

T.C.  
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MİKROBİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

**SUBKLİNİK MASTİTİSLİ SIĞIR SÜTLERİNDEN İZOLE EDİLEN  
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS* İZOLATLARININ VİRULENS  
GENLERİ VE KOAGULAZ GEN POLİMORFİZMİNE GÖRE  
MOLEKÜLER TİPLENDİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Besime GÜNAYDIN

**Danışman**

Yrd. Doç. Dr. Özkan ASLANTAŞ

**HATAY - 2007**

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
<b>TABLO LİSTESİ</b>	<b>I</b>
<b>RESİM LİSTESİ</b>	<b>II</b>
<b>1.ÖZET</b>	<b>III</b>
<b>2.ABSTRACT</b>	<b>V</b>
<b>3.GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER</b>	<b>1</b>
3.1.Genel Bilgi	1
3.2.Etiyoloji	2
3.3.Epidemiyoloji	4
3.4.Türkiye’de <i>Staphylococcus aureus</i> Mastitislerinin Görülme Sıklığı	4
3.5.Patogenez ve Virulens	5
3.6.Klinik Belirtiler	8
3.7.Tanı	10
3.8.Sağaltım, Korunma ve Kontrol	13
3.9.Stafilokokkal Enterotoksinler	17
3.9.1.Stafilokokkal gıda zehirlenmeleri	17
3.9.2.Enterotoksinlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri	17
3.9.3.Enterotoksinlerin filogenetik özellikleri	18
3.9.4.SE’lerin filogenetik ilişkileri	19
3.9.5.Enterotoksinlerin süperantijen aktiviteleri	19
3.9.6.Stafilokokkal enterotoksin A (SEA)	20
3.9.7.Stafilokokkal enterotoksin B (SEB)	20
3.9.8.Stafilokokkal enterotoksin C (SEC)	20
3.9.9.Stafilokokkal enterotoksin D (SED)	20
3.9.10.Stafilokokkal enterotoksin E (SEE)	21
3.9.11.Stafilokokkal enterotoksin G (SEG)	21
3.9.12.Stafilokokkal enterotoksin H (SEH)	21
3.9.13.Stafilokokkal enterotoksin I (SEI)	21
3.9.14.Stafilokokkal enterotoksin J (SEJ)	22
3.10.Toksik Şok Sendrom Toksin-1 (TSST-1)	22
3.11.Stafilokokkal Enterotoksinlerin (SE) Fenotipik ve Genotipik Olarak Belirlenmesi	22
3.12. <i>S. aureus</i> İzolatlarının Genotiplendirilmesi	23
<b>4.MATERYAL VE METOT</b>	<b>25</b>

4.1.Süt Örnekleri	25
4.2. <i>S. aureus</i> İzolasyonu ve İdentifikasyonu	25
4.3.DNA Eksraksiyonu	25
4.4.Toksin Genlerinin PZR ile Saptanması	26
4.4.1.Stafilokokkal enterotoksin genlerinin PZR ile saptanması	26
4.4.2. <i>tst</i> geninin PZR ile saptanması	27
4.5. <i>S. aureus</i> İzolatlarının Moleküler Tiplendirilmesi	27
4.5.1.Koagulaz ( <i>coa</i> ) geninin PZR amplifikasyonu ( <i>coa</i> -PZR)	27
4.5.2.Koagulaz ( <i>coa</i> ) geninin RFLP analizi ( <i>coa</i> -RFLP)	27
4.6.Kültür ve PZR Aşamalarında Kullanılan Ayıraçlar	28
4.6.1.İzolasyon ve identifikasyonda kullanılan besiyerleri ve ayıraçlar	28
4.6.2.PZR işleminde kullanılan ayıraçlar	30
4.6.2.1.DNA ekstraksiyonunda kullanılan ayıraçlar	30
4.6.2.2.PZR-RFLP analizinde kullanılan ayıraçlar	31
4.6.2.3.Elektroforez işleminde kullanılan ayıraçlar	34
<b>5.BULGULAR</b>	<b>35</b>
5.1. <i>S. aureus</i> İzolasyon ve İdentifikasyon Sonuçları	35
5.2. <i>S. aureus</i> İzolatlarının Toksin Gen ve Genotiplerine Göre Dağılımı	35
5.3. <i>S. aureus coa</i> -PZR Bulguları	37
5.4. <i>S. aureus coa</i> -RFLP Bulguları	38
<b>6.TARTIŞMA VE SONUÇ</b>	<b>39</b>
<b>7.TEŞEKKÜR</b>	<b>43</b>
<b>8.KAYNAKLAR</b>	<b>44</b>
<b>9.ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>56</b>

**TABLO LİSTESİ**

	<b>Sayfa No</b>
Tablo 4.1: <i>Staphylococcus aureus</i> izolatlarında virulens genlerinin belirlenmesinde ve tiplendirilmesinde kullanılan primerler	33
Tablo 5.1: Toksin genlerinin RFLP alt tiplerine göre dağılımı	36

**ŞEKİL LİSTESİ**

		<b>Sayfa No</b>
Şekil 5.1:	<i>S. aureus</i> izolatlarında tespit edilen toksin genleri	35
Şekil 5.2:	<i>S. aureus</i> izolatlarının <i>coa</i> -PZR ürünlerinin agaroz jelde görünümü	37
Şekil 5.3:	<i>AluI</i> ile kesilmiş <i>coa</i> -PZR ürünlerinin agaroz jelde görünümü	38

## 1.ÖZET

### **Subklinik Mastitisli Sığır Sütlerinden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* İzolatlarının Virulens Genleri ve Koagülaz Gen Polimorfizmine Göre Moleküler Tiplendirilmesi**

Bu çalışmada, subklinik mastitisli inek sütlerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* izolatlarının toksin genleri ve koagülaz gen polimorfizmi yönünden karakterizasyonunun yapılması amaçlandı.

İncelenen 130 *S. aureus* izolatının 60 (% 46.2)'ı bir veya birden fazla toksin geni yönünden pozitif bulundu. Pozitif bulunan izolatların 18'inde *seg - sei* ve *sec*, 14'ünde *sed - sej*, 6'sında *tst*, 2'sinde *sed - sej - seg - sei*, 1'er izolatta ise *sec - seg - sei* ve *sec - tst* genleri tespit edildi. *sea*, *seb*, *see* ve *seh* genleri yönünden ise tüm izolatlar negatif bulundu.

*S. aureus* izolatlarının *coa* genine dayalı PZR analizinde 127 izolatta moleküler büyüklükleri 730 - 970 bp arasında değişen tek band ve 3'ünde ise moleküler büyüklüğü 810 + 1050 bp olan iki band tespit edildi. *coa*-PZR ürünlerine göre izolatlar 5 farklı tip (A, B, C, D, E) oluşturdu. *coa* pozitif PZR ürünlerinin *AluI* restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucu toplam 9 farklı restriksiyon profili elde edildi. Tip B (B1 ve B2) ve Tip C (C1 ve C2)'ye ait izolatlar iki, Tip D'ye ait izolatlar ise 3 alt tipe (D1, D2 ve D3) ayrıldı. Tip B (55 izolat) ve Tip E (42 izolat) en dominant tipler olarak belirlendi. Bu çalışmada, yaygın genotiplere ait izolatların büyük kısmının toksin genleri yönünden pozitif olduğu tespit edilmesine rağmen, C, D1 ve D2 genotipine ait izolatlarda toksin genlerinin varlığı belirlenemedi.

Sonuç olarak, (i) Hatay ilinde subklinik inek mastitislerinin farklı *S. aureus* genotipleri tarafından meydana getirildiği, ancak bir veya iki genotipin dominant olduğu, (ii) dominant genotiplerin enterotoksijenik olduğu, bu genotiplerin bir veya birden fazla

enterotoksin geni taşıdığı, (iii) *S. aureus*'un sığırlarda neden olduğu meme içi infeksiyonların patogenezinin anlaşılması için farklı bölgelerden toplanan çok sayıda izolat ile yapılacak daha kapsamlı çalışmaların yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar sözcükler:** *Staphylococcus aureus*, enterotoksin, sığır, mastitis, moleküler tiplendirme

## 2.ABSTRACT

### **Molecular Typing of *Staphylococcus aureus* Isolated from Subclinic Bovine Mastitic Milk Samples on the Basis of Virulence Genes and Coagulase Gene Polymorphism**

The aim of this study was to characterize *Staphylococcus aureus* isolates obtained from subclinic bovine mastitic milk samples by coagulase gene polymorphism and toxin genes.

Out of 130 *S. aureus* isolates, 60 isolates (46.2 %) were found positive for having one or more toxin gene. Among positive isolates, it has been determined that 18 of the isolates containing *seg - sei*, 18 of the isolates containing *sec*, 14 of the isolates containing *sed - sej*, 6 of the isolates containing *tst*, 2 of the isolates containing *sed - sej - seg - sei*, 1 of the isolates containing *sec - seg - sei*, and 1 of the isolates containing *sec - tst* genes. No *sea*, *seb*, *see* and *seh* gene was detected among the isolates tested.

PRC analysis of *S. aureus* isolates based on *coa* gene, a single band with a molecular weight of 730-970 bp was observed from 127 isolates, and two bands were observed in 3 isolates with molecular weight ranging from 810 + 1050 bp. Isolates produced 5 different type (A, B, C, D, E) according to *coa*-PRC products. Nine different restriction profile were obtained when *coa* positive PRC products were being cut with *AluI* restriction enzymes. While Type B and Type C isolates were classified into two subgroups, as B1, B2, C1, C2; Type D isolates classified into three subgroups as D1, D2, D3, respectively. Type B (55 isolates) and Type E (42 isolates) were determined as the most dominant types. In this research, although it was determined that most of the isolates obtained from common genotypes were toxin gene positive, no toxin gene was determined from isolates obtained from C, D1, and D2 genotypes.



