEIJ, SEIK, SEIL, SEIM, SEIN, SEIO, SEIP, SEIQ, SEIR, SEIU ve SEIV) olarak ayrılmaktadırlar (Balaban ve Rasooly, 2000; Wang ve ark., 2009). Stafilokokal enterotoksinler ile kontamine gıdaların tüketimi ile ortaya çıkan Stafilokokal gıda zehirlenmeleri, insanlarda görülen en yaygın gıda kaynaklı hastalıklardandır (Balaban ve Rasooly, 2000). Bunlar arasında, besin zehirlenmelerinde A ve D, hastane infeksiyonlarında B, koyun ve inek mastitislerinde ise C varyantları en sık karşılaşılan enterotoksinlerdir (Dinges ve ark., 2000). Enterotoksinler mide asiditesine, enzimlere ve 100 °C'de 30 dakika ısıtılmaya dirençlidirler (Tünger, 2004). **TSST-1**, insanlarda, ateş, diyare, eritrodermi, mental konfüzyon ve refrakter hipotansiyonla karakterize bir tablo oluşturur. Toksin tüm T-hücrelerine bağlanabilir ve T-hücrelerinde adeta bir patlamaya yol açar. Sonuçta, T-hücreleri ve makrofajlardan bol miktarda sitokin salgılanır ve endotoksik şoka

benzeyen toksik şok sendromu ortaya çıkar (Tünger, 2004). TSST-1'in, *S. aureus*'un meme infeksiyonlarındaki patojenitesini arttırmasının yanı sıra, etkenin adezyon ve invazyonuna da katkısı vardır (Deگو ve ark., 2002).

Hiç kuşkusuz, *S. aureus* karşılaşılan en patojen Stafilokok türüdür (Quinn ve ark., 2004; Akan, 2006; Peacock, 2006). *S. aureus* hayvanlarda hayvan türüne göre değişmekle birlikte; mastitis, dermatitis, irinli infeksiyonlar, osteomyelitis, artrit ve tenosinovitis gibi çeşitli infeksiyonlara neden olmaktadır (Quinn ve ark., 1999; Akan, 2006). Hayvanların yanı sıra insanlarda da impetigo, apse, endokarditis, hematojen osteomyelitis, septik artrit, pnömoni, toksik şok sendromu, gıda kaynaklı hastalıklar, haşlanmış deri sendromu ve nozokomiyal infeksiyonlar gibi çok çeşitli ve ciddi hastalıklara yol açar (Sutra ve Poutrel, 1994; Barrio ve ark., 2006; Hata ve ark., 2008).

## 1.2. *Staphylococcus* Mastitisleri

Stafilokok türleri gerek ülkemizde, gerekse dünyada sığır mastitislerinden en sık izole edilen türler olarak bilinmektedir (Bradley, 2002; Tenhagen ve ark., 2006; Macun ve ark., 2011; Yeşilmen ve ark., 2012; Middleton, 2013). Mastitis nedeni Stafilokoklar arasında en patojen tür olan *S. aureus*, çoğunlukla sağaltıma yanıt vermemesi nedeniyle sütçü sürülerde sürü yönetimi problemlerine ve ciddi ekonomik kayıplara yol açan akut ve subklinik mastitislerin en yaygın kontagiyöz ajanıdır (Deگو ve ark., 2002; Middleton, 2013; Scali ve ark., 2015). Üstelik süt endüstrisinde, *S. aureus*'un bulunduğu çiğ sütün kullanılması da önemli bir halk sağlığı problemidir (Sutra ve Poutrel, 1994; Scali ve ark., 2015). Etkenler, sağım sırasında infekte memeden diğerine ya da infekte inekten diğerine kolaylıkla bulaşır (Akineden ve ark., 2001; Rainard ve ark., 2003). Diğer bir KPS türü olan *S. intermedius* ve koagulaz değişken *S. hyicus* da mastitislerden izole edilebilmektedir (Quinn ve ark., 1999; Bradley, 2002; Pehlivanoglu ve Yardımcı, 2012).

En patojen tür olan *S. aureus*'tan, temel olarak koagülaz testinin negatif olmasıyla ayrılan KNS'lar arasında 10'dan fazla türün mastitis vakalarından izole edildiği bildirilmiştir (Pitkälä ve ark., 2004; Pyörälä ve Taponen, 2009; Supré ve ark., 2011; Frey ve ark., 2013; Vishnupriya ve ark., 2014). KNS türlerinin neden olduğu mastitislerin kontrolü, bu gruptaki bakterilerin çok farklı türleri içermesi nedeniyle zordur (Pitkälä ve ark., 2004; Tenhagen ve ark., 2006). En yaygın türler *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. epidermidis*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus haemolyticus* olarak rapor edilmiştir (Trinidad ve ark. 1990; Taponen ve ark., 2006; Thorberg ve ark., 2009; Supré ve ark., 2011). Bununla birlikte, mastitisli sütlerden izole edilebilen diğer türler *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus cohnii* subsp. *cohnii*, *Staphylococcus saprophyticus* ve *Staphylococcus lentus* olarak bildirilmiştir (Taponen ve ark., 2006; Gillespie ve ark., 2009; Macun ve ark., 2011; Vishnupriya ve ark., 2014).

KNS'lar, geleneksel olarak; mastitisin major etkenleri olarak kabul edilen *S. aureus*, Streptokoklar ve koliform mikroorganizmaların neden olduğu mastitislerle karşılaştırıldığında, hafif seyirli ve subklinik mastitislere neden olurlar (Taponen ve ark., 2006; Thorberg ve ark., 2009). Bu bakterilerin önemi, mastitisin çok yaygın sebeplerinden biri olmasındandır (Pitkälä ve ark., 2004; Tenhagen ve ark., 2006). *S. chromogenes*, hiç doğum yapmamış ya da bir doğum yapmış düvelerde major KNS türüyken, *S. simulans* sıklıkla daha yaşlı ineklerden izole edilen türdür. Çoklu doğum yapmış inekler laktasyonun daha sonraki dönemlerinde, bir doğum yapmış genç hayvanlar ise buzağılamadan önce ya da hemen sonra KNS türleri ile infekte olurlar (Trinidad ve ark., 1990; Gröhn ve ark., 2004; Taponen ve ark., 2006; Pyörälä ve Taponen, 2009). *S. chromogenes*, *S. simulans* ve *S. xylosus* somatik hücre sayısına yaptıkları etki bakımından *S. aureus*'a benzediğinden önemlidir (Myllys, 1995). KNS'ların neden olduğu mastitislerin prevalansı, yeni doğum yapmış genç hayvanlarla kıyaslandığında, kuru dönem sonrası ineklerde daha yüksektir (Green ve ark., 2005). KNS türlerinin hafif seyirli ve subklinik mastitislere neden olsalar da; ciddi lokal ve sistemik semptomların da sebebi olduğu rapor edilmiştir. Etkenler, persiste infeksiyonlara yol açarak, somatik hücre sayısındaki artışa bağlı süt kalitesi



İlk kez 1896 yılında Fransız tıp öğrencisi Ernest Duchesne tarafından *Penicillium notatum*'un *S. aureus* kolonileri üzerine yıkımlayıcı etkisi gösterilmiş, ardından 1928 yılında Alexander Fleming bu etkiyi yeniden incelemiş ve araştırmalarının sonuçlarını 1929'da yayımlanmasını takiben, 10 yıl sonra Oxford Üniversitesi'nde sınırlı olarak penisilin üretilmeye başlanmıştır. ABD'de 1943'te "mucize ilaç" olarak isimlendirilen penisilinlerin üretimi artmıştır. Bu yılların başında Stafilokoklara karşı çok etkili olan ve yaygın bir kullanım alanı bulan penisilinler, 1944 yılında Kirby (1944) tarafından penisilinaz (beta laktamaz) enzimi yapımına bağlı ilk penisilin direncinin bildirilmesiyle etkinliğini kaybetmiştir (Waness, 2010). Bu nedenle penisilinaz üreten *S. aureus* suşlarının neden olduğu infeksiyonların tedavisinde eritromisin, tetrasiklin ve gentamisin gibi yeni antibiyotikler kullanılmaya başlanmış; fakat 1951 yılında pek çok ülkeden antibiyotiklere karşı çoklu direnç gösteren *S. aureus* suşlarının varlığı bildirilmiştir (Chambers, 2001; Lowy, 2003). Penisilinazın amid bağına bağlanmasını engellemek amacıyla 1959 yılında, benzil penisilindeki fenoksi grubunun yerine metoksi grubunun eklenmesiyle elde edilen, *S. aureus* tarafından üretilen beta laktamaz enzimine dirençli semisentetik bir penisilin olan metisilin klinik kullanıma sunulmuş, ancak bu yeni ilaç çok kısa ömürlü olmuştur. Jevons (1961) tarafından metisiline dirençli ilk *S. aureus* (MRSA) suşları 1961 yılında İngiltere'den bildirilmiştir (Jevons, 1961, Enright ve ark., 2002; Waness, 2010). Takip eden yıllarda pek çok ülkeden MRSA suşları bildirilmiş ve direnç giderek artan oranda yayılmıştır (Enright ve ark., 2002). İlk izole edilen MRSA suşları hastane kaynaklı (HK-MRSA) iken, 1990'lı yıllardan itibaren toplumdan kazanılmış (TK-MRSA) suşlar önce halk arasında, sonra da sağlık merkezlerinde yaygınlaşmıştır (Enright ve ark., 2002; Waness, 2010).

Beta-laktam grubu antibiyotikler; bakteri stoplazmik membranında yer alan penisilin bağlayan proteinlere (PBPs) bağlanıp, spesifik olarak karboksipepsidaz ve özellikle de transpeptidazları inhibe ederek Stafilokokal hücre duvarı ana yapısı olan peptidoglikan sentezini durdururlar. Bu durumda, peptidoglikan sentezi tamamlanamayan bakterilerin dış ortama karşı direnci azalır ve stoplazmik membranın da parçalanması ile bakteri canlılığını kaybeder. Stafilokokların beta-

laktam grubu antibiyotiklere direnç geliştirmesinde en sık karşılaşılan mekanizma, bakteriler tarafından beta laktamaz (penisilinaz) üretimidir. Ancak, Stafilokokal penisilinaz enziminin hidrolizine dirençli penisilin grubu antibiyotikler içerisinde ilk elde edilen semisentetik antibiyotik **metisiline** (2,6-dimetoksifenilpenisilin) karşı direnç, beta laktamaz üretiminden farklı bir mekanizma ile ortaya çıkmaktadır (Mulligan ve ark., 1993; Pinho ve ark., 2001; Gordon ve Lowy, 2008; Saldago, 2010). Bu farklı mekanizmanın temeli, beta laktam grubu antibiyotiklere karşı düşük affinite gösteren ve PBP2a olarak isimlendirilen yeni bir PBP'nin bakteriler tarafından sentezlenmesi ile ilişkilidir. Beta laktam antibiyotiklere karşı düşük affinite, PBP2a varlığında da bakteri hücre duvarı peptidoglikanının sentezinin devam etmesi, buna bağlı olarak da bakterinin canlılığını devam ettirmesi şeklinde ortaya çıkmaktadır. Bu düşük affiniteli PBP2a'nın sentezinden kromozomal DNA üzerinde “*mec*” olarak adlandırılan bölgede yer alan ve 21–67 kb’lık Stafilokokal kromozom kaseti (*SCC*) içerisinde taşınan *mecA* geni sorumludur. Yani, metisiline dirençli Stafilokoklar (MRS), metisiline duyarlı Stafilokoklardan (MSS), kromozomlarında bulunan *mec* elemanı olarak tanımlanmış 40-60 kb’lık bir DNA parçası ve 76 kDa’luk PBP2a’yı kodlayan *mecA* geni varlığı ile ayrılırlar (Pinho ve ark., 2001; Gordon ve Lowy, 2008; Saldago, 2010). Bu nedenle, şüpheli Stafilokok izolatlarında metisilin direncinin belirlenmesinde, *mecA* geni ve/veya PBP2a varlığının belirlenmesini amaçlayan Polimeraz Zincir Reaksiyonuna (PZR) dayalı teknikler güvenilirliği açısından en çok kullanılan ve önerilen yöntemler olarak kabul edilmektedir (Lowy, 2003; Zhang ve ark., 2004; Krause ve Cavaco, 2009; Liu, 2009).

Stafilokoklarda *mecA* geninin varlığına bağlı olarak gelişen bu direncin, fenotipik olarak iki farklı şekilde ortaya çıktığı bildirilmektedir (Jacoby ve Archer, 1991; Chambers, 1997). Bunlardan ilki, koloniyi oluşturan tüm bakterilerin fonksiyonel *mecA* genini taşıması şeklinde ifade edilen **homojen direnç**dir. Nadir olarak görülen bu direnç şeklinde, dirençlilik çok yüksek orandadır. Oluşan yüksek direncin, ortam pH’sı, tuz konsantrasyonu, ısı, inkübasyon süresi gibi çevresel faktörlerle ilişkisi bulunmadığı bildirilmektedir (Jacoby ve Archer, 1991; Chambers, 1997; Hiramatsu ve ark., 2001). Fenotipik izolasyon uygulamaları sırasında en sık



karşılaşılan ve koloniyi oluşturan tüm bakterilerin *mecA* genini taşımalarına karşın, yüksek orandaki direncin  $10^6$ - $10^8$  bakteriden birinde belirlenebilmesi olarak ifade edilen ikinci direnç şekli ise **heterojen direnç**dir. İzole edilen suşların *mecA* genini taşımalarına karşın, suşlarda heterojen direnç görülme sebebinin, *femA* ve *femX* gibi *mecA* geninin fonksiyonlarını kontrol ettiği düşünülen genlerden bir veya birkaçının *mecA* geninin ekspresyonunu inhibe etmesi ile ilişkili olabileceği belirtilmektedir. Heterojen direncin, besiyerinin içerdiği NaCl konsantrasyonu, pH, inkübasyon sıcaklığı ve süresi gibi ortam faktörlerinden etkilendiği bildirilmektedir (Jacoby ve Archer, 1991; Chambers, 1997; Hiramatsu ve ark., 2001).