It was concluded that (i) subclonic cow mastitis caused by different *S. aureus* genotypes in Hatay and only one or two of the genotypes were dominant, (ii) dominant genotypes were enterotoxigenic and have one or more that one enterotoxin genes (iii) it is suggested that more comprehensive studies with more isolates obtained from different regions to determine patogenicity of bovine mastitis caused by *S. aureus* need to be performed.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*, enterotoxin genes, bovine mastitis, molculer typing

### 3.GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

#### 3.1.Genel Bilgi

Mastitis, tüm dünyada görülen sütün nitelik ve niceliğini etkileyen ve süt endüstrisinde önemli ekonomik kayıplara sebep olan meme içi bir enfeksiyondur (Jain 1979). Mastitis, meme yangısı, Grekçe meme anlamına gelen ‘Mastos’ ve yangıyı ifade eden ‘itis’ kelimelerinin birleştirilmesiyle oluşmuş bir terimdir (Baştan 2002). Genel anlamda ise mastitis, meme bezlerinin travmatik etkilere ve meme içerisine çoğunlukla ekzojen veya endojen olarak giren mikroorganizmalara karşı reaksiyon göstermesidir (Blood ve Radostits 1989).

Mastitis, meme dokusu ve sütte ortaya çıkan değişikliklere göre klinik ve subklinik mastitisler olarak sınıflandırılmaktadır (Baştan 2002). Klinik mastitisler, gerek meme dokusunda gerekse sütte değişikliklerin olduğu mastitislerdir ve yangısal cevabın karakteristik belirtileri olan memede şişme, ağrı, kızarıklık, sıcaklık artışı ve fonksiyon kaybı gibi lokal, ateş, halsizlik, iştahsızlık gibi genel hastalık belirtileri ile karakterizedir. Sütte ise, renk değişimleri, koku, sulanma, pıhtı ve flakonlar gibi değişiklikler görülebilmektedir (Karahana 2005).

Mastitisin, ikinci formu sağlık ve ekonomik yönden daha fazla önem arz eden subklinik mastitislerdir. Subklinik mastitisler sütte ve memedeki değişikliklerin kolayca fark edilememesi, süt verimini ve kalitesini olumsuz yönde etkilemesi, klinik mastitislere göre daha sık görülmesi ve süratle yayılması gibi nedenlerden dolayı daha fazla önem arz etmektedir. Süt sığırcılığı yapan işletmelerde büyük ekonomik kayıplara yol açan mastitislerin %70’ni subklinik mastitisler oluşturmaktadır (Baştan 2002).

Toplam sığır hastalıkları içinde mastitisin % 26 oranında bir paya sahip olduğu ve mastitisten kaynaklanan kaybın diğer infertilite ve reproduktif hastalıklardan yaklaşık iki kat fazla olduğu bildirilmiştir (De Graves ve Fetrow 1993, Philpot 1984). Süt veriminde

azalma, sütün kalitesinin bozulması, tedavi süresince sütün atılması, tedavi ve veteriner hekim giderleri bu maliyetin en önemli kalemleridir (De Graves ve Fetrow 1993). İnfeksiyonun yıllık olarak inek başına 150-220 dolar zarara neden olduğu hesaplanmıştır (Akan 2006).

Mastitis kompleks etiyojolojiye sahip bir hastalıktır. Fiziksel, kimyasal veya infeksiyöz etkenlere bağılı olarak mastitis meydana gelmektedir (Karahana 2005). Ancak, mastitis vakalarının büyük çoğunluğu infeksiyöz ajanlar (bakteriler, viruslar ve mayalar) tarafından oluşturulmaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, mastitis etkeni olarak 200'ün üzerinde farklı türden mikroorganizmanın varlığı bildirilmiştir. Bununla birlikte, mastitislerin % 95'i *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus agalactiae* gibi kontajiyöz mastitis etkenleri tarafından oluşturulmaktadır. Kontajiyöz mastitis, meme dokusunda bulunan patojenler tarafından meydana getirilir ve sağım sırasında sağımcıların elleri ve sağımda kullanılan ekipmanlar ile duyarlı ineklerin memesine infeksiyon yayılır. Ayrıca, *Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae* ve *Streptococcus uberis* gibi çevresel etkenler de mastitise neden olmaktadır. Ancak, farklı yerleşim yerlerine, mevsimsel farklılıklara ve değışik yetiştirme koşullarına bağılı olarak uygulanan mastitis kontrol programlarına göre değışmekle birlikte, mastitisin etiyojisinde *S. aureus* ve diğer stafilokok türleri mastitislerin % 60-80'ini oluşturmaktadır (Hadimli ve Erganiş 2001).

### **3.2.Etiyoloji**

*S. aureus* ilk defa, Rosenbach tarafından 1884 yılında irinli yaralardan izole edilerek *S. pyogenes aureus* olarak isimlendirilmiştir (Schleifer 1986). Daha önceki yıllarda Micrococcaceae familyasında yer alan Stafilokok cinsi, son Bergey's Manual'e göre Bacilli sınıfında Bacillales takımında yer almaktadır. Stafilokok cinsi içerisinde 30'dan fazla tür bulunmaktadır. Stafilokok cinsi içerisinde yer alan türler, patojenite kriteri olarak kabul edilen koagulaz enzimi sentezleme yeteneklerine göre iki ana gruba

ayrılmaktadır. Koagülaz pozitif stafilokoklar *S. aureus*, *S. intermedius* ve *S. hyicus* türlerini içine alır. *S. aureus*, insan ve hayvanlarda en patojen tür olarak kabul edilir ve genel piyojenik etkidir (Akan 2006).

*S. aureus*, Gram pozitif, hareketsiz, sporsuz, katalaz pozitif, oksidaz negatif ve 1 µm çapında yuvarlak bir morfolojiye sahip bakteridir. Lezyonlardan ve besi yerlerinden hazırlanan boyalı preparatlarda üzüm salkımı şeklinde kümeler halinde görünürler. Adi besi yerinde kolayca ürer ve 2-4 mm çapında düzgün koloniler oluştururlar. Önceleri renksiz görünümde olan koloniler ilk günden sonra pigment yaparak altın sarısı rengine dönüşür. Laboratuarda 10-42 °C'de üreyebilmelerine rağmen optimum üreme ısısı 37 °C'dir. Sıvı besi yerlerinde bulanıklık ve çöküntü yaparak çoğalmaktadır. Sporsuz bakteriler içerisinde dış etkenlere ve dezenfektanlara karşı en fazla dayanabilen bakterilerdir. Kültürlerde +4 °C'de 2-3 ay, -20 °C 'de 3-6 ay canlı kalabilmektedir. Antibiyotiklere farklı derecelerde duyarlı olmasına rağmen zamanla direnç kazanabilmektedir. Etken 60 °C'de yarım saatte, % 2'lik fenolde 15 dakikada inaktive olabilmekte, % 9'luk NaCl ve sakkaroz tolerans gösterebilmektedir (Akan 2006).

*S. aureus* birçok hayvan türünde ve insanlarda çeşitli infeksiyonlara neden olabilmektedir. Bu infeksiyonlar; birçok hayvanda gözlenen apseler ve irinli olgular, ineklerde çeşitli derecelerde mastitis olguları ve meme impetigosu, koyunlarda mastitis, kuzuların enzootik kene piyemisi, periorbital ekzama ve dermatitis ve benign follikülitis olguları, keçilerde mastitis ve dermatitis, domuzlarda mastitis, meme bezlerinin botriyomikozisi, nekrotize stafilokokal endometritis ve meme impetigosu, atlarda mastitis ve botrimikozisi, tavşanlarda yeni doğanlarda eksudatif dermatitis, apseler, konjunktivitis, kanatlılarda subkutan dokuların piyogranulamatöz olgusu, stafilokokal artiritis, septisemi ve omfalitis, kedi ve köpeklerde piyoderma, piyometra, sistitis ve otitis eksterna'ya sebep oldukları bildirilmiştir (Quinn ve ark 1994). İnsanlarda ise, *S. aureus* hastane kaynaklı

infeksiyonları oluşturan etkenlerin başında gelmektedir. *S. aureus* insanlarda septisemi, osteomyelitis, meningitis, invaziv endokarditis, toksik şok sendrom ve gıda kaynaklı zehirlenmelere neden olmaktadır (Konemen ve ark 1997).

### **3.3.Epidemiyoloji**

*S. aureus* deride ve mukoz membranların normal florasında mevcuttur ve dolayısıyla fırsatçı patojen olarak nitelendirilmektedir. Hayvanların iç ve dış stres faktörleri ile korunma mekanizmalarının bozulması veya memelerde meydana gelen portantrelerden girerek infeksiyona sebep olur. Mastitisli hayvanlar sütleriyle çok sayıda bakteriyi dışarı çıkarırlar. Bu nedenle, mastitislerde primer infeksiyon kaynağı infekte meme bezleri dolayısı ile de kronik infekte süt inekleridir (Akan 2006, Roberson ve ark 1994). Bundan dolayı inekten ineğe bu patojenin bulaşmasını önlemek için alınacak tedbirler, mastitis insidensinin azaltılmasında en önemli faktördür. Ancak, infekte ineklerin haricindeki kaynaklardan orijin alan infeksiyonlar mastitisin kontrol ve eradikasyonunu güçleştirmektedir (Zadoks ve ark 2002). *S. aureus*'un bulaşmasında sağımçıların elleri, sağım ekipmanları ve ahırda kullanılan malzemeler ve sağım hijyenine dikkat edilmemesi önemli rol oynamaktadır ( Gillespe ve ark 1999, Roberson ve ark 1998, Baştan 2002).