Metisiline karşı direncin ortaya çıkmasında diğer bir mekanizma ise aşırı beta laktamaz üretimi olarak bildirilmiştir (McDougal ve Thornsberry, 1986). Normalde Stafilokoklara karşı geliştirilen antistafilokokal penisilinler, etkenler tarafından sentezlenen beta laktamazın hidrolitik etkisine dirençlidirler. Ancak, bazı suşların aşırı miktarda beta laktamaz sentezlediği, bunun da metisilin ve oksasilini yavaş, ama anlamlı ölçüde hidrolize ettiği belirlenmiştir. Heterojen metisilin direncine sahip suşlarda, aşırı beta laktamaz üretimine bağlı olarak ortaya çıkan bu dirence **borderline (sınırdaki) direnç**, metisiline sınırdaki direnç gösteren bu suşlara da **BORSA (borderline resistant *S. aureus*)** ismi verilmiştir (Montanari ve ark., 1990; Chambers, 1997).

MRS türlerinin insanlarda yüksek morbidite ve mortaliteye neden olan infeksiyonlardan izolasyonunu takiben, etkenlerin hayvan populasyonlarında da teşhisi ile MRS infeksiyonları farklı bir epidemiyolojik boyut kazanmıştır. Bu nedenle araştırmalar, veteriner hekimliği alanını da içerecek şekilde tasarlanmaya başlanmıştır. Özellikle çiftlik hayvanları ve pet hayvanları gibi evcil hayvanların, temas halinde buldukları insanlar için kolonizasyon kaynağı olabilecekleri, buna bağlı olarak da insanlardaki infeksiyonlar açısından potansiyel rezervuar olarak kabul edilebilecekleri bildirilmiştir (van Loo ve ark., 2007; van Duijkeren ve ark., 2010; Huber ve ark., 2010; Weese ve ark., 2012; Harrison ve ark., 2014). Hayvanlar ve hayvanlar ile yakın temas halindeki insanlardan benzer ya da aynı MRSA klonlarının izole edilmesi ile, bu etkenlerin hem humanoza hem de zoonoz karakterde olduğu

ortaya konmuştur (Morgan, 2008; Huber ve ark., 2010; Park ve ark., 2011; Harrison ve ark., 2014).

Mastitisli ineklerden MRSA izolasyonu ilk kez 1972 yılında Belçika'dan bildirilmiştir (Devriese ve ark., 1972). Etkenin, sağıcıların ıslak ellerinde kolonize olan suşlar aracılığı ile horizontal olarak bulaşmış olabileceği belirtilmiştir (Morgan, 2008). İneklerden ilk izolasyonu takiben, birçok ülkede mastitisli sütlerde MRSA prevalansını belirlemeye yönelik araştırmalar yapılmış ve farklı prevalans oranları bildirilmiştir (Turutoğlu ve ark., 2009; Vanderhaeghen ve ark., 2010; Spohr ve ark., 2011; Pehlivanoglu ve Yardımcı, 2012; Gindonis ve ark., 2013) Metisilin direnci *S. aureus*'un yanı sıra, pek çok ülkede mastitisli hayvanlardan izole edilen KNS türlerinde de rapor edilmiştir (Gentilini ve ark. 2002; Sawant ve ark. 2005; Turutoğlu ve ark. 2006; Moon ve ark. 2007; Şeker ve Özenç, 2010; Huber ve ark., 2011; Frey ve ark., 2013). Yapılan çalışmalarda, bazı araştırmacılar tarafından metisilin direncinin KNS türlerinde, *S. aureus*'a göre daha yüksek oranda belirlendiği vurgulanmıştır (Pitkälä ve ark. 2004; Taponen ve Pyörälä 2009). Son yıllarda, özellikle, *S. sciuri* ve *S. fleuretti*'nin metisilin direncine yol açan *mecA* geninin doğal rezervuarı olduğu da tartışılmaktadır (Huber ve ark., 2011).

Metisiline dirençli Stafilokokların, tüm beta laktam grubu antibiyotiklere dirençli oldukları kabul edilmekte ve bu durum, beta laktam grubu antibiyotiklere karşı genel direncin ifadesi olarak tanımlanmaktadır (Witte, 1999; Pinho ve ark., 2001; Lowy, 2003; Saldago, 2010). Ayrıca, MRS suşlarında beta laktam antibiyotiklere direnç dışında saptanan çoklu antibiyotik direnci, bu etkenlere bağlı infeksiyonların sağaltımında tedavi seçeneklerini sınırlayan bir sorun olarak görülmektedir (Lowy, 2003; Saldago, 2010). Mastitisli sütlerden izole edilen MRS suşlarında antibiyotik dirençliliklerinin araştırıldığı çalışmaların bir çoğunda, izolatların çoklu antibiyotik direncine sahip oldukları vurgulanmaktadır (Kaynarca ve Türkyılmaz, 2010; Vanderhaeghen ve ark., 2010; Kreausukon ve ark., 2012).

Sunulan çalışma ile İzmir ili Ödemiş ilçesinde örneklenen mastitisli ineklerden Stafilokok türlerinin izolasyonu, izole edilen türlerde *mecA* ve *pvl* genlerinin PZR ile araştırılması ve metisilin direnci belirlenen suşların veteriner sahada yaygın olarak kullanılan çeşitli antibiyotiklere dirençliliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Gereç

#### 2.1.1. Hayvanların Seçimi ve Süt Örneklerinin Toplanması

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan örnekler, Mayıs 2014 ve Eylül 2014 tarihleri arasında, İzmir ili Ödemiş ilçesi merkez ve köylerinde bulunan aile tipi (küçük) ve ticari tipte (orta ya da büyük ölçekli) işletmelerden sağlandı. Çalışmada, 34 farklı işletmede bulunan, laktasyonun farklı dönemlerinde olan, en az bir doğum yapmış, son üç ayda antibiyotik tedavisi uygulanmamış 251 baş sağmal inekten temin edilen 972 meme lobu süt numunesi materyal olarak kullanıldı. Meme loblarının öncelikle fiziksel muayenesi yapılarak, meme loblarında şişkinlik, sıcaklık, ağrı, kızarıklık ya da sulu, kanlı, pıhtılı süt gibi anormallikler değerlendirilip, kayıt altına alındı. Daha sonra ise; her bir meme lobuna CMT uygulandı ve test skorlamaları (+1, +2, +3, şüpheli ve negatif) Schalm ve ark. (1971) tarafından önerildiği şekilde değerlendirilip, kayıt edildi. CMT skorlaması sonrasında, teste pozitif, şüpheli ve negatif reaksiyon veren hayvanlardan aseptik koşullarda süt örnekleri alındı. Bu amaçla, her bir meme başı %70'lik alkolle temizlenip kurulandı. İlk sağım sütü uzaklaştırıldıktan sonra, her bir memeden steril tüplere 10 ml süt örneği alındı. Alınan örnekler zaman geçirilmeden soğuk zincirde laboratuvara ulaştırıldı.

#### 2.1.2. Standart Suşlar

Tüm test ve uygulamalarda *S. aureus* ATCC 33591 (MRSA) ve *S. aureus* ATCC 49775 (PVL) pozitif kontrol suşları olarak, *S. aureus* ATCC 25923 (MSSA) ise negatif kontrol suşu olarak kullanıldı.

### 2.1.3. Besiyerleri, Solüsyonlar, Çözeltiler, İdentifikasyon Kitleri ve Antibiyotik Diskleri:

- Columbia Blood Agar Base (Oxoid, İngiltere)
- Trypticase Soy Broth (TSB) (Oxoid, İngiltere)
- Trypticase Soy Agar (TSA) (Oxoid, İngiltere)
- Nutrient Broth (NB) (Oxoid, İngiltere)
- Mueller Hinton Agar (MHA) (Oxoid, İngiltere)
- Oksidasyon/ Fermentasyon (O/F) Basal Medium (Merck, Almanya)
- Gram boyama solüsyonları
- Fizyolojik tuzlu su (%0,9'luk FTS)
- Hidrojen peroksit (%3'lük ve %30'luk, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) çözeltisi
- Taze tavşan plazması
- CMT (Kaliforniya Mastitis Testi) solüsyonu (Eimü, Almanya)
- %10'luk glikoz ve mannitol solüsyonları
- Steril parafin (Aykim, Bursa, Türkiye)
- Steril gliserin (Tekkim, Bursa, Türkiye)
- Oksidaz test kiti (Bioanalyse, Ankara, Türkiye)
- Gram pozitif ticari identifikasyon kiti (BD BBL Crystal™ Gram-Positive ID Kit), (Becton, Dickinson and Company, USA)
- Amoksisilin+klavulanik asit (30µg) (Oxoid, İngiltere)
- Enrofloksasin (5µg) (Oxoid, İngiltere)
- Sefoksitin (30µg) (Oxoid, İngiltere)
- Oksasilin (1µg) (Oxoid, İngiltere)
- Sefalotin (30µg) (Oxoid, İngiltere)
- Rifampisin (5µg) (Oxoid, İngiltere)
- Gentamisin (10µg) (Oxoid, İngiltere)
- Eritromisin (15µg) (Oxoid, İngiltere)
- Penisilin G (10U) (Oxoid, İngiltere)
- Tetrasiklin (30µg) (Oxoid, İngiltere)
- Trimetoprim/sulfametoksazol (25µg) (Oxoid, İngiltere)
- Vankomisin (30µg) (Oxoid, İngiltere)

### 2.1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda (PZR) Kullanılan Buffer, Solüsyon, Ekipman ve Cihazlar

Tris-Borate-EDTA Buffer 10X (10X TBE Buffer) (Fermentas, Litvanya)

Ethidium bromid solüsyonu (AppliChem, Almanya)

Agaroz (Basica Le Agarose, Prona, Fransa)

Primerler (ThermoFisher Scientific, Almanya)

10X PCR buffer (Fermentas, Litvanya)

dNTP mix (Fermentas, Litvanya)

MgCl<sub>2</sub> (Fermentas, Litvanya)

Taq DNA Polymerase (Fermentas, Litvanya)

DNA ladder (GeneRuler™ 100 bp DNA ladder, Fermentas, Litvanya)

6XLoading dye (Fermentas, Litvanya)

Vorteks (Ika, Almanya)

Soğutmalı santrijüj (Sigma, Almanya)

Hassas terazi (Ohaus-Pioneer, İsviçre)

Thermal cycler (Techne TC-Plus, İngiltere)

Elektroforez güç kaynağı (Thermo Scientific, ABD)

Jel elektroforez cihazı (Thermo Scientific, ABD)

UV-transilluminatör (Vilber Lourmat, Avustralya)

## 2.2. Yöntem

### 2.2.1. Örneklerden *Staphylococcus* Türlerinin İzolasyon ve İdentifikasyonu

Soğuk zincir şartlarında hızlı bir şekilde laboratuvara ulaştırılan her bir süt örneğinden 10 µl alınarak, %7 oranında koyun kanı içeren Columbia blood agara (Oxoid, İngiltere) ekimler yapıldı. Petriler 37 °C'de aerobik koşullarda 24 saat inkube edildi. İnkubasyon sonrasında agarda en az beş koloni oluşturan süt örnekleri değerlendirmeye alındı. Üremiş kolonilerin makroskobik (koloni morfolojisi, pigment oluşumu, hemoliz) ve mikroskobik (Gram boyanma özelliği)

değerlendirilmeleri yapıldı. Yuvarlak, kenarları düzgün, üzeri pürüzsüz, parlak, - S (smooth) tipli, sarımsı-krem ya da beyaz renkli, 1-2 mm çapındaki koloniler seçilerek, bu koloniler Gram boyama yöntemi ile boyandı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda incelendi ve Gram pozitif kok görünümde kümeler oluşturan bakteriler *Staphylococcus* yönünden şüpheli olarak kabul edildi. Bu görünüme sahip bakterilerin oluşturduğu kolonilerden birer tane seçilerek pasajları yapıldı ve saf kültürler elde edildi. Şüpheli izolatlar ilk olarak standart biyokimyasal testler uygulandı. Bu amaçla, oksidaz, lamda ve tüpte katalaz, lamda ve tüpte koagülaz, glukoz fermantasyonu ile mannitolün anaerobik fermantasyonu testleri yapıldı (Holt, 2000; Quinn ve ark., 2004; Arda, 2011). İzolatların kesin identifikasyonları ise Gram pozitif ticari identifikasyon kiti (BD BBL Crystal™ Gram Positive ID kit, Becton, Dickinson and Company, USA) kullanılarak gerçekleştirildi. İdentifikasyon kiti, üretici firmanın önerisi doğrultusunda kullanıldı. Bu amaçla, TSA'da (Oxoid, İngiltere) aktive edilen taze kültürlerden bir şüpheli koloni seçilerek, test kiti içinde bulunan inokulum sıvısı tüplerine eklendi. Süspanse edilen inokulum sıvısı 10-15 sn vorteksledi. İnokulum sıvısının bulanıklığının McFarland No. 0,5 standardı ile eşleşmesi sağlandı. Hazırlanan her bir inokulum sıvısı, test kitinin kurutulmuş biyokimyasal ve enzimatik substrat içeren panellerine boşaltıldı. Paneller, 37 °C'de, aerobik koşullarda, %40-60 oranında nem içeren etüvde 18-24 saat inkübe edildi. Daha sonra, paneller, beyaz ışık ve UV ışık kaynağı (BD Crystal panel viewer, Becton, Dickinson and Company, USA) kullanılarak değerlendirildi. Elde edilen veriler test için özel hazırlanmış olan bilgisayar programına girilerek şüpheli izolatların kesin identifikasyonları tamamlandı. İzole ve identifiye edilen suşlar, daha sonra DNA ekstraksiyonunda kullanılmak üzere, %15 oranında gliserin içeren TSB (Oxoid, İngiltere) içerisinde -20 °C'de saklandı.

## **2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)**

### **2.2.2.1. DNA Ekstraksiyonu**

Pozitif (MRSA ATCC 33591 ve PVL ATCC 49775) ve negatif (MSSA ATCC 25923) kontrol suşları ile birlikte, bu çalışmada elde edilen tüm *Staphylococcus*

izolatlarından DNA ekstraksiyonu kaynatma yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Bu amaçla, kontrol suşları ve izolatların TSA'da (Oxoid, İngiltere) üremiş taze ve saf kolonilerinden birer adet seçilerek, koloniler 500 µl steril distile su içeren ependorflar (DNase-RNase free) içerisinde süspansiyon edildi. Süspansiyon, 100 °C'lik su banyosunda 10 dakika bekletildikten sonra 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Bakteriyel DNA içeren süpernatant alınarak, PZR karışımı için kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı (Zhang ve ark., 2004; Garipcin ve Seker, 2015).

### 2.2.2.2. Amplifikasyon Koşulları

Çalışmada; Choi ve ark. (2003) tarafından tanımlanan *mecA* genine spesifik primerler, internal kontrol için Strommenger ve ark. (2003) tarafından tanımlanan *Staphylococcus* spesifik 16S rDNA primerleri ile Lina ve ark. (1999) tarafından tanımlanan *pvl* toksin genine spesifik primerler kullanıldı. *Staphylococcus* spesifik 16S rDNA ve *mecA* genlerinin belirlenmesinde ikili PZR protokolü, *pvl* toksin geninin belirlenmesinde ise tekli PZR protokolü uygulandı. Kullanılan primerlere ait nükleotid sekansları Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

**Tablo 2.1.** Kullanılan primerlere ait oligonükleotid sekansları

Hedef genler		Oligonükleotid sekansları (5'-3')	Bant büyüklüğü (bp)
16S rDNA	Forward	CAGCTCGTGTTCGTGAGATGT	420
	Reverse	AATCATTTGTCCCACCTTCG	
<i>mecA</i>	Forward	CCTAGTAAAGCTCCGGAA	314
	Reverse	CTAGTCCATTCGGTCCA	
<i>pvl</i>	Forward	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA	433
	Reverse	GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAAGC	

PZR karışımı, final hacmi 25 µl olacak şekilde hazırlandı. Karışımı oluşturan PZR bileşenleri ve miktarlar Tablo 2.2 (16S rDNA ve *mecA*) ve Tablo 2.3'te (*pvl*) gösterilmiştir. Çalışılacak izolat sayısına göre hazırlanan PZR karışımından, mini PZR tüplerine (DNase-RNase free) 20'şer µl dağıtıldı. Daha sonra, her birinin



üzerine 5 µl hedef DNA ilave edildi. Tamamlanan reaksiyon karışımları için uygulanan amplifikasyon koşulları Tablo 2.4'te gösterilmiştir. Elde edilen amplifikasyon ürünleri (16S rDNA 420 bç, *mecA* 314 bç ve *pvl* 433 bç), ethidium bromidle (5 µg/ml) boyanmış % 1,5'luk agaroz jelde, sabit akımda 100 voltta 60 dakika elektroforeze tabi tutularak, UV-transilluminatörde görüntülendi.

**Tablo 2.2.** PZR karışımını oluşturan bileşenler ve miktarları (16S rDNA ve *mecA*)

PZR bileşeni	Miktar (16S rDNA, <i>mecA</i> )
10XPCR buffer	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub>	3 µl
dNTP karışımı	0,5 µl
16S rDNA-F	0,1 µl
16S rDNA-R	0,1 µl
<i>mecA</i> -F	0,1 µl
<i>mecA</i> -R	0,1 µl
Taq DNA polimeraz (1U)	0,2 µl
Distile su	13,4 µl

**Tablo 2.3.** PZR karışımını oluşturan bileşenler ve miktarları (*pvl*)

PZR bileşeni	Miktar ( <i>pvl</i> )
10XPCR buffer	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub>	3 µl
dNTP karışımı	0,5 µl
<i>pvl</i> -F	0,1 µl
<i>pvl</i> -R	0,1 µl
Taq DNA polimeraz (1U)	0,2 µl
Distile su	13,6 µl

**Tablo 2.4.** 16S rDNA, *mecA* ve *pvl* genleri için uygulanan amplifikasyon koşulları

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık		Süre	
		<i>mecA</i> ve 16S rDNA	<i>pvl</i>	<i>mecA</i> ve 16S rDNA	<i>pvl</i>
Ön Denaturasyon	1	95 °C	95 °C	5 dk	5 dk
Denaturasyon	30	95 °C	94 °C	2 dk	30 sn
Primer Bağlanması	30	54 °C	62 °C	1 dk	30 sn
Uzama	30	72 °C	72 °C	1 dk	1 dk
Son uzama	1	72 °C	72 °C	7 dk	5 dk

### 2.2.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

PZR ile metisiline dirençli olduğu belirlenen suşların test edilen antibiyotiklere dirençlilikleri Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlendi (CLSI, 2013). Bu amaçla, amoksisilin+klavulanik asit (30µg), enrofloksasin (5µg), sefoksitin (30µg), oksasilin (1µg), sefalothin (30µg), rifampisin (5µg), gentamisin (10µg), eritromisin (15µg), penisilin G (10U), tetrasiklin (30µg), trimetoprim/sulfametoksazol (25µg) ve vankomisin (30µg) antibiyotik diskleri (Oxoid, İngiltere) kullanıldı. Tüm uygulamalarda pozitif (MRSA ATCC 33591) ve negatif (MSSA ATCC 25923) kontrol suşları da kullanıldı.

Yoğunluğu McFarland No. 0,5'e göre ayarlanan taze bakteri buyyon kültürlerinden 0,1 ml alındı ve buyyon kültürleri steril sıvıplar yardımıyla yayılarak Mueller Hinton agara (Oxoid, İngiltere) inokule edildi. Antibiyotik diskleri agar yüzeyine yerleştirildikten sonra, oksasilin (1µg) ve sefoksitin (30µg) disklerinin yerleştirildiği petripler 35 °C'de 24 saat inkübe edilirken, diğer petripler 37 °C'de 18 saat süreyle inkübasyona kaldırıldı. Süre sonunda oluşan zon çapları ölçülüp, elde edilen değerler CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) kriterleriyle karşılaştırıldı. Buna göre test edilen suşlar, dirençli (R), orta derecede duyarlı (I) ve duyarlı (S) olarak değerlendirildi (CLSI, 2013).

### 3. BULGULAR

#### 3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları:

Sunulan çalışmada, İzmir ili Ödemiş ilçesi merkez ve köylerinde bulunan 34 farklı küçük (aile tipi), orta ya da büyük ölçekli işletmelerden, laktasyonun farklı dönemlerinde olan 251 baş sağmal inekten alınan 972 meme lobu süt örneği kullanıldı. Her bir meme lobuna uygulanan CMT sonrasında, 757 meme lobu süt örneğinin CMT'ye pozitif reaksiyon verirken, 215 meme lobu süt örneğinin ise negatif reaksiyon verdiği belirlendi.

CMT pozitif ve negatif toplam 972 meme lobu süt örneğinden 182 (%18,72) *Staphylococcus* suşu izole ve identifiye edildi. Örneklenen 251 adet ineğin 120'sinin (%47,8) en az bir Stafilokok türü ile infekte olduğu belirlendi.

İdentifiye edilen 182 adet Stafilokok suşunun 137'sinin (%75,27) KPS türü, 45'inin (%24,73) ise KNS türü olduğu belirlendi. Çalışmada toplam 11 farklı Stafilokok türü izole edildi. Türler arasında en yüksek izolasyon oranına sahip tür *S. intermedius* (%42,30) olarak belirlenirken, bunu; *S. aureus* (%32,97) ve *S. saprophyticus*'a (%10,99) ait izolasyon oranları izledi. Çalışmada identifiye edilen 182 *Staphylococcus* türü ve türlerin izolasyon oranları Tablo 3.1'de, türlerin CMT skorlamasına göre dağılımları ise Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

**Tablo 3.1.** İdentifiye edilen *Staphylococcus* türleri ve türlerin izolasyon oranları

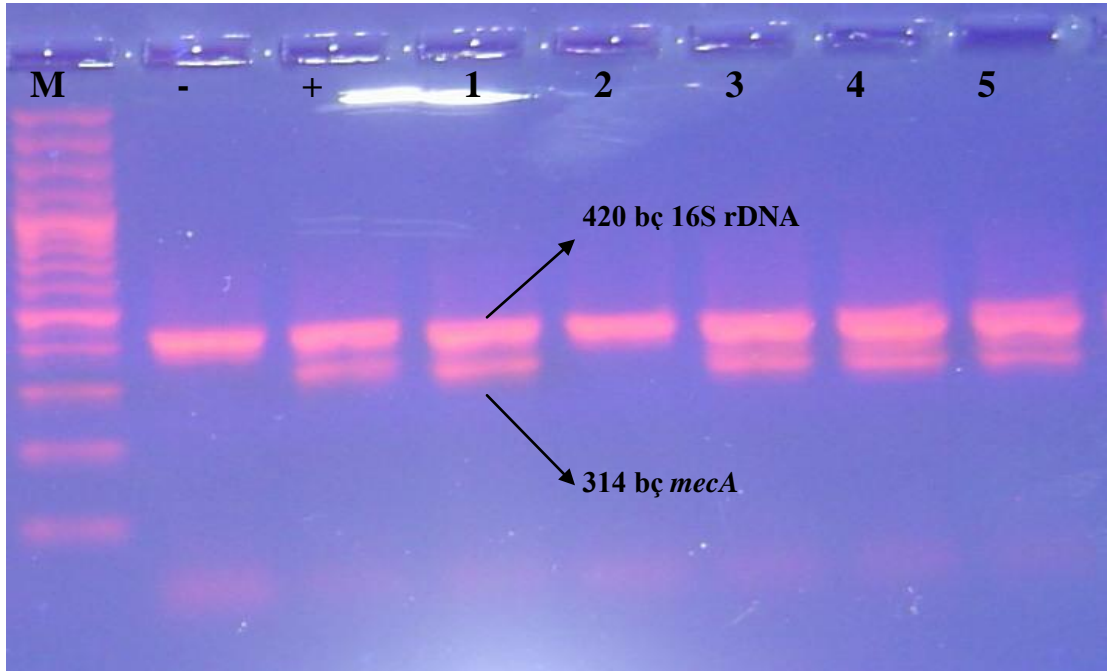
Tür	Sayı (n)	Yüzde (%)
<i>S. aureus</i>	60	32,97
<i>S. intermedius</i>	77	42,30
<i>S. saprophyticus</i>	20	10,99
<i>S. haemolyticus</i>	11	6,04
<i>S. simulans</i>	5	2,75
<i>S. capitis</i>	3	1,65
<i>S. epidermidis</i>	2	1,10
<i>S. kloosii</i>	1	0,55
<i>S. sciuri</i>	1	0,55
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	1	0,55
<i>S. auricularis</i>	1	0,55
<b>Toplam</b>	<b>182</b>	<b>100</b>

**Tablo 3.2.** İdentifiye edilen *Staphylococcus* türlerinin CMT skorlamasına göre dağılımları

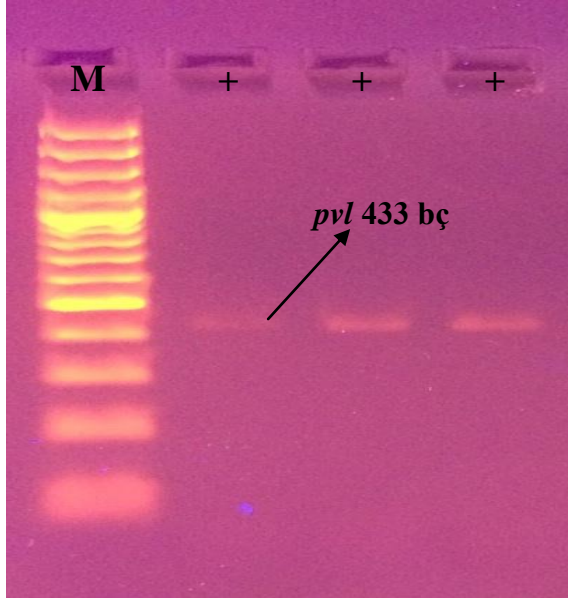
Tür (n=182)	CMT skorlaması			
	+1 (n)	+2 (n)	+3 (n)	Negatif (n)
<i>S. aureus</i>	15	27	9	9
<i>S. intermedius</i>	18	21	8	30
<i>S. saprophyticus</i>	1	6	1	12
<i>S. haemolyticus</i>	4	1	1	5
<i>S. simulans</i>	1	2	2	-
<i>S. capitis</i>	1	-	-	2
<i>S. epidermidis</i>	-	2	-	-
<i>S. kloosii</i>	1	-	-	-
<i>S. sciuri</i>	1	-	-	-
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	-	-	-	1
<i>S. auricularis</i>	-	-	-	1
<b>Toplam</b>	<b>42 (% 23,07)</b>	<b>59 (%32,42)</b>	<b>21 (%11,54)</b>	<b>60 (%32,97)</b>

### 3.2. PZR bulguları

Süt örneklerinden identifikasyon kiti ile tiplendirilen toplam 182 *Staphylococcus* türünün tamamında 16S rDNA spesifik bantlar saptanırken, izolatlardan 4'ünün (%2,2) ise *mecA* geni taşıdığı belirlendi. *mecA* genine sahip 4 Stafilokok türünün dördü de *S. intermedius*'tu. Buna göre, toplam 77 *S. intermedius* suşunda *mecA* pozitifliği %5,19 olarak tespit edildi. PVL toksin varlığının da araştırıldığı çalışmada, suşların hiç birinde *pvl* toksin genine rastlanmadı. Dört adet *mecA* pozitif izolat örnekleme yapıldığı işletmeler yönünden incelendiğinde, izolatlardan 2'sinin aynı işletmeden, diğerlerinin ise farklı işletmelerden sağlandığı belirlendi. 16S rDNA (420 bç) ve *mecA* (314 bç) genlerine ait jel görüntüsü Şekil 3.1'de, *pvl* (433 bç) geni pozitif kontrolüne ait jel görüntüsü ise Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



**Şekil 3.1.** 16S rDNA ve *mecA* genlerine ait PZR bulguları. M: DNA ladder (100 bç); -: *mecA* negatif kontrol (MSSA ATCC 25923); +: *mecA* pozitif kontrol (MRSA ATCC 33591); 1,3-5: *mecA* pozitif *S. intermedius* suşları; 2: *mecA* negatif *Staphylococcus* izolatı



**Şekil 3.2.** *pvl* toksin geni pozitif kontrol suşuna ait PZR bulguları. M: DNA ladder (100 bç); +: *pvl* pozitif kontrol (*S. aureus* ATCC 49775)

### 3.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

PZR ile metisiline dirençli olduğu belirlenen 4 *S. intermedius* suşunun, veteriner sahada yaygın olarak kullanılan çeşitli antibiyotiklere dirençlilikleri Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak araştırıldı. Buna göre; *mecA* pozitif 4 *S. intermedius* suşunun tümünün penisilin G, oksasilin ve sefoksitine dirençli olduğu belirlendi. Ayrıca izolatlarda eritromisine %50, rifampisin, gentamisin, tetrasiklin ve trimetoprim+sulfametaksazole karşı ise %25 oranlarında direnç tespit edildi. Suşların tamamı amoksisilin+klavulanik asit, sefalothin ve vankomisine karşı duyarlı idi. Metisiline dirençli izolatların, test edilen antibiyotiklere karşı dirençlilik profilleri Tablo 3.3'te gösterilmiştir.