### **3.4.Türkiye’de *Staphylococcus aureus* Mastitislerinin Görülme Sıklığı**

Mastitis tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de süt inekçiliği yönünden önemli bir infeksiyondur. Günümüzde, mastitisin eradikasyonu mümkün olmamakla birlikte, geliştirilen kontrol programları ile insidensini düşük seviyelere çekmek mümkündür (Erganiş ve Uçan 2001).

Türkiye’de subklinik mastitislerin yaygınlığını ve subklinik mastitislere neden olan mikroorganizmaların belirlenmesine yönelik farklı yerleşim yerlerinde çalışmalar yapılmıştır. Marmara bölgesi ve civarında gerçekleştirilen bir çalışmada ise, 1594 mastitisli

inek sütünün bakteriyolojik olarak incelenmesi neticesinde etken izolasyonu gerçekleştirilen 1126 (% 70.6) süt örneğinin 316 (% 28.1)'sından *S. aureus* ve 260 (% 23.1)'ından *S. epidermidis* identifiye edilmiştir (Türütöğlü ve ark 1995). Afyon bölgesindeki klinik ve subklinik mastitisli 126 inekten toplam 164 süt örneği mikrobiyolojik olarak incelenmiştir. İneklerin 119'unun subklinik, yedi tanesinin ise klinik mastitisli olduğu bildirilen çalışmada % 40.1 oranında *S. aureus* identifiye edilmiştir (Kuyucuoğlu ve Uçar 2001). Ergün ve ark (2004), Hatay yöresinde subklinik mastitisli 115 inekten alınan 262 adet süt örneğinin mikrobiyolojik incelemesi sonucu % 42.4 oranında koagulaz negatif stafilokok ve % 25.1 oranında *S. aureus* etmişlerdir. Yukarıdaki araştırmalarda da görüldüğü üzere, ülkemizde inek mastitislerinden izole edilen etkenlerin önemli bir kısmını *S. aureus* ve diğer stafilokok türleri oluşturmaktadır.

### **3.5.Patogenez ve Virulens**

*S. aureus*'un neden olduğu mastitisin patogenezisinde etkenin sahip olduğu virulens faktörleri önemli bir yere sahiptir. Toksinler, enzimler, yüzey proteinleri, kapsül ve slime gibi virülens faktörleri lenfositlerin mitogenezisini baskılamak ve nötrofil aktivitesinden korunmak suretiyle meme içinde etkenin canlı kalmasına, invazyonuna, konakçı immun sisteminden korunmasına yardımcı olurlar (Karahana 2005). Ayrıca, *S. aureus* farklı türden antibiyotiklere de direnç gösterme özelliğine de sahiptir (Creven ve Anderson 1984). Bu nedenle, *S. aureus* mastislerinin tedavisinde başarı oranının oldukça düşük olduğu bildirilmiştir (Sol ve ark 2000).

İneklerde akut ve kronik mastitisin patogenezisi benzerdir. Akut mastitiste küçük meme kanalların fibrin pıhtılarıyla hızlı bir şekilde tıkanması gözlenir. Akut form sıklıkla kalın pıhtılar içeren irinli bir sekresyon ve etkilenen dokuların şiddetli bir şekilde şişmesiyle karakterizedir. Genellikle yaygın bir fibrozis gözlenir. Yangı birkaç gün

içerisinde azalmaya başlar ve kanalların etrafında meydana gelen doku proliferasyonları neticesinde bölgedeki dokularda atrofi ve blokaj gözlenir (Quinn ve ark 1994).

Kronik ve subklinik mastitiste, somatik hücre sayısının artışı ile birlikte etkilenen meme loblarına bakteriyel invazyon söz konusudur. Bakteriyel üreme genellikle süt toplanan kanallarda ve sınırlı bir şekilde alveollerde meydana gelir. Yangısal cevap sonucunda alveollerin atrofisi ve kanalların blokajı oluşur. Fagositik hücrelerinin yangısal bölgeye akını sonucunda apse formasyonları ve fibrozis gelişmesi antibiyotiklerin penetrasyonunu engellemekle birlikte organizmanın etkili bir şekilde ortadan kaldırılmasını sınırlar (Quinn ve ark 1994). *S. aureus*, ineklerin memelerinde sadece bu şekilde reaksiyonlara neden olan bir bakteri değildir. Bakteriyel toksinler ve doku yıkımlanmasının etkisiyle toksemi ile sonuçlanan durumlar da ortaya çıkabilir (Blood ve ark 1989).

*S. aureus*, diğer stafilokok türlerinden ayırt edilmesinde kullanılan koagülaz enzimine sahiptir. Yangısal bölgedeki koagülaz reaksiyonu sonucu fibrin benzeri pıhtılar oluşur. Bu pıhtılar lökosit hareketlerini inhibe eder ve konakçının immun sistem fagositlerinin hareketlerini engeller. Keza bu pıhtılar sekretör hücrelerin tahribatına yol açarak meme bezi kanallarındaki sütün boşaltılmasını önler (Karahana 2005).

*S. aureus*, virülenste büyük rol oynayan alfa, beta, gama ve delta olarak isimlendirilen toksinler sentezlemektedir (Akan 2006). Alfa toksin sığır mastitlerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının yaklaşık % 40-50'sinde, beta toksin ise % 75-100'ünde saptanmıştır. Pürifiye alfa toksinin tavşanlara injeksiyonunun, doza bağımlı olarak meme bezlerinde hemorajik nekroza ve etkenin yoğun üremesine bağlı olarakta gangrenöz mastitise neden olabileceği bildirilmiştir (Karahana 2005). Beta toksin ise, meme alveollerinde ve meme kanallarında polimorf nükleer lökosit infiltrasyonuna ve yangısal değişikliklere sebep olur (Ward ve ark 1979). Ayrıca, beta toksinin, deneysel *in vitro* fare

mastitis modellerinde bakteriyel üremeyi artıran bir faktör olduğu saptanmıştır (Hadimli ve Erganiş 2001). Bununla birlikte, gama toksinin beta toksin ile birlikte çoğunlukla doku irritasyonuna sebep olduğu, alfa ve beta toksinlerinin meme dokularına adhezyon yeteneğini artırmak suretiyle virülense önemli katkıda buldukları rapor edilmiştir (Cifrian ve ark 1996, Karahan 2005).

Sığır süt örneklerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının birçoğu tarafından sentezlenen diğer önemli bir toksin lökositin'dir (Loeffler ve Norcross 1985). Bu toksin, hem polimorf nükleer lökositler hem de makrofajlar üzerine sitolitik etkiye sahiptir ve fagositozu engellemek suretiyle virülense katkıda bulunmaktadır (Fox ve ark 1991).

*S. aureus*'un hücre duvarı komponentleri de virülense katkıda bulunur. Ana komponent olan peptidoglikan, doku tahribatına neden olurken, ikinci önemli komponent olan teikoik asit, in vivo teikuronik aside dönüşerek hücre sel ve humoral immun yanıtın teikuronik asidi tanımlayamamasına neden olur. Bu durumun polimorf nükleer lökositlerin fagositozuna karşı direnci artırdığı bildirilmiştir (Karahan 2005).

Bazı *S. aureus* izolatları hücre duvarında bulunan protein A, IgG'nin Fc kısmına bağlanma özelliğine sahip olduğu bilinmektedir. Bu sayede, IgG ile etkenin opsonizasyonuna mani olur (Akan 2006).

Bazı *S. aureus* izolatlarının belirli koşullar altında kapsül veya pseudokapsül (slime tabakası) oluşturabilme özelliğine sahiptir. Bu yapılar, hücre duvarı komponentlerini kaplayarak, antikorlar ve komplement tarafından opsonizasyonu inhibe eder ve fagositozu engeller (Nickerson 1995, Sutra ve Poutrel 1994).

*S. aureus*'un neden olduğu mastitis vakalarının patojenitesi tamamen aydınlatılmamış olmasına rağmen, salgıladıkları enterotoksin'ler (SE) ve TSST-1 primer öneme sahiptir (Ferens ve ark 1998). Bu toksinler süperantijen aktivitesine sahiptir. Süperantijenlerin hücre sel immun sistem üzerine zararlı etkilere sahip olduğu ve spesifik



immunité için gerekli olan hücre populasyonunu azalttığı gösterilmiştir (Fueyo ve ark 2005). Ancak, *S. aureus*'un neden olduğu meme içi infeksiyonların patogenezinde süperantijenlerin rolleri tam olarak ortaya konulamamıştır (Fox ve ark 2000).

Stafilokokların, patogenezindeki beta-laktam antibiyotiklere karşı olan direnç durumları önemli bir yere sahiptir. Beta laktam antibiyotiklere karşı olan direnç iki mekanizma ile ortaya çıkmaktadır. İlki, beta-laktamaz enzimi ile beta-laktam halkasının yıkımlanması diğeri ise beta-laktam antibiyotiklere karşı düşük affiniteye sahip veya olmayan penisilin bağlayan protein 2a (penicilin binding protein 2a, PBP2a) sentezi ile gerçekleşmektedir. Beta-laktamaz enzimi, büyük bir plazmid üzerinde yer alan *blaZ* geni tarafından kodlanmaktadır (Fuda ve ark 2005). Penisilin bağlayan protein 2a (PBP2a), staphylococcal chromosome cassette *mec* (SCC*mec*) olarak adlandırılan büyük hareketli genetik bir element üzerinde yer alan *mecA* geni tarafından kodlanmaktadır. SSC*mec*, *mecA* genini ve bu gene ait regülatör genleri, SCC*mec* kompleksinin yer değıştirmesinden sorumlu site-spesifik rekombinaz enzimini kodlayan *ccr* gen kompleksini içermektedir. Şu ana kadar, en az SCC*mec*'in en az beş farklı tipi olduğu ortaya konulmuştur (Kwon ve ark 2005).

*S. aureus* sahip olduğu hyaluronidaz, fosfataz, nükleaz, lipaz, katalaz, stafilokinaz ve proteaz gibi çok sayıda ekstrasellüler enzimin de mastitisin patogenezinde rol oynadıkları bildirilmiştir. Bu enzimlerin, etkenin meme dokusuna penetrasyonuna ve sütte çok sayıda ve hızlı şekilde üremesine katkıda bulunmaktadır (Akan 2006, Karahan 2005).

### **3.6.Klinik Belirtiler**

Mastitisler yangının şiddetine göre klinik, subklinik ve nonspesifik tarzda ortaya çıkarlar. Klinik mastitisler, gerek meme dokusunda gerekse sütte gözle görülebilir değışikliklerin olduğu mastitislerdir. Klinik mastitisler olgunun süresine göre perakut, akut, subakut ve kronik mastitis olarak sınıflandırılmaktadır (Baştan 2002).

Perakut form çoğunlukla dramatik bir şekilde son bulmasına rağmen, en önemli ekonomik kayıplar kronik-subklinik form tarafından oluşturulur (Quinn ve ark 1994). Perakut form, genellikle buzağılamayı takiben birkaç gün içerisinde ortaya çıkar ve mortalitesi yüksektir. Süt sulu, kanlı, flakonlu ve pıhtılı olabilir (Baştan 2002). Yüksek ateş, hızlı kalp atışı, anoreksi, depresyon, rumen hareketlerinde azalma ve kaslarda güçsüzlük gibi şiddetli sistemik reaksiyonlar gözlenebilir. Sistemik ve lokal reaksiyonlar ani olarak gelişir. İlk sağımda normal gözükken inek aniden yatabilir ve komaya girebilir. Etkilenen memeler aşırı şişmiş, sert ve dokunulduğunda ağrılıdır. Memede morarma gelişebilir ve meme ucunda başlayan bu durum daha sonra meme loplarını da kapsayabilir. Etkilenmeyen meme lopları da genellikle şişmiştir ve meme venlerinin trombozu nedeniyle meme loblarının ön tarafında yaygın bir subkutan ödem meydana gelebilir. Toksemi şayet erken olursa genellikle ölümlü sonuçlanır (Akay ve Aydın 1984, Baştan 2002, Quinn ve ark 1994).

Akut mastitisler, genellikle erken laktasyon dönemlerinde meydana gelir. Memelerin şiddetli şekilde şişmesi ve sütte irin veya kan pıhtılarının görülmesi söz konusudur. Akut form; hayvanlarda ateş, anoreksi, depresyon, zayıflama gibi sistemik bulguların yanı sıra hastalıklı meme bölgesinin şişmesi, ağrı, ödem ve sıcaklık artışı gibi yangı semptomları ile karakterizedir. Ağrıdan dolayı tek taraflı topallık görülebilir. Böyle durumlar yaygın fibrozis ve ağır fonksiyon kaybı ile sonuçlanır (Karahana 2005).

Bir sürüdeki ineklerde mastitis olgusu daha çok subklinik formdadır. Bu nedenle de subklinik mastitislerin formların yetiştiricilerin gözünden kaçma ihtimalleri oldukça fazladır. Kronik-subklinik formda başlangıçta memede ve hayvanın genel durumunda bir bozukluk farkedilmez. Fakat zamanla birçok vakada sütün yapısında değişiklikler meydana gelir. İlk sütte sulu bir görünüm veya pıhtı oluşumu ile birlikte memelerde atrofi ve yavaş şekilde gelişen sertleşmeler gözlenebilir. Sütteki hücre miktarı artmıştır. İndirekt testler

veya memelerin palpasyonu düzenli şekilde yapılmazsa memeler fonksiyonlarını kaybedinceye kadar hastalık belirlenmez. Süt salgısı gün geçtikçe azalır ve sonunda memede körelme ve sütün tamamen durması gözlenebilir (Akay ve Aydın 1984).

### **3.7.Tanı**

Mastitislerin tanısı; memelerin ve sütün klinik, kimyasal, fiziksel, hücresel ve bakteriyolojik muayeneleri ile yapılmaktadır. Klinik semptomların belirgin olduğu olgularda, bakteriyolojik incelemeye sadece prognozu saptamak ve etkili antibiyotik seçimi için başvurulmaktadır (Baştan 2002).

Mastitislerin teşhisinde genellikle klinik tanı yeterli değildir. Mastitise neden olan etkenin izolasyonu ve identifikasyonu gereklidir. Mastitisin teşhisinde rutin olarak kullanılan birçok metot olmasına rağmen, en pratik uygulananı Kaliforniya Mastitis Testi (CMT)'dir. CMT yönünden pozitif olan süt örneklerinden etken izolasyonuna gidilmesi durumunda genellikle izolasyon oranı oldukça yüksektir. Ancak bakteriyel etkenler dışındaki bazı faktörlerin de somatik hücre sayısını artırması nedeniyle CMT pozitif süt örneklerinden etken izolasyonu yapılamayabilir. Etkenin viral olması, doğuma yakın dönemlerde epitelyum dokunun kendini yenilemesi, genel bir enfeksiyon nedeniyle lökositosis oluşumu, meme derisi ve kanalının normal florasında bulunan bakteriyel etkenlerin bazı durumlarda mastitis oluşturmadan hafif irritasyonlara sebep olması gibi faktörler yanıltıcı CMT sonuçlarının ortaya çıkmasına neden olabilir (Karahan 2005).

CMT ile tespit edilen somatik hücre sayısı incelenen hayvanın mastitisli olması yönünden bir ön izlenim oluşturur. Böyle bir durumdan sonra mastitise neden olan etkenin identifikasyonu amacıyla laboratuvar tanısı gereklidir. Meme bezi patojenlerinin identifikasyonu amacıyla laboratuvarda kullanılan referans test *in vitro* kültür işlemi ve biyokimyasal testler ile identifikasyondur (Riffon ve ark 2001). Ancak, bu teknik ile yapılan identifikasyon zahmetli, zaman alıcı ve bazen yetersiz kalmaktadır. İzolatların

üretilmesi ve idntifikasyonu için en azından 2-3 gün ihtiyaç duyulması ve bazı yakın ilişkili türlerin ayırımında biyokimyasal identifikasyon testlerinin yetersiz kalması söz konusudur. Erken tanı metotlarının geliştirilmesi, daha hızlı şekilde uygulanacak doğru antimikrobiyal tedaviye bağlı olarak normal süt yapımına geri dönüş zamanında azalma ve tedavi oranlarının artmasına yardımcı olabilir. Patojen etkenin identifikasyonu, sadece antimikrobiyal tedavi amacıyla değil aynı zamanda sürü düzeyinde infeksiyonun izlenmesi ve kontrolü amacıyla da önem arz eder (Milner ve ark 1997).

*S.aureus* mastitlerinin kültür işlemi neticesinde identifikasyonlarının gerçekleştirilebilmesi için, öncelikle aseptik şartlar altında alınan süt örneklerinin laboratuvarında uygun besi yerlerine ekimlerinin gerçekleştirilmesi gerekir. Sütün direkt bakteriyoskopisi ile sütte Gram pozitif kok şeklindeki mikroorganizmaların görülmesi neticesinde etkenin *S. aureus* olduğunu söylemek mümkün değildir (Akan 2006). *S. aureus* mastitisinden şüphelenilen inekten alınan süt örnekleri, kanlı agar başta olmak üzere farklı besiyerlerin ekilerek aerobik şartlar altında kolay bir şekilde etken izolasyonu gerçekleştirilebilir. İzolasyon sonucunda *S. aureus* şüpheli ve mikroskop altında Gram pozitif üzüm salkımı şeklinde koklar halinde bulunan mikroorganizmaların, tür düzeyinde idntifikasyonu amacıyla katalaz, oksidaz, oksidasyon-fermantasyon, mannitol fermentasyonu, DNase, protein A ve patojen *S. aureus*'ların identifikasyonunda primer test olarak kabul edilen koagülaz testinin sonucuna bağlı olarak isimlendirilmesi mümkündür (Quinn ve ark 1994). Klinik ve subklinik mastitis vakalarından elde edilen *S. aureus* izolatlarının büyük bir çoğunluğu koagülaz pozitifdir. Koagülaz negatif Stafilokoklar meme dokusunda mikroskopik lezyonlar ve bazı vakalarda sütte lökosit sayısında önemli artışlara neden olmalarına rağmen *S. aureus* kadar patojenik olmayıp minor patojenler olarak isimlendirilmektedir (Poutrel ve ark 1990).

*S. aureus* dışında koagulaz pozitif özellik gösteren Stafilokok türleri bulunmasına rağmen, mastitisli sütlerden izole edilen etkenlerde saptanan koagulaz pozitifliği, bakterinin *S. aureus* olarak isimlendirilmesi için birçok mikrobiyoloji laboratuvarı tarafından yeterli olarak kabul edilmektedir (Goh ve ark 1992). Bununla birlikte bazı çalışmalarda koagulaz testinin tek başına tür identifikasyonu için yeterli olmayacağı, *S. intermedius* ve *S. hyicus* gibi türlerin *S. aureus*'tan ayrımı için DNase ve Clumping faktör testlerinin de yapılmasının gerekliliği bildirilmiştir (Yavuz ve Esenal 2002). *In vitro* kültür metodunun uygulanması esnasında bazı ticari firmalar tarafından hazırlanan StaphTrac, Minitex Gram Positive Set ve API Staph gibi idendifikasyon kitlerinden faydalanmak mümkündür (Quinn ve ark 1994).