**Tablo 3.3.** Metisiline dirençli *S. intermedius* suşlarında antibiyotik dirençliliği

Antibiyotikler	<i>mecA</i> pozitif <i>S. intermedius</i> izolatları (n=4)					
	S		I		R	
	n	%	n	%	n	%
Amoksisilin+klavulanik asit (30µg)	4	100	-	0	-	0
Enrofloksasin (5µg)	3	75	1	25	-	0
Sefalothin (30µg)	4	100	-	0	-	0
Rifampisin (5µg)	3	75	-	0	1	25
Gentamisin (10µg)	3	75	-	0	1	25
Eritromisin (5µg)	1	25	1	25	2	50
Penisilin G (10U)	-	0	-	0	4	100
Tetrasiklin (30µg)	3	75	-	0	1	25
Trimetoprim+Sulfametoksazol (25µg)	3	75	-	0	1	25
Vankomisin (30µg)	4	100	-	0	-	0
Oksasilin (1µg)	-	0	-	0	4	100
Sefoksitin (30µg)	-	0	-	0	4	100

#### 4. TARTIŞMA

Süt yönlü yetiştiricilik yapan işletmelerin en önemli problemi olan mastitis, hayvan sağlığını etkilediği kadar süt veriminin ve kalitesinin de düşmesine yol açtığından, işletmenin ticari açıdan sürdürülebilirliğini de önemli oranda etkileyerek ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Sargeant ve ark., 2001; Sabuncuoğlu ve Çoban, 2006; Baştan, 2007). Ülkemiz için süt endüstrisi önemli olup, 2014 yılı verilerine göre ülkemizde 2.427,909 adet sağmal kültür sığırı bulunmakta (TÜİK, 2014) ve Türkiye’de sağılan toplam sütün %87,1’i ineklerden sağlanmaktadır (TÜİK, 2010). İzmir iliye 2014 yılı verilerine göre 192.824 adet kültür sığırı barındırmakta ve bu sığırların 68.425 tanesi Ödemiş ilçesinde bulunmaktadır. İzmir ilinin yine aynı senenin verilerine göre yıllık süt üretimi 1.411,372 ton iken, üretilen sütün 500.871 tonu Ödemiş ilçesinden sağlanmaktadır (Tarım Bakanlığı, 2014). Resmi verilerden de görüldüğü üzere, süt üretimi bu bölge ekonomisi için oldukça önem taşımaktadır. Ayrıca, sadece süt üretimi değil, üretilen sütün sağlıklı olması da bölge ekonomisi açısından önem arz etmektedir. Ülkemizde Stafilocok orijinli ve güçlükle tedavi edilen mastitis olgularına sıkça rastlanmaktadır. Sunulan bu çalışma ile İzmir ili süt ihtiyacının büyük bir kısmını sağlayan Ödemiş ilçesi merkez ve köylerinde bulunan sağmal ineklerde Stafilocoklara bağlı mastitis prevalansını belirlemenin, bölge ekonomisi üzerine olumlu bir katkı sağlayacağı düşünülmüştür.

Meme yangısına neden olan etkenlerin rol oynadığı subklinik mastitislerin teşhisinde ve sürü sağlığını belirlemede tarama testi olarak kullanılan CMT, reaksiyonların gözle görülebilmesine imkan tanınması ve karmaşık ekipmanlara gerek duyulmaması gibi nedenlerle hızlı, ucuz ve etkili bir test olarak kabul edilmektedir (Sargeant ve ark., 2001; Bhutto ve ark., 2012). Ancak testin negatif sonuç verdiği meme loblarında dahi, yüksek oranlarda mikrobiyolojik üreme tespit edilebildiği bildirilmiştir (Wesen ve ark., 1967; Bhutto ve ark., 2012; Alkan ve ark., 2014). Bhutto ve ark.'nın (2012) 240 inekten alınan örnekte subklinik mastitis teşhisi için CMT ve etken izolasyon sonuçlarını karşılaştırdıkları bir çalışmada, CMT ile negatif reaksiyon veren meme lobu süt örneklerinin %57,6'sında mikrobiyolojik üreme



belirlenmiştir. Aynı çalışmada araştırmacılar, CMT'de şüpheli olarak değerlendirilen meme loplarnın %64,9, +1 olarak derecelendirilen meme loplarnın %75,7 ve +2 ile derecelendirilen meme loplarnın ise %87,4 oranında infekte olduklarını bildirmişlerdir (Bhutto ve ark., 2012). Benzer şekilde, Türkiye'de CMT pozitif ve negatif meme loblarından örneklemenin yapıldığı bir çalışmada, CMT negatif meme loblarından %30,1 oranında bakteri izolasyonu gerçekleştirildiği belirtilmiştir (Alkan ve ark., 2014).

Bu çalışmada, 757 CMT pozitif ve 215 CMT negatif olmak üzere toplam 972 meme lobu süt örneği *Staphylococcus* türleri açısından incelendi. CMT'ye negatif reaksiyon veren meme lobu süt örneklerinden Stafilokokal mastitis patojenlerinin üreme oranı %32,97 olarak belirlendi. Bu oranın +1 ile skorlanan örneklerde %23,07, +2 ile derecelendirilenlerde %32,42 ve son olarak +3 ile nitelendirilen numunelerde %11,54 olduğu görüldü. Sunulan çalışmada, CMT'de reaksiyon vermeyen sütlerde Stafilokok türlerinin üreme oranı diğer çalışmalarla benzerlik göstermekle birlikte, CMT pozitif süt örneklerinden izolasyon oranlarının düşük olduğu belirlendi. Bunun nedeninin, diğer araştırmaların çalışmaya dahil ettikleri mastitis patojenlerinin çok çeşitli infeksiyöz ajanları içerirken, bu çalışmanın ise sadece *Staphylococcus* türlerinin mastitislerdeki etkisinin araştırılmasına yönelik olması ile ilişkili olabileceği düşünüldü. Ayrıca bazı araştırmacılar (Sargeant ve ark., 2001; Pyörälä, 2003; Shitandi ve Khumbu, 2004) tarafından da bildirildiği gibi, bu farklılıkların ortaya çıkmasında, CMT'nin spesifite ve sensitivitesinin değişken olabilmesi, özellikle farklı patojen tiplerinde duyarlılığının zayıf olmasından kaynaklanabileceği düşünüldü.

Sığırlarda mastitise neden olan etkenler arasında Stafilokok cinsine ait mikroorganizmalar önemli bir yer teşkil etmektedir (Bradley, 2002; Taponen ve ark., 2006; Tenhagen ve ark., 2006; Macun ve ark., 2011; Yeşilmen ve ark., 2012; Middleton, 2013; Cantekin ve ark., 2014). Bu nedenle, mastitisli hayvanlardan etkenlerin izolasyonları ve identifikasyonları ülkemiz dahil hemen hemen dünyanın her yerinde bilimsel çalışmalara sıkça konu olmuştur (Arshad ve ark., 2006; Macun ve ark., 2011; Yeşilmen ve ark., 2012; Hosseinzadeh ve Saei, 2014; Vishnupriya ve

ark., 2014). Stafilokokal mastitislerin etiyolojilerine yönelik yapılan bu çalışmalarda elde edilen veriler değişiklik göstermektedir. İran'da yapılan bir çalışmada, mastitisli hayvanlara ait 158 süt örneğinden 5'i *S. aureus*, 108'i KNS türü olmak üzere, toplam 113 (%71,5) *Staphylococcus* türü izole edildiği, KNS türleri arasında en yaygın izole edilen türlerinse *S. haemolyticus* (%40,7) ve *S. chromogenes* (%15,7) olduğu bildirilmiştir (Hosseinzadeh ve Saei, 2014). Arshad ve ark. (2006) Pakistan'da sığır ve manda mastitislerinin etiyolojilerine yönelik yaptıkları bir çalışmada, örneklenen 100 hayvanda Stafilokok prevalansını %36,67 (n=33 izolat) olarak bildirmişlerdir. Aynı çalışmada izole edilen 33 *Staphylococcus* türünün 23'ünün *S. aureus*, 10'unun ise *S. epidermidis* olduğu belirtilmiştir (Arshad ve ark., 2006). Yapılan bir başka çalışmada, 158 süt örneğinden 22'si KPS ve 74'ü KNS olmak üzere 96 *Staphylococcus* türü izole edildiği, KPS türlerinden 20'sinin *S. aureus*, 2'sinin ise *S. intermedius* olarak tanımlanmış olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada izole edilen KNS türleri ise; *S. epidermidis* (17), *Staphylococcus hominis* (8), *Staphylococcus lugdenensis* (6), *S. chromogenes* (6), *S. saccharolyticus* (5), *S. lentus* (5), *S. xylosus* (4), *S. simulans* (4), *S. haemolyticus* (4), *Staphylococcus auricularis* (3), *S. sciuri* (3), *Staphylococcus arlettae* (3), *Staphylococcus caprae* (2), *Staphylococcus caseolyticus* (2), *Staphylococcus capitis* (1) ve *S. cohnii* (1) olarak tanımlanmıştır (Vishnupriya ve ark., 2014). Ülkemizde de mastitisli hayvanlardan Stafilokokların izolasyonuna yönelik yapılan çalışmalarda farklı izolasyon oranları bildirilmiştir (Macun ve ark., 2011; Pehlivanoglu ve Yardımcı, 2012; Yeşilmen ve ark., 2012). Burdur ilinde yapılan bir çalışmada CMT pozitif numunelerden elde edilen 100 izolatta; 65 *S. aureus*, 17 *S. intermedius*, 4 *S. simulans*, 3 *S. chromogenes*, 3 *S. lugdenensis*, 3 *S. xylosus*, 2 *S. haemolyticus*, 1 *S. hominis* subsp. *hominis*, 1 *S. cohnii* ve 1 adet tanımlanamayan KNS suşu belirlenmiştir (Pehlivanoglu ve Yardımcı, 2012). Diyarbakır'da CMT pozitif subklinik mastitisli inekler üzerine yapılan bir başka çalışmada, toplam izolatların %24,63'ü *S. aureus*, %10,07'si *S. haemolyticus* ve %7,46'sı *S. epidermidis* olarak tanımlanmıştır (Yeşilmen ve ark., 2012). Benzer şekilde Macun ve ark. (2011), CMT pozitif olan 836 meme lobu süt örneğinden izole edilen *Staphylococcus* türlerini, *S. aureus* (%28,17), *S. haemolyticus* (%12,21), *S. simulans* (%8,92), *S. hominis* (%4,22) ve *S. capitis* (%3,75) olarak bildirmişlerdir (Macun ve ark., 2011).

Ödemiş merkez ve köylerinde gerçekleştirilen bu çalışmada, toplam 972 meme lobu süt örneğinden izole edilen 182 *Staphylococcus* izolatının 137 tanesi KPS (%75,27), 45 tanesi ise KNS (%24,73) olarak sınıflandırıldı. İzole edilen 11 farklı türün 60'ı (%32,97) *S. aureus*, 77'si (%42,30) *S. intermedius*, 20'si (%10,99) *S. saprophyticus*, 11'i (%6,04) *S. haemolyticus*, 5'i (%2,75) *S. simulans*, 3'ü (%1,65) *S. capitis*, 2'si (%1,10) *S. epidermidis* olarak belirlenirken, 1'er (%0,55) adet de *Staphylococcus schleiferi* subsp. *schleiferi*, *Staphylococcus kloosii*, *S. auricularis* ve *S. sciuri* identifiye edildi. Konu ile ilgili yapılmış diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında (Arshad ve ark., 2006; Macun ve ark., 2011; Yeşilmen ve ark., 2012; Hosseinzadeh ve Saei, 2014; Vishnupriya ve ark., 2014), izole edilen türler açısından benzerlikler olduğu belirlenirken, türlerin izolasyon oranları arasında farklılıklar bulunduğu saptandı. Sunulan çalışmada, özellikle *S. intermedius*'un izolasyon oranının, diğer araştırmacıların izolasyon oranı sonuçlarından yüksek olması dikkat çekiciydi. Taponen (2008), mastitisli hayvanlardan etken izolasyonuna yönelik çalışmalarda genellikle etkenlerin KPS olarak sınıflandırıldığını ve bu sınıflandırmada yer alan türlerin çoğunlukla ayırımına gidilmeden *S. aureus* olarak bildirildiğine dikkat çekmiştir. Taponen'in (2008) dikkat çektiği sınıflandırma eksikliği göz önüne alınarak, bu çalışmada elde edilen tüm KPS türlerinin tiplendirilmesinin, *S. intermedius*'a ilişkin elde edilen yüksek izolasyon oranını açıklayabilecek nitelikte olabileceği düşünüldü. Ayrıca, diğer çalışmalardan farklı olarak, sunulan çalışmada örneklemenin hem CMT pozitif, hem de CMT negatif meme loblarından yapılmış olmasının, *S. intermedius*'un, mastitislerde sıklıkla izole edilen ve major etken kabul edilen *S. aureus*'a göre daha yüksek oranda izole edilmesi ile ilişkili olabileceği düşünüldü. Bu çalışmada, KNS türleri arasında en çok izole edilen türün *S. saprophyticus* (n=20, %10,99) olması dikkat çekici bir diğer bulguydu. Etkenin, normal ahır şartlarında bulunabildiği (Taponen, 2008) ve daha önceleri önemsiz olarak kabul edilmesine rağmen, özellikle son yıllarda mastitis problemlili ineklerden izolasyonunda dikkate değer bir artışa sahip olduğu vurgulanmaktadır (Ergün ve ark., 2009; Thorberg ve ark., 2009; Cheng ve ark., 2010; Waller ve ark., 2011).