*In vitro* kültür metodunun yukarıda belirtilen dezavantajlara sahip olması, patojen etkenlerin idendifikasyonunda duyarlılık ve özgülüğü yüksek olan ve çok kısa sürede sonuç veren nükleik asit tabanlı moleküler metotların kullanılmasına yol açmıştır (Riffon ve ark 2001).

Bu amaçla polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) kullanılarak özellikle etkenin 16S ve 23S rRNA bölgelerine spesifik türe özgü primerler ile *S. aureus* identifikasyonu gerçekleştirilmiştir. PZR ile çok sayıda numunenin etkene spesifik primerler yardımıyla çok kısa süre içerisinde identifikasyonunun gerçekleştirilmesi mümkündür. Aynı zamanda PZR metodunda, kültür işlemine gerek kalmadan gerçekleştirilen, direkt numunedan DNA ekstraksiyonu ile doğru bir şekilde etken identifikasyonu yapmak mümkündür (Riffon ve ark 2001).

Bununla birlikte, son zamanlarda multipleks PZR ile birden fazla etkenin aynı anda saptanabilmesine imkan tanıyan metotlar geliştirilmiştir. Son yıllarda geliştirilen spesifik PZR ve multipleks PZR metotlarının *S. aureus* ve diğer mastitiis etkenlerinin

identifikasyonu için *in vitro* kültür metoduna alternatif metotlar olarak kullanılabilceği kanısına varılmıştır (Phuektes ve ark 2001, Riffon ve ark 2001).

### **3.8.Sağaltım, Korunma ve Kontrol**

*S. aureus* kaynaklı mastitislerin tedavisinde infeksiyonun şiddetine göre meme içi veya parenteral yolla farklı antibiyotik uygulamaları kullanılabilir. Laktasyon döneminde ortaya çıkan akut mastitislerin hızla tedavisine başlanması gerekir. Böyle durumlarda bakteriyolojik inceleme sonuçları beklenmeden uygun geniş spektrumlu bir antibiyotik seçilerek yüksek dozlarda tedaviye başlanır. İlaç uygulamasının 24 saat aralıklarla ile u kez tekrar edilmesi sonucunda yüksek oranlarda başarı sağlanabilir. Bununla birlikte laktasyon döneminde tedavisi gerçekleştirilen mastitis olgularının tümüyle iyileşmesi çok geciktiğinden dolayı kuru döneme geçildikten sonra da sağaltıma devam edilmesinde yarar vardır (şanlı 1984).

Perakut mastitis olgularında ise gangrenöz bir tablonun görülmesi durumunda ilk işlem olarak memenin tamamen boşaltılması gereklidir. Ayrıca hem parenteral hem de meme içi antibiyotik uygulamaları ile infekte meme bölümü ve hayvan kurtarılabilir. Aynı zamanda toksemiye karşı antihistaminikler ve elektrolit sıvılar verilmelidir. Subklinik *S.aureus* mastitislerinde ise 24 saat aralıklarla u doz halinde uygulanan meme içi antibiyotik preperatları ile % 30-60 oranında başarı sağlanabileceği bildirilmiştir (şanlı 1984).

Kuru dönemin ilk iki haftası ve son 7-10 günü ineklerin infeksiyona yakalanmaları açısından en duyarlı oldukları dönemdir. İnekler kuru dönemde eğer tedavi edilmezlerse spontone iyileşme oranlarının oldukça düşük olduğu görülmüştür (Baştan 2002).

Bakteriyel infeksiyonların kontrolü veya sağaltımı amacıyla antibiyotikler yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, antibiyotiklerin yaygın ve bilinçsiz kullanılması direnç gelişimine neden olmaktadır. Bu nedenle, klinik izolatların antibiyotiklere olan

duyarlılıklarının belirlenmesi sadece tedavi açısından değil, dirençli izolatların popülasyonlar arasında yayılmasının izlenmesi açısından da önem taşımaktadır (Güler ve ark 2005). Türkiye'nin farklı bölgelerinde süt ineklerinde subklinik mastitislerinden izole edilen mikroorganizmaların antibiyotiklere olan dirençlerini belirlemeye yönelik yapılan çalışmalarda, başta beta laktam antibiyotikler olmak üzere farklı gruplarda yer alan antibiyotiklere değişik direnç oranları saptanmıştır. Türütoğlu ve ark (2002), Burdur yöresinde mastitisli inek sütlerinden izole ettiği 250 stafilokok türünün % 58.4'ünü eritromisine, % 50.4'ünü penisiline, % 48'ini oksitetrasikline, % 45.6'sını ampisiline, % 42'sini amoksisiline, % 18.8'ini kloksasiline ve % 40'ının gentamisine dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Güler ve ark (2005) 1995-2004 yılları arasında Konya Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne getirilen farklı sürülere ait mastitisli süt örneklerinden izole ettikleri 250 *S. aureus* izolatının antibiyotik duyarlılıklarını belirlemişlerdir. Araştırmacılar, penisilin ve ampisiline % 63.3, oksitetrasikline % 27.9 ve trimetoprim-sulfamethoxazole'e % 1.8 oranında direnç saptamışlardır (Ergün ve ark 2004).

*S. aureus* mastitislerinin kontrolü için beş amaç gerçekleştirilmelidir. Bunlar; sağım sonrası memelerin dezenfeksiyonu ile yeni infeksiyonların önlenmesi, memelerin temizlenmesinde bireysel malzemelerin kullanımı, sağım tekniğinin tam anlamıyla usulüne uygun şekilde gerçekleştirilmesi, infekte memeye sahip hayvanların antimikrobiyal tedaviye tabi tutulması ve infekte hayvanların ayrılmasıdır (Bramley ve Dodd 1984).

*S. aureus* mastitlerinin kontrolü amacıyla en kolay ve çok daha ekonomik olan yol olarak uygun sağım prosedürleri ve hijyen kabul edilir (Hutton ve ark 1990). Sağım esnasında dikkat edilecek temizlik oldukça önemlidir. Suyun az kullanılması ve sağım öncesi meme antisepsisi yeni *S. aureus* infeksiyonlarının ortaya çıkmasını azaltır (Nickerson ve ark 1995). Buna ilaveten, sağım sonrası meme antisepsisi de *S.aureus* gibi

bulaşıcı etkenlerin azaltılmasına katkıda bulunmak bakımından önemli bir uygulamadır. Sadece sağım sonrası antisepsi uygulanan yeni mastitislerinin oluşumunu % 50 oranında azalttığı bildirilmiştir (Nickerson ve ark 1995).

Yeni mastitislerin oluşumunu azaltmak için başvurulan bir başka durum ise infekte hayvanların izolasyonudur. Wilson ve ark (1995) infekte hayvanların sürüden izolasyonlarının sağlanması ile *S. aureus* prevalansında % 29,5'ten % 16,3'e varan bir azalma olduğunu tespit etmişlerdir.

Diğer bir kontrol metodu, gebe ineklerin ve kurudaki ineklerin laktasyon dönemi ve kuru dönemi içeren dönemlerde antibiyotik tedavileridir. Laktasyon dönemi tedavisi ile birlikte aşı uygulanmasının sütteki somatik hücre sayısında önemli bir azalmaya neden olduğu gözlenmiştir (Baştan 2002). Laktasyon dönemi meme tedavisi ile birlikte parenteral antibiyotik uygulamaları sonucunda ise meme loblarında tedavide başarı oranı % 51.4 olarak tespit edilmiştir (Owens ve ark 1988). Kuru dönem tedavisi yapılan yetişkin ineklerde yeni mastitislerden % 50-80 oranında korunma sağlandığı bildirilmiştir (Nickerson 1995).

Mastitis kontrol programları, özetle mastitislerinin insidensini azaltmayı amaçlamaktadır. Bazen kullanılan metotların maliyetinin yüksek olması, süt bileşimini ve kalitesini bozması ve hatta bazı vakalarda yetersiz kalması gibi durumlar nedeniyle istenilen sonuçlar alınmamaktadır (Sischo ve ark 1993).

Stafilokokkal mastitislerin kontrolü için yapılan aşı çalışmalarında; subklinik ve klinik mastitislerden izole edilen *S. aureus* izolatları kullanılmakta ve çeşitli metotlar ile inaktive edilen bakterin, zayıflatılmış canlı bakteri, hücre duvarı ekstraktı, hücre duvarı Protein A'sı, inaktif alfa ve beta toksoidleri ve kapsüler polisakkaritler kullanılmaktadır (Hadimli 2000). Mastitislerin aşılama ile eradikasyonu ve kontrolü daima ulaşılması güç bir hedef olarak görülmektedir. Aşılama ile yeni meme içi infeksiyonlarının oranının



azaltılması, mastitis şiddetinin hafifletilmesi ve süresinin kısaltılması başarılı bir sonuç olarak kabul edilmektedir (Yancey 1993).

*S. aureus* aşısı çalışmalarında, aşılanan ve aşılanmayan hayvanlarda yeni infeksiyon oranında herhangi bir azalma olmadığı, ancak aşılananlarda uygulanan sağaltımın daha etkili olduğu ve meme sağlığı ile ilgili tüm parametreler bir araya getirildiğinde laktasyon döneminde uygulanan aşının etkin bir koruma sağlayabileceği ve problemlili sürülerde uygulamanın yararlı olabileceği bildirilmiştir (Nordhaug ve ark 1994).