Süt yönlü yetiştiriciliğin en önemli ve maliyetli hastalıklarından olan mastitis, tedavisinde antibiyotiklerin önemli ölçüde kullanıldığı bir enfeksiyondur. Fakat antibiyotiklerin hatalı kullanımları etkenlerin kullanılan ilaca direnç geliştirmesine neden olmaktadır. Bu direnç mekanizmalarından birisi de son yıllarda üzerinde önemle durulan ve *mecA* geni tarafından kodlanan PBP2a sentezi ile ilişkilendirilen metisilin direncidir (Pinho ve ark., 2001; Gordon ve Lowy, 2008; Saldago, 2010). Mastitisli inek sütlerinden izole edilen Stafiloclarda metisilin direncinin PZR ile belirlenmesine yönelik çalışmalarda, izolatlarda farklı *mecA* geni pozitiflik oranları bildirilmiştir (Moon ve ark., 2007; Bal ve ark., 2010; Fessler ve ark., 2010a; Pehlivanoglu ve Yardımcı, 2012; Tel ve ark., 2012; Erdem ve Türkyılmaz, 2013; Ünal, 2013; Luini ve ark., 2015). Almanya’da yapılan bir araştırmada; mastitisli ineklerden izole edilen 121 KNS izolatından 15 (%12,39) tanesinin *mecA* genine sahip olduğu gösterilmiştir (Fessler ve ark., 2010a). Moon ve ark. (2007), 3407 mastitisli süt örneğinden izole edilen 835 *S. aureus* suşundan 13’ünde, 763 KNS suşundan ise 12’sinde *mecA* varlığı bildirmişlerdir. Luini ve ark. (2015), İtalya’nın farklı bölgelerinden örnekledikleri 1025 hayvana ait mastitisli süt örneklerinden izole ettikleri 163 *S. aureus* suşunda *mecA* pozitifliğini %9,2 (n=15) olarak rapor etmişlerdir. Benzer şekilde, Türkiye’de mastitisli sütlerden izole edilen KPS ve KNS türlerinde *mecA* varlığının belirlenmesine yönelik yapılan araştırma sonuçları da farklılık göstermektedir. Burdur ilinde yapılan bir çalışmada, 306 meme lobu süt örneğinden elde edilen 100 Stafilokok suşunun 20’si metisiline dirençli olarak bildirilmiştir (Pehlivanoglu ve Yardımcı, 2012). Erdem ve Türkyılmaz (2013), 145 mastitisli süt örneğinden izole ettikleri *S. aureus* suşlarının sadece 2’sinde *mecA* genine rastladıklarını vurgulamışlardır (Erdem ve Türkyılmaz, 2013). Başka bir çalışmada, süt örneklerinden izole edilen 69 KNS izolatında sadece bir tane *mecA* genine sahip KNS türü bulunduğu, bunun da *S. haemolyticus* olarak tiplendirildiği belirtilmiştir (Bal ve ark., 2010). Ünal (2013), 60 adet sığır subklinik mastitis orijinli *S. aureus* suşunda *mecA* genine rastladığı suş sayısını 2 olarak bildirirken, Tel ve ark. (2012) sığır mastitis orijinli 64 *S. aureus* izolatının hiç birinde *mecA* geni tespit edemediklerini belirtmişlerdir.

Sunulan çalışmada, süt örneklerinden ticari identifikasyon kiti kullanılarak tiplendirilen 182 Stafilokok izolatu için, cins spesifik 16S rDNA ve *mecA* genine spesifik primerlerin kullanıldığı ikili PZR uygulandı. 16S rDNA spesifik bantlar 182 *Staphylococcus* türünün tamamında saptanırken, izolatlardan 4'ünde (%2,2) *mecA* geni pozitifliği belirlendi. *mecA* genine sahip 4 Stafilokok türünün dördü de *S. intermedius*'tu. Buna göre, çalışmada izole edilen toplam 77 *S. intermedius* suşunda *mecA* pozitifliği %5,19 olarak tespit edildi. Bu çalışmada elde edilen bu bulgu oldukça dikkat çekiciydi. Çünkü, yapılan kapsamlı literatür taramalarında, genotipik olarak metisiline dirençli *S. intermedius* bildirimini sadece Kore'de yapılan bir çalışmada belirlendi. Moon ve ark. (2007) tarafından yapılan bu çalışmada, metisiline dirençli 20 suşun sadece bir tanesinin *S. intermedius* olduğu bildirilmiştir (Moon ve ark., 2007). Türkiye'de ise, metisiline dirençli *S. intermedius* bildirimini yapıldığı bir araştırma bulgusuna rastlanmadı. Çalışmada elde edilen bu farklı verinin, Taponen'in (2008) de vurguladığı gibi, mastitisli hayvanlardan etken izolasyonuna yönelik çalışmalarda genellikle etkenlerin KPS olarak sınıflandırılması, KPS türleri arasında da çoğunlukla *S. aureus*'un tiplendirilmesi ile ilişkili olabileceği düşünüldü. Genel olarak bakıldığında, bu çalışmada saptanan %2,2'lik *mecA* pozitifliği, konu ile ilgili diğer araştırmacıların bildirdiği pozitiflik oranlarından düşüktü. Bu farklılığın ortaya çıkmasında, bölgesel farklılıklar ve izole edilen suş farklılıklarının yanı sıra, bölgede mastitislerin sağaltımına yönelik antibiyotik uygulamalarının geçerli ve kontrollü şekilde uygulanmasının da etkili olabileceği düşünüldü. Çünkü konuyla ilgili bölge veteriner hekimleriyle yapılan görüşmelerde, mastitis vakalarında antibiyogram uygulamasının yaygın olarak kullanıldığı, kullanılan antibiyotiklerin bölge florasıyla uyumlu, sinerjik etkili kombinasyonlar olduğu, uygun doz ve uygun sürede akılcı uygulandığı ve veteriner hekimler tarafından infeksiyon takibinin yapıldığı öğrenildi. Ayrıca, sütçü sürülerde düzenli olarak mastitis aşılarının yapıldığı ve sıklıkla meme infeksiyonu geçiren hayvanların sürüden çıkarıldığı bilgileri de edinildi.

Stafilokok infeksiyonlarının patogeneğinde etkili olduğu bilinen pek çok virulens faktörü arasında en önemlilerinden biri olarak düşünülen toksin Panton-Valentine Lökosidin (PVL) toksinidir (Lina ve ark., 1999; Gillet ve ark., 2002;

Vandenesch ve ark., 2003; Lo ve Wang, 2011). Bu toksini kodladığı bilinen *pvl* geni, mastitisli ineklerden izole edilen *S. aureus* izolatlarında değişik oranlarda belirlenmiştir (Fueyo ve ark., 2005; Zecconi ve ark., 2006; Fessler ve ark., 2010b; Ikawaty ve ark., 2010; Benhamed ve Kihal, 2013; Erdem ve Türkyılmaz, 2013; Ünal, 2013). PVL toksinin inek mastitislerinin patogenezinde anahtar rol oynayabileceğine dikkat çeken araştırmacılar olduğu gibi (Wang ve ark., 2011), bazı araştırmacılar da subklinik mastitislerin patogenezinde sanıldığı kadar önemli olmadığını vurgulamıştır (Ünal, 2013). Zecconi ve ark. (2006) inceledikleri *S. aureus* izolatlarında *pvl* geni pozitifliğini %56 olarak bildirirken, Fueyo ve ark. (2005) subklinik mastitisli inek sütlerinden izole ettikleri *S. aureus* suşlarının hiçbirinin *pvl* geni taşımadığını vurgulamışlardır. Ikawaty ve ark. (2010) tarafından Hollanda'da mastitisli sığır sütlerinden izole edilen 76 *S. aureus* suşunun hiç birinde *pvl* genine rastlanmadığı bildirilmiştir. Benzer şekilde, Almanya'da yapılan bir araştırmada klinik mastitisli ineklerden izole edilen 25 MRSA suşunda *pvl* geni tespit edilemediği belirtilmiştir (Fessler ve ark., 2010b). Ülkemizde yapılan araştırmalardan birinde, subklinik mastitisli inek sütlerinden izole edilen *S. aureus* suşlarında *pvl* toksin geni pozitifliği %6,6 olarak saptanmış ve PVL toksinin subklinik mastitislerin patogenezinde önemli bir role sahip olmayabileceği belirtilmiştir (Ünal,2013). Türkyılmaz ve ark. (2010), Aydın'da MRSA olarak belirledikleri 16 izolatın hiç birinde *pvl* pozitifliği saptamadıklarını bildirmişlerdir. Benzer şekilde Erdem ve Türkyılmaz (2013), 145 mastitisli süt örneğinden izole ettikleri 2 MRSA suşunun da *pvl* toksin genine sahip olmadığını belirtmişlerdir.

Sunulan çalışmada, izole edilen 182 Stafilokok izolatında PZR tekniğiyle *pvl* geni araştırıldı. Ancak, izolatların hiçbirinde *pvl* toksin genine rastlanmadı. Elde edilen bu sonuca göre, PVL'nin örnekleme yapıldığı bölge açısından subklinik mastitislerin patogenezisinde aktif bir rol oynamayabileceği düşünüldü.

Metisiline karşı direnç, tüm beta laktam grubu antibiyotiklere direncin genel ifadesi olarak kabul görmektedir (Lowy, 2003; CLSI, 2007; Saldago, 2010). Ayrıca, MRS suşlarında beta laktam antibiyotiklere direnç dışında saptanan çoklu antibiyotik direnci, bu etkenlere bağlı infeksiyonların sağaltımında tedavi seçeneklerini

sınırlayan bir sorun olarak görülmektedir (Lowy, 2003; Saldago, 2010). Mastitisli sütlerden izole edilen MRS türlerinde antibiyotik dirençliliklerinin araştırıldığı çeşitli çalışmalarda, test edilen farklı antibiyotiklere karşı direnç oranları değişiklik göstermekle birlikte, bu çalışmaların çoğunda izolatların çoklu antibiyotik direncine sahip oldukları görülmektedir (Kaynarca ve Türkyılmaz, 2010; Vanderhaeghen ve ark., 2010; Kreausukon ve ark., 2012) Kreausukon ve ark. (2012) 36 MRSA izolatının tamamının oksasilin ve tetrasikline dirençli olduğunu belirtmiş, ayrıca klindamisin eritromisin, kanamisin ve siprofloksasine dirençlilik oranlarını sırasıyla %58,3, %19, %10 ve %8,3 olarak belirlediklerini bildirmişlerdir. Belçika’da yapılan bir çalışmada subklinik mastitis orijinli 11 adet MRSA izolatının tamamının tetrasikline, dokuzunun trimetoprim-sulfametoksazola, yedisinin linkomisine, ikisinin ise siprofloksasine dirençli olduğu rapor edilmiştir (Vanderhaeghen ve ark., 2010). Kaynarca ve Türkyılmaz (2010), çalışmalarında izole ettikleri 16 MRSA suşunun %25’inin neomisine, %56,2’sinin enrofloksasine, %68,8’inin tetrasikline, %68,8’inin sefoperazona, %68,8’inin amoksisilin+klavulanik asite, %75’inin gentamisine, %75’inin ampisiline, %87,5’inin penisiline dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, *mecA* genine sahip izolatların hepsinde çoklu antibiyotik direnci saptandığı vurgulanmıştır (Kaynarca ve Türkyılmaz, 2010).

Bu çalışmada *mecA* geni taşıyan 4 adet *S. intermedius* izolatının Türkiye’de yaygın olarak kullanılan çeşitli antibiyotiklere dirençlilikleri Kirby-Bauer disk difüzyon testi kullanılarak araştırıldı. Test sonuçlarına göre, MR *S. intermedius* suşlarının tamamında penisilin G, oksasilin ve sefoksitine direnç tespit edildi. İzolatlarda test edilen diğer antibiyotiklere direnç oranları ise eritromisine %50, rifampisin, gentamisin, tetrasiklin ve trimetoprim+sulfametaksazole karşı ise %25 olarak belirlendi. MR suşların 2’sinde üç antibiyotiğe, 1’inde altı antibiyotiğe, 1’inde de beş antibiyotiğe karşı direnç gözlemlendi (Tablo 3.3). Elde edilen direnç oranları diğer araştırmacıların bulgularıyla karşılaştırıldığında, benzerlikler yanında farklılıkların da olduğu görüldü. Bu farklılıkların, test edilen izolat sayısı, izolatların orijin aldığı bölgesel farklılıklar ve metisilin direncinin belirlendiği tür farklılıklarıyla ilişkili olabileceği düşünüldü.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

İzmir ili Ödemiş ilçesi ve köylerinde sığır mastitislerinin Stafilokok türlerine bağlı etiyolojilerinin, izole edilen türlerde metisilin dirençliliği ve önemli virulens faktörlerinden PVL toksin varlığının araştırılması amacıyla yapılan bu çalışmada; örnek alınan 251 adet ineğin 120'sinde (%47,8) en az bir Stafilokok türü teşhis edildi. Stafilokokların biyotiplendirmesinde 11 farklı tür izole edildi ve hem KPS'lerin (%75,27) hem de KNS'lerin (%24,73) örneklenen hayvanlar açısından mastitisin etiyolojisinde önemli olduğunu görüldü. İzole edilen KPS'ler arasında *S. intermedius*'un izolasyon oranının (%42,30) *S. aureus* izolasyon oranından (%32,97) yüksek olması dikkat çekiciydi. Bu durum, bölge florasında diğer KPS olan *S. aureus* kadar *S. intermedius*'un da yaygın olabileceğini düşündürdü. Çalışmada izole edilen KNS'ler arasında ise en yüksek izolasyon oranına sahip türler *S. saprophyticus* (%10,99) ve *S. haemolyticus* (%6,04) olarak belirlendi.

PZR ile *mecA* varlığını araştırdığımız suşlar arasında, geni taşıyan 4 suşun da *S. intermedius* olduğu belirlendi. Yapılan kapsamlı literatür taramalarında Türkiye'deki araştırmalarda *mecA* pozitif *S. intermedius*'un bildirilmediği görüldü. Bu çalışmada elde edilen bu bulgunun, araştırmaya ayrıca anlam kattığı düşünülüyor. Çalışmada, izole edilen suşlarda Stafilokoklar için önemli virulens faktörlerinden olan PVL toksin varlığı da genotipik olarak araştırıldı. Ancak, test edilen suşların hiçbirinde *pvl* genine rastlanmadı. Bu anlamda PVL toksin varlığının araştırmanın yapıldığı zamanda ve bölgede subklinik mastitislerin patogenezinde önemli bir rolü olmayabileceği kanısına varıldı.

Çalışmada, metisiline dirençli olduğu belirlenen suşlarda, ülkemizde mastitislerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan çeşitli antibiyotiklere karşı dirençlilik durumları da incelendi. Böylece, örneklemin yapıldığı bölgedeki hayvanlardan izole edilen suşlarda fenotipik antibiyotik dirençlilik profili de ortaya



konmuş oldu. Buna göre, MR *S. intermedius* suşlarının 2'sinde üç antibiyotiğe, 1'inde altı antibiyotiğe, 1'inde ise beş antibiyotiğe karşı direnç gözlemlendi.

Sunulan çalışmada, CMT pozitif meme loblarının yanı sıra CMT negatif meme loblarından da Stafilokok izolasyonu gerçekleştirilmesi nedeniyle, hayvanlarda mastitislerin, özellikle de subklinik mastitislerin, teşhisinde CMT uygulamalarına ek olarak mutlaka bakteriyolojik identifikasyonun yapılmasının gerekli ve daha yararlı olabileceği düşünüldü. Çalışmada, *mecA* geni taşıyan izolatların sayısının az olması bölge için sevindirici bir sonuçtu. Bu sonucun, bölge veteriner hekimlerinin ve yetiştiricilerin mastitis koruma programlarını takip etmesi, gereksiz antibiyotik kullanımından kaçınması, sürülerde mastitis aşularının kullanılması ve sık sık meme infeksiyonu geçiren ineklerin sürüden çıkarılması ile ilişkili olabileceği düşünüldü. Bakterilerde direnç artışı ile spesifik olmayan antibiyotik kullanımı arasında paralel bir bağlantı olması dikkate alındığında, doğru vakaya, uygun dozda ve sürede doğru antibiyotiğin kullanılması önem taşımaktadır. Bu sebeple, tür bazında etken izolasyonu ve identifikasyonu gerçekleştirilerek, akılcı antibiyotik kullanımı için antibiyogram uygulamalarının yapılması ve devamlılığının sağlanmasının gerekli ve önemli olduğu düşünüldü. Ayrıca, sunulan çalışmanın, yapıldığı bölge için ilk araştırma olması nedeniyle, Türkiye'de konu ile ilişkili gelecekte yapılacak çalışmalar için önemli bir veri kaynağı olacağı da düşünülmektedir.

## ÖZET

### Sığır Mastitislerinden İzole Edilen Stafilocoklarda Metisilin Direnci ve Panton-Valentine Lökosidin Varlığının Araştırılması

Bu çalışmada, mastitisli ineklerden Stafilocok türlerinin izolasyonu, izole edilen türlerde *mecA* ve *pvl* genlerinin PZR ile araştırılması ve metisilin direnci belirlenen suşların veteriner sahada yaygın olarak kullanılan çeşitli antibiyotiklere dirençliliklerinin belirlenmesi amaçlandı. Sunulan çalışmada, İzmir ili Ödemiş ilçesi merkez ve köylerinde bulunan 34 farklı küçük (aile tipi), orta ya da büyük ölçekli işletmelerden, laktasyonun farklı dönemlerinde olan 251 baş sağmal inekten alınan 972 meme lobu süt örneği kullanıldı. Her bir meme lobuna uygulanan CMT sonrasında, 757 meme lobu süt örneğinin CMT'ye pozitif reaksiyon verirken, 215 meme lobu süt örneğinin ise negatif reaksiyon verdiği belirlendi. CMT pozitif ve negatif 972 meme lobu süt örneğinden toplam 182 (%18,72) *Staphylococcus* suşu izole ve identifiye edildi. Örneklenen 251 adet ineğin 120'sinin (%47,8) en az bir Stafilocok türü ile infekte olduğu belirlendi. İdentifiye edilen 182 adet Stafilocok suşunun 137'sinin (%75,27) KPS türü, 45'inin (%24,73) ise KNS türü olduğu belirlendi. Çalışmada toplam 11 farklı Stafilocok türü izole edildi. Türler arasında en yüksek izolasyon oranına sahip tür *S. intermedius* (%42,30) olarak belirlenirken, bunu; *S. aureus* (%32,97) ve *S. saprophyticus*'a (%10,99) ait izolasyon oranları izledi. 182 adet Stafilocok izolatından 4'ünün (%2,2) ise *mecA* geni taşıdığı belirlendi. *mecA* genine sahip 4 Stafilocok türünün dördü de *S. intermedius*'tu. PVL toksin varlığının da araştırıldığı çalışmada, suşların hiç birinde *pvl* toksin genine rastlanmadı. Metisiline dirençli 4 *S. intermedius* suşunun, veteriner sahada yaygın olarak kullanılan çeşitli antibiyotiklere dirençlilikleri Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak araştırıldı. Buna göre; *mecA* pozitif 4 *S. intermedius* suşunun tümü penisilin G, oksasilin ve sefoksitine dirençli idi. Ayrıca izolatlarda eritromisine %50, rifampisin, gentamisin, tetrasiklin ve trimetoprim/sulfametaksazole karşı ise %25 oranlarında direnç tespit edildi.

**Anahtar Sözcükler:** Antimikrobiyal direnç, mastitis, metisilin direnci, Panton-Valentine lökosidin, *Staphylococcus* spp.

## SUMMARY

### **Investigation of methicillin resistance and Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococci* isolated from bovine mastitis**

The aim of this study was to isolate the *Staphylococcus* species from bovine mastitis, investigate the *mecA* ve *pvl* genes in isolated species by PCR and determine the antibiotic resistance of methicillin resistant strains to some antibiotics commonly used in veterinary field. In the present study, 972 mammary quarter milk samples were used from 251 lactating cows from 34 different small (family type), mid and large-sized enterprises located center town and villages of Ödemiş, İzmir. After CMT was applied to each mammary quarter, 757 mammary quarter milk samples were found to be CMT positive and 215 mammary quarter milk samples were found to be CMT negative. A total of 182 (18.72%) *Staphylococcus* strains were isolated from 972 mammary quarter milk samples CMT positive and negative. It was determined that 120 (47.8%) of 251 cows were infected with the least one *Staphylococcus* species. Of 182 *Staphylococcus* strains, 137 (75.27%) and 45 (24.73%) were detected as KPS and KNS, respectively. The different 11 *Staphylococcus* species were isolated in this study. Among the species, *S. intermedius* (42.30%) was the most common species isolated, followed by *S. aureus* (32.97%) and *S. saprophyticus* (10.99%). It was found that 4 (2.2%) of 182 *Staphylococcus* strains harboured *mecA* gene and *mecA* positive 4 strains were *S. intermedius*. In this study investigating the presence of PVL toxin, *pvl* toxin gene was found in none of the strains. Antibiotic resistance of 4 methicillin resistant *S. intermedius* strains to antibiotics commonly used in veterinary medicine were investigated using Kirby-Bauer disc diffusion test. According to test results, all of 4 *mecA* positive *S. intermedius* were resistant to penicillin G, oxacillin and cefoxitine. The resistance was also found to erythromycin (50%), rifampicin (25%), gentamicin (25%), tetracycline (25%) and trimethoprim/sulfamethoxazole (25%) in the isolates.

**Key words:** Antimicrobial resistance, mastitis, methicillin resistance, Panton-Valentine leukocidin, *Staphylococcus* spp.

## KAYNAKLAR

- AK, S. (2000). Trakya yöresinde sığır mastitisinden sorumlu bulaşıcı ve çevresel bakteriyel etkenler ve antibiyotiklere duyarlılıkları, *Istanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **26(2)**:353-365.
- AKAN, M. (2006). *Staphylococcus* İnfeksiyonları, In: *Veteriner Mikrobiyoloji(Bakteriyel Hastalıklar)*. Ed.: AYDIN, N., PARACIKOĞLU J. İlke-Emek Yayınları, Ankara, sy. 6-12.
- AKINEDEN, Ö., ANNEMÜLLER, C., HASSAN, A.A., LÄMMLER, C., WOLTER, W., ZSCHÖCK, M. (2001). Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **8(5)**: 959-964.
- ALBENZIO, M., TAIBI, L., MUSCIO, A., SEVI, A. (2002). Prevalence and etiology of subclinical mastitis in intensively managed flocs and related changes in the yield and quality of ewe milk. *Small Ruminant Research*, **43**: 219-226.
- ALKAN, H., BAŞTAN, A., SALAR, S., ÖZDAL, M., KAYMAZ, M. (2014). Kuru döneme çıkarken enfekte ve sağlıklı meme loblarında California Mastitis Test ve somatik hücre sayısı ile bakteriyolojik muayene sonuçlarının karşılaştırılması. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **61**: 179-183.
- ALTEMEIER, W.A., LEWIS, S., BRACKETT, K. (1981). The versatile *Staphylococcus*. In: *The Staphylococci*. Ed.: MACDONALD, A., SMITH, G. Proceedings of the Alexander Ogston Centennial Conference. Aberdeen University Press, pp. 125-148.
- ARDA, M. (2011). Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayınları, Ankara, sy. 235-254.
- ARSHAD, M., MUHAMMAD, G., SIDDIQUE, M., ASHRAF, M., KHAN, H.A. (2006). Staphylococcal mastitis in bovines and some properties of Staphylococcal isolates. *Pakistan Veterinary Journal*, **26**: 20-22.
- BAL, E.B.B., BAYAR, S. , BAL, M.A. (2010). Antimicrobial susceptibilities of coagulase-negative *Staphylococci* (CNS) and *Streptococci* from bovine subclinical mastitis cases. *The Journal of Microbiology* (2010) **48(3)**: 267-274.
- BALABAN, N., RASOOLY, A. (2000). Review: Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, **61(1)**: 1–10.
- BARRIO, M.B., RAINARD, P., PRÉVOST, G. (2006). LukM/LukF-PV is the most active *Staphylococcus aureus* leukotoxin on bovine neutrophils, *Microbes and Infection*, **8**: 2068-2074.
- BAŞTAN, A. (2007). İneklerde Meme Hastalıkları, 2. Baskı. Hatipoğlu Yayınevi, Ankara.
- BENHAMED, N., KIHAL, M. (2013). Biodiversity of molecular profile of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis cases in West Algeria. *Journal of Bacteriology Research*, **5(4)**: 41-45.
- BHUTTO, A.L., MURRAY, R.D., WOLDEHIWET, Z. (2012). California mastitis test scores as indicators of subclinical intra-mammary infections at the end of lactation in dairy cows. *Research in Veterinary Science*, **92**: 13–17.
- BLOWEY, R., EDMONDSON, P. (2010). Mastitis Control in Dairy Herds, 2nd Edition. CAB International, Oxfordshire, UK.

- BOYLE-VAVRA, S., DAUM, R.S. (2007). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: The role of Pantone–Valentine leukocidin. *Laboratory Investigation*, **87**: 3–9.
- BRADLEY, A.J. (2002). Bovine mastitis: An evolving disease. *Veterinary Journal*, **164**: 116–128.
- BROWN, M. (1999). The Gram positive bacteria: Staphylococci. In: *VEM 5141 Veterinary Microbiology Laboratory Textbook*. University of Florida, USA. p.: 32–41.
- CANTEKİN, Z., SAIDI, R., SOLMAZ, H., ERGUN, Y. (2014). Sığır mastitis süt örneklerinden Stafilokok türlerinin ve *Staphylococcus aureus* ‘un teşhisine yönelik ikili bir PZR tekniği. *Yüzüncü Yıl Veteriner Fakültesi Dergisi*, **25(1)**:11-13.
- CHAMBERS, H.F. (1997). Methicillin resistance in Staphylococci: Molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clinical Microbiology Reviews*, **10**: 781-791.
- CHAMBERS, H.F. (2001). The epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerging Infectious Diseases*, **7**: 178-182.
- CHENG, D.R., ZHU, S.Y., YIN, Z.H., DING, W.W., MU, Z.X., SU, Z.R., SUN, H.C. (2010). Prevalence of bacterial infection responsible for bovine mastitis. *African Journal of Microbiology Research*, **4 (11)**:1110-1116.
- CHOI, S.M., KIM, S.H., KIM, H.J., LEE, D.G., CHOI, J.H., YOO, J.H., KANG, J.H., SHIN, W.S., KANG, M.W. (2003). Multiplex PCR for detection of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes and methicillin resistance among *Staphylococcus* species. *Journal of Korean Medical Science*, **18**: 631-636.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2007). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 17th informational supplement*. CLSI Document M100-S17. Wayne, PA.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2013). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-third informational supplement*. CLSI Document M100-S23. Wayne, PA.
- DEGO, O.K., DIJK, J.E., NEDERBRAGT, H. (2002). Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion: A review. *Veterinary Quarterly*, **24(4)**: 181-198.
- DEVRIESE, L.A., VANDAMME, L.R., FAMEREE, L. (1972). Methicillin (cloxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*, **19**: 598-605.
- DINGES, M.M., ORVIN, P.M., SCLIEVERT, P.M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*, **13**: 16-34.
- EBRAHIMI, A., TAHERI, A.M. (2009). Characteristic of Staphylococci isolated from clinical and subclinical mastitis cows in Shahrekord, Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research*, **10(3)**: 273-277.
- ENRIGHT, M.C., ROBINSON, D.A., RANDLE, G., FEIL, E.J., GRUNDMANN, H., SPRATT, B.G. (2002). The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, **(99)**: 7687-7692.
- ERDEM, Z., TÜRKYILMAZ, S. (2013). Molecular typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows and farm workers. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **19 (6)**: 963-968.