Türkiye’de stafilokokkal mastitislerin kontrolü ve tedavisi için yeterli düzeyde araştırma mevcut değildir. Ülkemizde son yıllarda gerçekleştirilen Stafilokokkal mastitislere yönelik aşısı çalışmalarında, yeni *S. aureus* mastitis oranlarında azalma, şekillenen mastitislerin hafif şiddetli seyretmesi ve mevcut infeksiyonların kendiliğinden iyileşme oranlarının artması ve süt ineklerinin 6 ay korunabildiği bildirilmiştir (Hadimli 2000).

Son yıllarda özellikle *S. aureus* mastitisi başta olmak üzere bakteriyel kaynaklı mastitislerin tedavisinde karşılaşılan güçlükler, antibiyotiklere dirençli şuşların ortaya çıkması, süt ve ürünlerinde gittikçe artan miktarlarda görülen antibiyotik kalıntıları ve bunların yarattığı halk sağlığı sorunları, mastitislerin kontrol ve tedavisinde yeni strateji ve yöntemlerin geliştirilmesini zorunlu hale getirmiştir. Bu yeni gelişmeler arasında, mastitise dirençli hayvan tiplerinin geliştirilmesi, meme dokusunun yerel savunma mekanizmalarını uyaran ve güçlendiren preparatların mastitis tedavisinde kullanılması, meme dokusu savunma sistemlerini aktive edici preparatların kullanımı, karbonhidrat polimerlerinin mastitislerinin tedavisinde kullanımı ve yeni nesil antibiyotiklerin mastitislerin profilaksi ve sağaltımında kullanılması sayılabilir (Hadimli 2000 ).

### **3.9.Stafilokokkal Enterotoksinler**

*S. aureus* süt sığırlarında sıklıkla meme içi infeksiyonlara neden olan patojenlerden biridir. Etkenin sütte bulunması, farklı ekstrasellüler protein toksinleri üretmesi nedeniyle halk sağlığı açısından ciddi problemlere neden olmaktadır. Stafilokokkal enterotoksinler (SE), insanlarda toksik şok benzeri sendromlara, gıda zehirlenmesine, otoimmün hastalıklara ve allerjilere neden olmaktadır (Balaban ve Rasooly 2000).

#### **3.9.1.Stafilokokkal gıda zehirlenmeleri**

Gıda kaynaklı infeksiyonlar halk sağlığı için önemli bir yere sahiptir. Amerika Birleşik Devletleri'nde gıda kaynaklı hastalıkların yılda 60-80 milyon insanı etkilediği, yaklaşık 9000 kişinin ölümüne neden olduğu ve 5 milyar dolar ekonomik kayıba neden olduğu bildirilmiştir (Balaban ve Rasooly 2000). Stafilokokkal gıda zehirlenmeleri enterotoksin içeren gıdaların tüketilmesini müteakiben ortaya çıkar ve gıda kaynaklı gıda zehirlenmeleri içinde ikinci sırada yer alır. Stafilokokkal gıda zehirlenmeleri, kısa inkubasyon süresi (2-6 saat) ile karakterizedir. Kısa inkubasyon süresinden sonra bulantı, kusma, karın ağrısı ve diare gibi klinik bulgular görülür. Klinik olarak önce kusma görülür, bunu hemen diyare takip eder. SE'lerin neden olduğu intoksikasyonlar letal değildir, ancak yaşlılar gençlere oranla daha duyarlıdır. Nadiren, komplikasyonların varlığında ölüm görülebilir (Erol ve İşeri 2004). İntoksikasyon için gerekli enterotoksin miktarı çok düşüktür. Maymunlarda emetik dozun 5-20 µg/maymun olduğu bildirilmiştir (Balaban ve Rasooly 2000).

Stafilokokkal gıda zehirlenmelerinin % 95'i SEA-SEE tipleri % 5'i ise yeni SE tiplerinden kaynaklanmaktadır (Cremonesi ve ark 2005).

#### **3.9.2.Enterotoksinlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri**

SE'ler tek zincirli basit proteinlerden oluşan heterojen bir gruptur. Bunların çoğu nötral ya da bazik proteinlerdir. Hidroliz yoluyla 18 aminoasit üretirler ve yüksek oranda

lizin, aspartik asit, glutamik asit ve tirozin içerirler. Zincirde sadece iki adet yarım-sistein rezidüsü ile bir veya iki adet triptofan molekülü bulunur (Erol ve İşeri 2004).

SE'ler su çekici özelliğe sahiptir ve bu nedenle su ve tuzlu solüsyonlarda çözünür. pH<2'de pepsin hariç insan intestinal sisteminin proteolitik enzimlerine dirençlidir. SE'ler ısıya dayanıklıdır. Gıdalardaki enterotoksinlerin pişirme, pastörizasyon ve diğer ısı uygulamaları ile tamamen inaktive edilemedikleri bildirilmiştir (Erol ve İşeri 2004). Tibana ve ark (1987), SEA ve SEB'in 100 °C'de 90 dakikada, 120 °C'de 30 dakikada, SEC'nin 100 °C'de 180 dakikada, 120 °C'de 60 dakikada tamamen inaktive olduğunu bildirmişlerdir.

SE'ler kurumaya ve gama ışınlarına da yüksek direnç gösterirler. Rose ve ark (1988), bir tampon çözelti içindeki SEA toksinlerinin 8.0 kGy gama ışını uygulaması ile yıkımlandığını, kıyma örneklerinde ise aynı düzeydeki ışın uygulamalarından sonra SEA'nın % 27-34'nün yıkımlandığını saptamışlardır.

### **3.9.3. Enterotoksinlerin filogenetik özellikleri**

SE'ler ortak yapısal, fonksiyonel, sekans homolojisi ve filogenetik ilişkiye sahip geniş bir familyaya dahildir. Bu toksinler, SE'ler, TSST'nin iki formu ve bir grup streptokokkal pirojenik ekzotoksinleri kapsamaktadır. SE'ler aralarındaki antijenik farklılıklara göre serolojik olarak birbirlerinden ayrılmaktadır. SE'ler potansiyel gastrointestinal toksinlerdir ve nonspesifik T hücre proliferasyonunu stimüle eden süperantijenler olarak fonksiyon görürler.

Klasik olarak SE'lerin önceleri 5 tipinin (SEA, SEB, SEC, SED, SEE) olduğu kabul edilmekte iken, son yıllarda yapılan çalışmalarda SE'lerin yeni tiplerinin de var olduğu (SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO ve U) açıklanmıştır (Cremonesi ve ark 2005, Leterte ve ark 2003, Jarraud ve ark 2002).

### **3.9.4.SE'lerin filogenetik ilişkileri**

SE'ler, TSST ve streptokokal pirojenik ekzotoksinleri (SPE) de içeren geniş bir familya (PT) içinde yer almaktadır. PT familyası üyeleri filogenetik ilişkilerine göre iki gruba ayrılmıştır. Birinci grup, SEA, SEE, SED ve SPEC'yi içermekte ve aralarında % 51-81 oranında aminoasit homolojisi bulunmaktadır. İkinci grup, SEC, SEB ve SPEA'dan oluşmakta ve aralarında % 42-67 oranında aminoasit homolojisi bulunmaktadır. Yeni karakterize edilen SE'lerden SEJ birinci grupta yer alan toksinler ile yakın benzerlik gösterir ve aralarında % 52-66 oranında aminoasit homolojisi bulunmaktadır. SEI ve SEH'nin ise ikinci gruptaki toksinlere homoloji (% 31-38) yönünden benzerliği birinci gruptaki toksinlere göre biraz daha fazladır. Genel olarak her iki grup üyeleri arasında ise % 22- 33 arasında değişen aminoasit homolojisi vardır (Balaban ve Rasooly 2000).

### **3.9.5.Enterotoksinlerin süperantijen aktiviteleri**

Hücrel immun yanıtta membrana bağlı T hücre antijen reseptörleri (TCR) antijenin tanınmasında önemli bir yere sahiptir. TCR, alfa/beta veya gama/delta zincirlerinden oluşmaktadır. TCR'lerine antijenin bağlanması doğrudan meydana gelmez. TCR'lerine antijenin, antijen sunan hücreler (APC-Antigen presenting cell) üzerinde bulunan MHC sınıf I ve sınıf II molekülleri tarafından sunulması gereklidir. Enterotoksinler, süperantijen aktivitesine sahip oldukları için, MHC sınıf II molekülleri ve T hücre reseptörlerinin spesifik  $V_{\beta}$  bölgelerine nonspesifik olarak bağlanarak antijen sunan hücreler ve T lenfositlerinin aşırı aktivasyonuna neden olurlar. Yardımcı T lenfositlerinin uyarımı aşırı sitokin sentezine neden olur. Bu sitokinler ise, konakta sistemik toksik etki oluşturur ve spesifik bağışıklığı baskılar (Diker 1998).

SE'lerin MHC sınıf II molekülleriyle interaksiyonları için  $Zn^{+2}$ ,ya gereksinim bulunmaktadır (Balaban ve Rasooly 2000).

### **3.9.6.Stafilokokkal enterotoksin A (SEA)**

Stafilokokkal gıda zehirlenmelerinde en sık rastlanan enterotoksindir. SEA'yı kodlayan gen bir tempere bakteriyofajın üzerinde bulunmaktadır. *sea* geni 771 bp'lik bir büyüklüğe sahiptir. SEA 257 aminoasitten oluşmakta ve moleküler ağırlığı ise 27.1 kDa kadardır. SEA bakteri üremesinin eksponensiyel fazının ortasında eksprese edilir. Ancak, maksimal ekspresyon için fonksiyonel *agr* lokusuna (accessory gene regulator) ihtiyaç duyan *seb*, *sec* ve *sed* genlerinin aksine, *sea* geni *agr* lokusu tarafından regüle edilmemektedir (Erol ve İşeri 2004, Balaban ve Rasooly 2000).