- ERGÜN, Y., ASLANTAŞ, Ö, DOĞRUER, G., KİREÇCİ, E., SARIBAYI, M.K., ATEŞ, C.T., ÜLKÜ, A., DEMİR, C. (2009). Prevalence and etiology of subclinical mastitis in awassi dairy ewes in Southern Turkey. *The Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* , **33(6)**: 477-483.
- FESSLER, A., BILLERBECK, C., KADLEC, K., SCHWARZ, S. (2010a). Identification and characterization of methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococci from bovine mastitis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **6**:1-7.
- FESSLER, A., SCOTT, C., KADLEC, K., EHRLICH, R., MONECKE, S., SCHWARZ, S. (2010b). Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* , **65**: 619–625.
- FITZGERALD, J.R., HARTIGAN, P.J., MEANEY, W.J., SMYTH, C.J. (2000). Molecular population and virulence factor analysis of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infection. *Journal of Applied Microbiology*, **88**: 1028-1037.
- FREY, Y., RODRIGUEZ, J.P., THOMANN, A., SCHWENDENER, S., PERRETEN, V. (2013). Genetic characterization of antimicrobial resistance in coagulase-negative Staphylococci from bovine mastitis milk. *Journal of Dairy Science*, **96**: 2247–2257.
- FUDA, C.C.S., FISHER, J.F., MOBASHERY, S. (2005).  $\beta$ -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: The adaptive resistance of a plastic genome. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **62**: 2617-2633.
- FUEYO, J.M., MENDOZA, M.C., RODICIO, M.R., MUÑIZ, J., ALVAREZ, M.A., MARTÍN, M.C. (2005). Cytotoxin and pyrogenic toxin superantigen gene profiles of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical mastitis in dairy cows and relationships with macrorestriction genomic profiles. *Journal of Clinical Microbiology*, **43(3)**: 1278-1284.
- GARIPCIN, M., SEKER, E. (2015). Nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in cattle and farm workers in Turkey. *Veterinarski Arhiv*, **85**: 117-129.
- GENTILINI, E., DENAMIEL, G., BETANCOR, A., REBUELTO, M., RODRIGUEZ, M., de TORREST, R.A. (2002). Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative Staphylococci isolated from bovine mastitis in Argentina. *Journal of Dairy Science*, **85**: 1913-1917.
- GIANNECHINI, R.E., CONCHA, C., FRANKLIN, A. (2002). Antimicrobial susceptibility of udder pathogens isolated from dairy herds in the West Littoral Region of Uruguay. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **43**: 31-41.
- GILLESPIE, B.E., HEADRICK, S.I., BOONYAYATRA, S., OLIVER, S.P. (2009). Prevalence and persistence of coagulase-negative *Staphylococcus* species in three dairy research herds. *Veterinary Microbiology*, **134** : 65-72.
- GILLET, Y., ISSARTEL, B., VANHEMS, P., FOURNET, J.C., LINA, G., BES, M., VANDENESCH, F., PIEMONT, Y., BROUSSE, N., FLORET, D., ETIENNE, J. (2002). Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Pantone-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet*, **359**: 753-759.
- GINDONIS, V., TAPONEN, S., MYLLYNIEMI, A., PYÖRÄLÄ, S., NYKÄSENOJA, S., SALMENLINNA, S., LINDHOLM, L., RANTALA, M. (2013). Occurrence and characterization of methicillin-resistant Staphylococci from bovine mastitis milk samples in Finland. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **55**: 1-8.
- GLENNY, A.T., STEVENS, N.F. (1935). Staphylococcal toxins and antitoxins. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, **40**: 201-210.

- GORDON, R.J., LOWY, F.D. (2008). Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Clinical Infectious Disease*, **46**: 350-359.
- GREEN, M.J., GREEN, L.E., BRADLEY, A.J., BURTON, P.R., SCHUKKEN, Y.H., MEDLEY, G.F. (2005). Prevalence and associations between bacterial isolates from dry mammary glands of dairy cows. *Veterinary Record*, **156**: 71-77.
- GRÖHN, Y.T., WILSON, D.J., GONZÁLES, R.N., HERTL, J.A., SCHULTE, H., BENNETT, G., SCHUKKEN, Y.H. (2004). Effect of pathogen-specific clinical mastitis on milk yield in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, **87**: 3358-3374.
- HALASA, T., HUIJPS, K., ØSTRERÅS, O., HOGEVEEN, H. (2007). Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Veterinary Quarterly*, **29**: 18-31.
- HARRISON, E.M., WEINERT, L.a., HOLDEN, M.T.G., WELCH, J.J., WILSON, K., MORGAN, F.J.E., HARRIS, S.R., LOEFFLER, A., BOAG, A.K., PEACOCK, S.J., PATERSON, G.K., WALLER, A.S., PARKHILL, J., HOLMESA, M.A. (2014). A shared population of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 15 circulates in humans and companion animals. *American Society for Microbiology*, **5**: e00985-13.
- HATA, E., KATSUDA, K., KOBAYASHI, H., NISHIMORI, K., UCHIDA, I., HIGASHIDE, M., ISHIKAWA, E. (2008). Bacteriological characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from human and bulk milk. *Journal of Dairy Science*, **91**: 564-569.
- HIRAMATSU, K., CUI, L., KURODA, M., ITO, T. (2001). The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*, **9**: 486-493.
- HOGEVEEN, H., HUIJPS, K., LAM, T.J.G.M. (2011). Economic aspects of mastitis. *New Zealand Veterinary Journal*, **59(1)**:16-23.
- HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T., WILLIAMS, S.T. (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- HOSSEINZADEH, S., SAEI, H.D. (2014). Staphylococcal species associated with bovine mastitis in the North West of Iran: Emerging of coagulase negative-staphylococci. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, **2**: 27-34.
- HUBER, H., KOLLER, S., GIEZENDANNER, N., STEPHAN, R., ZWEIFEL, C. (2010). Prevalance and characteristics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in humans in contact with farm animals, in livestock and in food of animal origin, Switzerland, 2009. *Eurosurveillance*, **15**: pii: 19542.
- HUBER, H., ZIEGLER, D., PFLUGER, V., VOGEL, G., ZWEIFEL, C., STEPHAN, R. (2011). Prevalance and characteristics of methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococci from livestock, chicken carcasses, bulk tank milk, minced meat and contact persons. *Veterinary Research*, **7**:6.
- IDF. (1987). International Dairy Federation. Bovine mastitis. Definition and guidelines for diagnosis. IDF Bull. No: 211/1987. IDF 41, Square Vergote B-1040, Brusells, Belgium.
- IKAWATY, R., BROUWER, E.C., WAN DUIRSKEREN, E., MEVIUS, D., VERHOEF, J. (2010). Virulence factors of genotyped bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates in the Netherlands. *International Journal of Dairy Science*, **5(2)**: 60-70.
- JACOBY, G.A., ARCHER, G.L. (1991). New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *New England Journal of Medicine*. **324**: 601-612.

- JARP, J. (1991). Classification of coagulase-negative Staphylococci isolated from bovine clinical and subclinical mastitis. *Veterinary Microbiology*, **27**: 151–158.
- JEVONS, M.P.(1961). Celbenin-resistant Staphylococci. *British Medical Journal*, **124**: 124-126.
- KALI WAL, B.B., SADASHIV, S.O., KURJOGI, M.M., SANAKAL, R.D. (2011). Prevalance and antimicrobial susceptibility of coagulase-negative Staphylococci isolated from bovine mastitis. *Veterinary World*, **4(4)**:158-161.
- KANEKO, J., KAMIO, Y. (2004). Review: Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: Structures, pore-forming mechanisms and organization of the genes. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **68(5)**: 981-1003.
- KAYNARCA, S., TÜRKYILMAZ, S. (2010). Sığır mastitislerinden izole edilen Stafilokoklarda metisilin direnci ve slaym pozitifliği. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **16(4)**: 567-572.
- KIRBY, W.M.M. (1944). Extraction of a highly potent penicilin inactivator from penicilin resistant Staphylococci. *Science*, **99**: 452-453.
- KLOOS, W.E., BANNERMAN, T.L. (1994). Update on clinical significance of coagulase-negative Staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*, **7**: 117-140.
- KOSSAIBATI, M.A. (2000). The costs of clinical mastitis in UK dairy herds. *Cattle Practice*, **8**: 323-328.
- KRAUSE, M., CAVACO, L. (2009). Laboratory Protocols MRSA Training Course Isolation of MRSA from Dust Samples. *DTU National Food Institute*, 2nd Ed. March 2009, 1-10.
- KREASUKON, K., FETSCH, A., KRAUSHAAR, B., ALT, K., MULLER, K., KROMBER, V., ZESSIN, K.H., KÄSBOHRER, A., TENHAGEN, B.A. (2012). Prevalence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from bulk tank milk of dairy herds. *Journal of Dairy Science*, **95**:4382-4388.
- LINA, G., PIEMONT, Y., GODAIL-GAMOT, F., BES, M., PETER, M., GAUDUCHON, V., VANDENESCH, F., ETIENNE, J. (1999). Involvement of Pantone–Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia, *Clinical Infectious Diseases*, **29**: 1128-1132.
- LIU, G.Y. (2009). Molecular pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infection. *Pediatric Research*, **65**: 71-77.
- LO, W., WANG, C. (2011). Pantone-Valentine leukocidin in the pathogenesis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Pediatrics and Neonatology*, **52**: 59-65.
- LOEFFLER, D.A., SCHAT, K.A., NORCROSS, N.L. (1986). Use of <sup>51</sup>Cr release to measure the cytotoxic effects of Staphylococcal leukocidin and toxin neutralization on bovine leukocytes, *Journal of Clinical Microbiology*, **23(3)**: 416-420.
- LOWY, F.D. (2003). Antimicrobial resistance: The example of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*, **111**: 1265-1273.
- LUINI, M., CREMONESI, P., MAGRO, G., BIANCHINI, V., MINOZZI, G., CASTIGLIONI, B., PICCININI, R. (2015). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is associated with low within-herd prevalence of intra-mammary infections in dairy cows: Genotyping of isolates *Veterinary Microbiology*, **178**: 270-274.



- MACUN, H.C., YAĞCI, İ.P., ÜNAL, N., KALENDER, H., SAKARYA, F., YILDIRIM, M. (2011). Kırıkkale’de belirlenen subklinik mastitisli ineklerde etken izolasyonu ve antibiyotik direnç durumu. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **8**: 83-89.
- McDOUGAL, L., THORNSBERRY, C. (1986). The role of  $\beta$ -lactamase in Staphylococcal resistance to penicillinase resistant penicillins and cephalosporins, *Journal of Clinical Microbiology*, **23**: 832-839.
- MIDDLETON, J.R. (2013). *Staphylococcus mastitis*: Have we learned anything in the last 50 years? NMC Regional Meeting Proceedings, 1-8.
- MOON, J.S., LEE, A.R., KANG, H.M., LEE, E.S., KIM, M.N., PAIK, Y.H., PARK, Y.H., JOO, Y.S., KOO, H.C. (2007). Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant Staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea, *Journal of Dairy Science*, **90**:1176–1185.
- MORGAN, M. (2008). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and animals: Zoonosis or humanosis? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **62(6)**:1181-1187.
- MONTANARI, M.P., TONIN, E., BIAVASCO, F., VARALDO, P.E. (1990). Further characterization of borderline methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and analysis of penicillin-binding proteins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **34**: 911-913.
- MULLIGAN, M.E., MURRAY, K.A., STANDIFORD, H.C., JOHN, J.F., KAUFFMAN, C.A., YU, V.L. (1993). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A consensus review of the microbiology, pathogenesis, and epidemiology with implications for prevention and management. *American Journal of Medicine*, **94**: 313-328.
- MYLLYS, V. (1995). Staphylococci in heifer mastitis before and after parturition. *Journal of Dairy Research*, **(62)**: 51–60.
- NATIONAL MASTITIS COUNCIL. (1996). Current concepts of bovine mastitis. Fourth Edition. NMC 2820 Walton Commons West Madison, WI 53704.
- PARK, S.Y., SON, J.S., OH, I.H., CHOI, J.M., LEE, M.S. (2011). Clinical impact of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia on propensity scores. *Infection*, **39**: 141-147.
- PEACOCK, S. (2006). *Staphylococcus aureus*. In: *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*. Ed.: GILLESPIE, S.H., HAWKEY, P.M., JOHN WILEY&SONS Ltd., England, pp. 73-98.
- PEHLİVANOĞLU, F., YARDIMCI, H. (2012). Detection of methicillin and vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk samples with mastitis. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **18(5)**: 849-855.
- PINHO, M.G., FILIPE, S.R., DE LENCASTRE, H., TOMASZ, A. (2001). Complementation of the essential peptidoglycan transpeptidase function of penicillin-binding protein 2 (PBP2) by the drug resistance protein PBP2A in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, **183**: 6525-6531.
- PITKÄLÄ, A., HAVERI, M., PYÖRÄLÄ, S., MYLLYS, V., HONKANEN-BUZALSKI, T. (2004). Bovine mastitis in Finland 2001-prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *Journal of Dairy Science*, **87**: 2433-2441.
- PRÉVOST, G., CRIBIER, B., COUPPIÉ, P., PETIAU, P., SUPERSAC, G., FINCK-BARBANC, V., MONTEIL, H., PIEMONT, Y. (1995). 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*, **63(10)**: 4121-4129.