### **3.9.7.Stafilokokkal enterotoksin B (SEB)**

SEB ekspresyonunu kodlayan gen 900 nükleotid içermektedir. SEB 267 aminoasitten oluşur ve moleküler büyüklüğü 31.4 kDa kadardır. Gıda zehirlenme vakalarından izole edilen *S. aureus* izolatlarında *seb* geni kromozomal lokalizasyon gösterirken, diğer *S. aureus* izolatlarında ise 750 kb büyüklüğündeki bir plazmid üzerinde yer almaktadır (Erol ve İşeri 2004, Balaban ve Rasooly 2000).

### **3.9.8.Stafilokokkal enterotoksin C (SEC)**

Antijenik olarak SEC'nin SEC1, SEC2 ve SEC3 olmak üzere üç farklı alt tipi bulunmaktadır. SEC3, 267 aminoasitlik bir proteindir ve 801 bp büyüklüğünde bir gen tarafından kodlanmaktadır. *sec3* geni, SEC1'i kodlayan *sec1* ile % 98 oranında nükleotid homolojisi göstermektedir. SEC3 ile SEC2'den 4 amino asitlik, SEC3 ile SEC1 arasında ise 9 amino asitlik bir fark olduğu bildirilmiştir (Erol ve İşeri 2004, Balaban ve Rasooly 2001).

### **3.9.9.Stafilokokkal enterotoksin D (SED)**

Gıda zehirlenmelerinde ikinci sırada rastlanan enterotoksin'dir. SED'yi kodlayan gen, 27.6 kb büyüklüğündeki penisilinaz plazmidi (pIB485) üzerinde yer alır. SED, 26,3 kDa moleküler ağırlığında ve 258 aminoasit büyüklüğündedir ve diğer SE'lerin dizilimine

yüksek düzeyde benzerlik gösterir. SED süperantijeninin, MHC sınıf II moleküllerine yüksek affinite ile bağlanması için  $Zn^{+2}$  ye ihtiyaç vardır (Erol ve İşeri 2004, Balaban ve Rasooly 2000).

### **3.9.10.Stafilokokkal enterotoksin E (SEE)**

SEE'yi kodlayan gen (*see*) 771 nükleotid içerir ve 29 kDa moleküler ağırlığında bir proteini kodlamaktadır. SEE, SED ve SEA ile DNA dizilimleri yönünden yakın benzerlik göstermektedir. SEE'nin, SEA ile arasında % 84 gibi yüksek bir homoloji vardır (Erol ve İşeri 2004, Balaban ve Rasooly 2000).

### **3.9.11.Stafilokokkal enterotoksin G (SEG)**

SEG, *seg* geni 777 nükleotid içerir ve 258 aminoasitlik bir proteini kodlar. SEG, yapısal olarak SpeA, SEB, SEC ve SSA'ya (streptokokal süperantijen A) büyük benzerlik gösterir (Erol ve İşeri 2004, Balaban ve Rasooly 2000).

### **3.9.12.Stafilokokkal enterotoksin H (SEH)**

SEH, 27,3 kDa moleküler ağırlığında bir enterotoksindir. SEH, grup I'de yer alan enterotoksinler ile % 36-38 oranında benzerlik gösterir. SEH, diğer SE'ler ile benzer yapıya sahiptir, fakat biyolojik özellikleri henüz tam olarak karakterize edilmemiştir. SEH, SEA'dan daha az potansiyele sahip olmasına rağmen insan T hücreleri içerisinde güçlü mitojenik aktivite gösterir ve insan MHC sınıf II molekülüne bağlanma afinitesi yüksektir (Erol ve İşeri 2004, Balaban ve Rasooly 2000).

### **3.9.13.Stafilokokkal enterotoksin I (SEI)**

*sei* geni 729 nükleotid içerir ve moleküler ağırlığı 24.928 Da olan 242 amino asitlik bir proteini kodlar. SEI, diğer SE'ler ile düşük homolojiye sahip olmasına rağmen, grup I ile grup II'ye oranla daha fazla homoloji gösterir. SEI % 26- 28 aminoasit dizilimi yönünden en fazla SEA, SEE ve SED'ye benzerlik gösterir (Erol ve İşeri 2004, Balaban ve Rasooly 2000).

### **3.9.14.Stafilokokkal enterotoksin J (SEJ)**

SED'yi kodlayan genin yer aldığı plazmidin karakterizasyonu sonucu, daha önce identifiye edilmemiş bir enterotoksini kodlayan açık okuma bölgesinin varlığını ortaya konulmuş ve SEJ olarak adlandırılmıştır. Enterotoksin D ve J'nin açık okuma bölümleri zıt yönlerde transkripte olmakta ve aralarında 895 nukleotid'lik bir bölge bulunmaktadır. Tahmini 269 aminoasitten oluşan SEJ proteini SEA, SEE ve SED ile % 64-66 DNA homolojisi gösterir. PZR analizleri, *sej* geninin SED'yi kodlayan bütün plazmidlerde bulunabileceğini düşündürmektedir (Erol ve İşeri 2004, Balaban ve Rasooly 2000, Zhang ve ark 1998).

### **3.10.Toksik Şok Sendrom Toksin-1 (TSST-1)**

İnsanlarda toksik şok sendromundan sorumlu olan TSST-1'in sentezi kromozomal bir lokalizasyona gösteren *tst* geni tarafından gerçekleştirilmektedir. TSST-1 ile SE'ler ve diğer pirojenik ekzotoksinler arasında çok az aminoasit yakınlığı bulunurken, immunolojik olarak bir yakınlık bulunmamaktadır (Blomster-Hautamaa ve ark 1986).

### **3.11.Stafilokokkal Enterotoksinlerin (SE) Fenotipik ve Genotipik Olarak**

#### **Belirlenmesi**

*S. aureus*'un neden olduğu mastitis vakalarının patojenitesi tamamen aydınlatılamamış olmasına rağmen, salgıladıkları enterotoksin'ler (SE) ve TSST-1 primer öneme sahiptir (Ferens ve ark 1998). SE'ler rutin olarak enzyme-linked immunoassay (ELISA), radioimmunoassay (RIA) ve latex agglutination testleri gibi ticari serolojik test kitleri ile tespit edilmektedir. Ancak, bu kitler SEA-SEE için geliştirilmiştir (Omoe ve ark 2002). Bu testlerin duyarlılık ve özgüllüğü tespit edilebilir toksin miktarına ve testlerde kullanılan reagentlerin saflığına bağlıdır. Herbir toksin tipinin belirlenmesi bu serolojik testlerle, 3-24 saatlik bir sürede ve 0.25-1 ng/ml hassasiyette yapılabilmektedir. Ancak, yanlış pozitif sonuçlarda saptanabilmektedir (Chen ve ark 2001).

Klinik ve subklinik mastitisli inek süt ve gıda maddelerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarında klasik (SEA-SEE) ve yeni identifiye edilen (SEG-SEI) enterotoksin genleri ile *tst* geninin tespitine yönelik multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) teknikleri geliştirilmiştir (Katsuda ve ark 2005, Lim ve ark 2004, Fueyo ve ark 2005, Akineden ve ark 2001, Vimercati ve ark 2006). Geliştirilen bu multipleks PZR tekniklerinin, hızlı, güvenilir, duyarlılık ve özgüllüğünün yüksek olduğu bildirilmiştir.

### **3.12.S. aureus İzolatlarının Genotiplendirilmesi**

Klinik vakalardan izole edilen mikroorganizmaların kaynağının belirlenmesi epidemiyolojik açıdan önem taşımaktadır. Bu nedenle, klinik vakalardan izole edilen aynı türden mikroorganizmaların belirlenmesi diğer bir ifade ile tiplendirilmeleri gereklidir. Bu sayede, infeksiyon kaynaklarının belirlenmesi, virulent izolatların saptanması ve aşılama programlarının izlenmesi olanak dahilindedir (Strulens 1998).

Bakterilerin tiplendirilmesi, fenotipik ve genotipik olmak üzere iki şekilde yapılmaktadır. Fenotipik yöntemler, bakterilerin genetik özelliklerini yansıtmakla birlikte duyarlılıklarının az olduğu ve dezavantajlarının bulunduğu bildirilmiştir. Fenotipik metodların başlıca dezavantajları; fenotipik karakterlerin her zaman eksprese olmaması, belli bir fenotipik özelliği kodlayan genin kaybolması (örn: plazmid), yapılaşlarının zahmetli oluşu, üreme koşullarından etkilenmesi, mutasyonlardan etkilenmesi sayılabilir (Tenevor ve ark 1994, Kapur ve ark 1995). *S. aureus* izolatlarının fenotipik tiplendirilmesinde yaygın olarak kullanılan teknikler arasında; antibiyotiplendirme (Lange ve ark 1999), biyotiplendirme (Lopes ve ark 1990, Lange ve ark 1999) ve faj tiplendirme (Blair ve Williams 1961) sayılabilir.