- PRÉVOST, G., MOUREY, L., COLIN, D.A., MENESTRINA, G. (2001). *Staphylococcal* pore-forming toxins. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, (257): 53-83.
- PYÖRÄLÄ, S. (2003). Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Veterinary Research*, 34: 565-578.
- PYÖRÄLÄ, S., TAPONEN, S. (2009). Coagulase-negative *Staphylococci*-emerging mastitis pathogens. *Veterinary Microbiology*, 134 : 3-8.
- QUINN, P.J., CARTER, M.E., MARKEY, B.K., CARTER, G.R. (1999). *Clinical Veterinary Microbiology*. Harcourt Publishers Limited, London, pp. 118-126.
- QUINN, P.J., MARKEY, B.K., CARTER, M.E., DONNELLY, W.J.C., LEONARD, F.C. (2004). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Blackwell Publishing Professional, Iowa, pp. 43-48.
- RAINARD, P., CORRALES, J.C., BARRIO, M.B., COCHARD, T., POUTREL, B. (2003). Leucotoxic activities of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows, ewes and goats with mastitis: Importance of LukM/LukF-PV leukotoxin. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10(2): 272-277.
- SABUNCUOĞLU, N., ÇOBAN, Ö. (2006). Mastitis ekonomisi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 1(1-2):1-5.
- SALDAGO, C.D. (2010). Antimicrobial resistance among epidemiologically important Gram positive bacteria. In: *Management of Antimicrobials in Infections Diseases Impact of Antibiotic Resistance*, Ed.: MAINOUS III, A.G, POMEROY, C. Humana Pres, New York, USA, pp. 33-40.
- SARGEANT, J.M., LESLIE, K.E., SHIRLEY, J.E., PULKRABEK, B.J., LIM, G.H. (2001). Sensitivity and specificity of somatic cell count and California mastitis test for identifying intramammary infection in early lactation. *Journal of Dairy Science*, 84: 2018-2024.
- SAWANT, A.A., SORDILLO, L.M., JAYARAO, B.M. (2005). A survey on antibiotic usage in dairy herds in Pennsylvania. *Journal of Dairy Science*, 88: 2991-2999.
- SCALI, F., CAMUSSONE, C., CALVINHO, L.F., CIPOLLA, M, ZECCONI, A. (2015). Which are important targets in development of *S. aureus* mastitis vaccine? *Research in Veterinary Science*, 100: 88-99.
- SCHALM, O.W., CARROLL, E.J., JAIN, N.C. (1971). *Bovine mastitis*. Lea&Febiger, Philadelphia. Pp: 136-157.
- SCOTT, P.R., PENNY, C.D., MACRAE A.I. (2011). *Cattle Medicine*, Manson Publishing Ltd. Veterinary Pres, London, UK. pp. 216-235.
- SHITANDI, A., KIHUMBU, G. (2004). Assessment of The California Mastitis test usage in smallholder dairy herds and risk of violative antimicrobial residues. *Journal Veterinary Science*, 5: 5-9.
- SPOHR, M., RAU, J., FRIEDRICH, A., KLITTICH, G., FETSCH, A., GUERRA, B., HAMMERL, J.A., TENHAGEN, B.A. (2011). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in three dairy herds in Southwest Germany. *Zoonoses and Public Health*, 58: 252-261.
- STROMMENGER, B., KETTLITZ, C., WERNER, G., WITTE, W. (2003). Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *S. aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 4089-4094.

- SUPRÉ, K., HAESBROUCK, F., ZADOKS, R.N., VANECHOUTTE, M., PIEPERS, S., DE VLIEGHER, S. (2011). Some coagulase-negative *Staphylococcus* species affect udder health more than others. *American Journal of Dairy Science*, **94**: 2329-2340.
- SUTRA, L., POUTREL, B. (1994). Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, **40**: 79-89.
- ŞEKER, E., ÖZENC, E. (2010). Mastitisli inek sütlerinden izole edilen koagulaz negatif Stafilokokların antibiyotik dirençlilikleri. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **21**: 107-111.
- TAPONEN, S., SIMOJOKI, H., HAVERI M., LARSEN, H.D., PYORALA, S. (2006). Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative Staphylococci identified with API or AFLP. *Veterinary Microbiology*, **115**: 199-207.
- TAPONEN, S. (2008). Bovine mastitis caused by coagulase-negative *Staphylococci*. Academic Dissertation. Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Finland.
- TARIM BAKANLIĞI (2014). İzmir İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, İzmir ili 2014 yılı Büyükbaş sağmal hayvan varlığı ve süt üretimi, Cizelge **16/1**. Erişim Adresi: [<http://izmir.tarim.gov.tr/Menu/35/2014-Yili>] Erişim tarihi 25.10.2015.
- TEL, O.Y., BAYRAKTAR, M., KESKİN, O. (2012). Investigation of antibiotic resistance among *Staphylococcus aureus* strains of human and bovine origin, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **59**, 191-196.
- TENHAGEN, B.A., KOSTER, G., WALLMANN, J., HEUWIESER, W. (2006). Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *Journal of Dairy Science*, **89**: 2542-2551.
- THORBERG, B.-M., DANIELSSON-THAM, M.-L., EMANUELSON, U., WALLER, K.P. (2009). Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase negative Staphylococci. *American Journal of Dairy Science*, **92**: 4962-4970.
- TRINIDAD, P., NICKERSON, S.C., ALLEY, T.K. (1990). Prevalence of intramammary infection and teat canal colonization in unbred and primigravid dairy heifers. *Journal of Dairy Science*, **73**: 107-114.
- TURUTOĞLU, H. ER, ERCELİK, S., OZTURK, D. (2006). Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococci* isolated from bovine mastitis. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, **50**: 41-45.
- TURUTOĞLU, H., HASÖKSÜZ, M., ÖZTÜRK, D., YILDIRIM, M., SAĞNAK, S. (2009). Methicillin and aminoglycoside resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis and sequence analysis of their *mecA* genes. *Veterinary Research Communications*, **33**: 945-956.
- TÜİK (Türkiye İstatistik Kurumu) (2010). Hayvansal üretim istatistikleri. Erişim adresi: [<http://www.tuik.gov.tr>]. Erişim tarihi: 25.10.2015.
- TÜİK (Türkiye İstatistik Kurumu) (2014). TÜİK Hayvancılık istatistik veri tabanı. Yıllık hayvan sayısı ve hayvansal üretim. Erişim Adresi: [ <http://rapory.tuik.gov.tr/25-10-2015-21:46:53-8089060254905165381773813845.html>?] Erişim tarihi: 25.10.2015.
- TÜNGER, A. (2004). *Staphylococcus aureus*: Mikrobiyoloji, Patogenez ve Epidemiyoloji. In: *Önemli ve Sorunlu Gram-Pozitif Bakteri İnfeksiyonları*. Ed.:Ulusoy, S., Usluer G., Ünal, S. Bilimsel Tıp Yayınevi, Kavaklıdere, Ankara, sy. 9-21.

- TÜRKYILMAZ, S., TEKBIYIK, S., ORYASİN, E., BOZDOĞAN, B. (2010). Molecular epidemiology and antimicrobial resistance mechanisms of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk, *Zoonoses Public Health*, **57**: 197-203.
- ÜNAL, N. (2013) Subklinik mastitisli inek sütlerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* izolatlarında bazı toksin genleri ve metisilin direnç geninin araştırılması. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **60**: 21-26.
- VANDENESCH, F., NAIMI, T., ENRIGHT, M.C., LINA, G., NIMMO, G.R., HEFFERNAN, H., LIASSINE, N., BES, M., GREENLAND, T., REVERDY, M.E., ETIENNE, J. (2003). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: Worldwide emergence. *Emerging Infectious Disease*, **9**: 978-984.
- VANDERHAEGHEN, W., CERPENTIER, T., ADRIAENSEN, C., VICCA, J., HERMANS, K., BUTAYE, P. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. *Veterinary Microbiology*, **144** : 166-171.
- van de VELDE, H. (1894). Étude sur la mécanisme de la virulence du *Staphylocoque pyogène*. *La Cellule*, **10**:402-460.
- van LOO, I., HUIJSDENS, X., TIEMERSMA, E., de NEELING, A., SANDE-BRUINSMA, N., BEAUJEAN, D., VOSS, A., KLUYTMANS, J. (2007). Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. *Emerging Infectious Disease*, **13**: 1834-1839.
- VERDIER, I., DURAND, G. BES, M., TAYLOR, K.L., LINA, G., VANDENESCH, F., FATTOM, A.I., ETIENNE, J. (2007). Identification of the capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* clinical isolates by PCR and agglutination tests. *Journal of Clinical Microbiology*, **45(3)**: 725-729.
- van DUIJKEREN, E., MOLEMAN, M., van OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN, M.M.S., MULTEM, J., TROELSTRA, A., FLUIT, A.C., van WAMEL, W.J.B., HOUWERS, D.J., de NEELING, A.J., WAGENAAR, J.A. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and horse personnel: An investigation of several outbreaks. *Veterinary Microbiology*, **141**: 96-102.
- WALLER, K.P., ASPAN, A., NYMAN, A., PERSSON, Y., ANDERSSON, U.G. (2011). CNS species and antimicrobial resistance in clinical and subclinical bovine mastitis. *Veterinary Microbiology* , **152(1-2)**:112-116.
- WANESS, A. (2010). Revisiting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Journal of Global Infectious Diseases*, **28** : 49-56.
- WANG, S.C., WU, C.M., XIA, C.M., QI, Y.H., XIA, L.N., SHEN, J.Z. (2009). Distribution of superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates from milk samples of bovine subclinical mastitis cases in two major dairy production regions of China. *Veterinary Microbiology*, **137(3-4)**:276-281.
- WANG, X., WEI Y.Y., ZHANG, J., ZHOU, T., LIANG, Z.J., YANG, B.W., XI, M.L., XIA, X.D., MENG, J.H., YU, Y. (2011). Virulence genes and PFGE profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with subclinical and clinical mastitis. *Chinese Journal of Animal Veterinary Sciences*, Doi:CNKI:SUN:XMSY.0.201107-012.
- WEESE, J.S., HANNON, S.J., BOOKER, C.W., GOW, S., AWERY, B.P., REID-SMITH, R.J. (2012). The prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in feedlot Cattle. *Zoonoses and Public Health*, **59**: 144-147.

- WESEN, D.P., LUEDECKE, L.O., FORSTER, T.L. (1967). Relationship between California mastitis test reaction and bacteriological analyses of stripping samples. *Journal of Dairy Science*, **51(5)**: 679-684.
- WHO (2014). World Health Organization. Antimicrobial resistans by WHO global report on surveliance. Erişim Adresi: [[http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/EB134/B134\\_R13-en.pdf](http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB134/B134_R13-en.pdf)] Erişim tarihi: 22.06.2014.
- WINN, W.Jr., ALLEN, S., JANDA, W., KONEMAN, E., PROCOP, G., SCHRECKENBERGER, P., WOODS, G. (2006). *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th Ed. Lippincott Williams and Wilkins. Baltimore, MD, USA.
- VISHNUPRIYA, S., ANTONY, P.X., MUKHOPADHYAY, H.K., PILLAI, R.M., THANISLASS, J., VIVEK SRINIVAS, V.M., SUMANTH KUMAR, R. (2014). Methicillin resistant staphylococci associated with bovine mastitis and their zoonotic importance. *Veterinary World*, **7**: 422-427.
- WITTE, W. (1999). Antibiotic resistance in Gram positive bacteria: Epidemiological aspects. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* , **44**: 1- 9.
- YEŐILMEN, S., ÖZYURTLU, N., BADEMKIRAN, S. (2012).Diyarbakır yöresinde subklinik mastitislerde etken izolasyonu ve duyarlı antibiyotiklerin belirlenmesi. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **1(4)**:24-29.
- ZECCONI, A., CESARIS, L., LIANDRIS, E., DAPRÀ, V., PICCININI, R.(2006). Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microbial Pathogenesis*, **40(4)**:177-183.
- ZHANG, K., SARLING, J., CHOW, B.L., ELSAYED, S., HUSSAIN, Z., CHURCH, D.L., GREGSON, D.B., LOUIE, T., CONLY, J.M. (2004). New quadriplex PCR assay for detection of methicillin resistance and simultaneous discrimination of *S. aureus* from coagulase-negative *Staphylococci*. *Journal of Clinical Microbiology*, **42**: 4947-4955.

## ÖZGEÇMİŞ

**ADI:** CANSU

**SOYADI:** GEZGEN

**DOĞUM TARİHİ, YERİ:** 14.01.1973, Diyarbakır

**MEDENİ HALİ:** Evli, bir kız çocuğu annesi

**ÜNVANI:** Veteriner Hekim

**EĞİTİM:**

**İlköğretim:** 1979-1981 Fatih Sultan Mehmet İlköğretim Okulu, Eskişehir

1981-1984 Cengiz Topel İlköğretim Okulu, Eskişehir

**Ortaöğretim:** 1984-1990 H. Süleyman Çakır Lisesi, Eskişehir

**Üniversite:** 1990-1995 Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Bursa

**Yüksek Lisans:** 2012-... (Tez Aşamasında) Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Afyonkarahisar

İzmir/Ödemiş Vetbir Kliniğinde veteriner hekim olarak çalışmaktadır.

**E-MAIL:** [cansugezgen@hotmail.com](mailto:cansugezgen@hotmail.com)

**ADRES:** İnönü Mah. 701 Sok. No.12 Ödemiş/İZMİR

**YABANCI DİL:** İngilizce

**YÜKSEK LİSANS TEZİ:** Sığır mastitislerinden izole edilen Stafilokoklarda metisilin direnci ve Panton-Valentin lökosidin varlığının araştırılması

**YAYINLANMIŞ MAKALE:** Yüksek Lisans Semineri

Gezgen, C., Şeker, E. (2014). Brusellozis: Güncel Yaklaşımlar, *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, **12(1)**: 28-66.