Son yıllarda çok değişken olan fenotipik özelliklere dayalı tiplendirme metodlarının yerini bakterilerin genetik karakterlerini belirlemeye yönelik genotiplendirme yöntemleri almıştır. Genotiplendirme yöntemlerinin, fenotiplendirme metodları ile kıyaslandığında,



tekrarlanabilirlik, tiplendirilebilirlik ve ayırıcı güç yönünden üstünlükleri bulunmaktadır. Bu yöntemler ile epidemiyolojik olarak ilişkili aynı tür içindeki izolatların ayırımı yapılabilmektedir. Genotiplendirme metotları, plazmid profilinin belirlenmesi, belirli bir gen bölgesinin tiplendirilmesi, tüm genomun tiplendirilmesi ve DNA sekans analizi başlıkları altında toplanabilir (Tenevor ve ark 1994). *S. aureus* izolatlarının tiplendirilmesinde, plazmid profili analizi (Baumgartner ve ark 1984), koagulaz (*coa*) (Goh ve ark 1992, Hookey ve ark 1998) bölgesi ile Protein-A (*spa*) geninin X bölgesindeki (Frenay ve ark 1996) polimorfizmin RFLP-PZR ile saptanması, RAPD-PZR (Matthews ve ark 1994, Fitzgerald ve ark 1997), amplified fragment length polymorphism (AFLP) (Cuteri ve ark 2004) ve pulsed field gel electrophoresis (PFGE) (Struelens ve ark 1992, Bannerman ve ark 1995) ile yapılmaktadır.

Son yıllarda *S. aureus* izolatlarının *coa* genine dayalı RFLP-PZR genotiplendirilmesi yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu teknik, *coa* geninin amplifiye edilmesi ve restriksiyon endonukleaz enzimlerinden biri ile kesilmesini içerir. Tekniğin, uygulanması, yorumlanması, bir gün gibi kısa sürede sonuçlanması gibi avantajları bulunmaktadır (Goh ve ark 1992, Lange ve ark 1999, Schlegelova ve ark 2003).

Bu çalışmada, (i) subklinik inek mastitislerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının toksin genleri ve (ii) koagulaz gen polimorfizmi yönünden karakterizasyonunun yapılması amaçlandı.

## 4.MATERYAL VE METOT

### 4.1.Süt Örnekleri

*S. aureus* izolasyonu amacıyla Hatay il ve ilçelerindeki küçük aile işletmelerindeki toplam 400 süt ineği subklinik mastitis yönünden CMT ile incelendi. Süt örnekleri, CMT ile subklinik mastitis yönünden şüpheli (+, ++, +++) bulunan toplam 280 inekten alındı.

Aseptik şartlarda alınan süt örnekleri steril tüplere 10 ml alınarak soğuk zincir içinde kısa sürede laboratuara getirildi.

### 4.2.*S. aureus* İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Subklinik mastitisli toplam 512 süt örneği % 7 defibrine koyun kanı ilave edilmiş kanlı agara inokule edilerek 37 °C'de 24 saat inkube edildi. Üreme görülen besiyerlerindeki koloniler Gram boyama ve biyokimyasal testlere (katalaz, oksidaz, oksidasyon-fermentasyon testi) tabi tutularak incelendi. Bu testlerde katalaz pozitif, oksidaz negatif, oksidasyon fermentasyon testinde fermentatif reaksiyon gösteren, Gram boyama sonucunda tipik üzüm salkımı görünümündeki koklar *Staphylococcus* spp olarak izole edildi.

### 4.3.DNA Eksraksiyonu

DNA ekstraksiyonu Güler ve ark (2005) tarafından bildirilen yönteme göre yapıldı. Bu amaçla 10 ml Triptik Soy Brot'a (TSB) ekilen *S. aureus* izolatları bir gece 37 °C'de inkubasyona bırakıldıktan sonra 3 500 g'de 10 dk santrifüj edildi. Supernatant atıldıktan sonra pellet 1 mL TES buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA; 100 mM NaCl) ile yeniden süspansiyon edilerek üzerine 2 µL lizostafin ve 12.5 µg lizozim eklendi ve 37 °C'de 30 dk inkubasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda karışıma 20 µL % 10'luk sodyum dodesil sulfat (sodium dodecyle sulfat) solüsyonu eklenerek oda ısısında 15 bekletildi. DNA ekstraksiyonu sırasıyla fenol-kloroform-izoamil alkol (25:24:1) ve kloroform-izoamil alkol (24:1) kullanılmak suretiyle yapıldı. DNA'nın presipitasyonu amacıyla, eşit

miktarda isopropil alkol eklendikten sonra -20 °C'de bir gece bekletildi. Daha sonra süspansiyon 11 600 g'de 10 dk süreyle santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Elde edilen pellet sırasıyla % 90 ve % 70'lik etanol ile her basamaktan sonra 12 000 g'de 10 dk santrifüj işlemi uygulanarak yıkandı. Son olarak kapakları açık halde tüpler ters çevrilerek pelletin kuruması sağlandı ve 100 µl steril distile suda süspanse edildi. Bu süspansiyondan 5 µl alınarak PZR'de kalıp DNA olarak kullanıldı.

#### **4.4.Toksin Genlerinin PZR ile Saptanması**

##### **4.4.1.Stafilokokkal enterotoksin genlerinin PZR ile saptanması**

SE genlerinin saptanmasında iki farklı primer karışımı kullanılarak iki değişik multipleks PZR yapıldı. Birinci multipleks PZR karışımı; 5 µl 10x PZR buffer, herbir dNTP'den 200 µM, 2.5 U *Taq* DNA polimeraz, 3 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, *sea*, *seb*, *sec* ve *see* primerlerinin her birinden 20 pmol, *sed* primerinden 40 pmol ve 5 µl kalıp DNA olacak şekilde hazırlandı ve hacmi steril distile su ile 50 µl'ye tamamlandı. İkinci primer seti, 5 µl 10x PZR buffer, 8 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, herbir dNTP'den 200 µM, 5 U *Taq* DNA polimeraz enzimi, *seg*, *seh*, *sei* ve *sej* primerlerinden 50 pmol ve 5 µl kalıp DNA olacak şekilde hazırlandı ve hacmi steril distile su ile 50 µl'ye tamamlandı. DNA amplifikasyonu her iki karışım için 94 °C'de 5 dk ön denatürasyon aşamasını takiben, toplam 35 PZR siklusu 94 °C'de 2 dk denatürasyon, 57 °C'de 2 dk hibridizasyon ve 72 °C'de 1 dk sentez olarak gerçekleştirildi. DNA amplifikasyonu Techne-312 marka ısı döngü cihazında (Thermo Hybaid, İngiltere) gerçekleştirildi.

Amplifiye edilen PZR ürünleri % 1,5'luk agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutulduktan sonra etidium bromid (10 mg/ml) ile 30 dk süreyle boyandı ve ultraviyole (uv) transilluminatörde incelenerek sonuçlar değerlendirildi. Oluşan bantların moleküler ağırlığını saptamak amacıyla 100 bp'lik DNA marker kullanıldı.

#### **4.4.2.tst geninin PZR ile saptanması**

Toplam 50 µl hacimde hazırlanan PZR karışımına; 5 µl 10× PZR buffer, 3 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, her bir dNTP'den 200 µM, 2.5 U *Taq* DNA polimeraz ve *tst* primerinden 20 pmol ve 5 µl kalıp DNA ilave edildi. PZR amplifikasyonunda 94 °C'de 5 dk ön denatürasyon aşamasını takiben, toplam 35 PZR siklusu 94 °C'de 2 dk denatürasyon, 57 °C'de 2 dk hibridizasyon ve 72 °C'de 1 dk sentez olarak gerçekleştirildi. Son siklusu müteakip 72 °C'de 5 dk ekstra sentez işlemi yapıldı. Amplifiye edilen PZR ürünleri % 1,5'lük agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutulduktan sonra etidium bromid (10 mg/ml) ile 30 dk süreyle boyandı ve ultraviyole (uv) transilluminatörde incelenerek sonuçlar değerlendirildi. Oluşan bantların moleküler ağırlığını saptamak amacıyla 100 bp'lik DNA marker kullanıldı.

#### **4.5.S. aureus İzolatlarının Moleküler Tiplendirilmesi**

##### **4.5.1.Koagulaz (*coa*) geninin PZR amplifikasyonu (*coa*-PZR)**

*S. aureus* izolatlarına ait DNA örneklerinde koagulaz genin varlığı Goh ve ark (1992) tarafından bildirilen bir çift spesifik primer kullanılarak yapıldı. Toplam 50 µl total hacimde hazırlanan PZR karışımına, 5 µl 10x PZR buffer, 5 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, herbir dNTP'den 200 µM, 1.25 U *Taq* DNA polimeraz, herbir primerden 50 pmol ve 25 ng template DNA ilave edildi. PZR amplifikasyonu, 95 °C'de 2 dk ön denatürasyon işlemi müteakiben, toplam 30 siklus 95 °C'de 30 sn denatürasyon, 58 °C'de 2 dk hibridizasyon ve 72 °C'de 2 dk sentez olarak yapıldı. Son siklusu takiben 72 °C'de 10 dk ekstra sentez işlemi gerçekleştirildi.

##### **4.5.2.Koagulaz (*coa*) geninin RFLP analizi (*coa*-RFLP)**

Elektroforez işlemi sonrasında *coa* geni yönünden pozitif bulunan PZR ürünlerinin *AclI* (10 U/µl) restriksiyon enzimi ile kesimleri gerçekleştirildi. Bu amaçla, 10 µl PZR ürünü, 1.5 µl restriksiyon enzimi, 2 µl 10x restriksiyon buffer ve 18 µl steril distile su ile

karıştırıldıktan sonra 37 °C’de bir gece inkubasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda oluşan PZR ürünleri % 2’lik agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutuldu. Etidium bromid ile boyamayı müteakiben oluşan profiller UV transilluminatörde analiz edilerek fotograflandı.

#### **4.6.Kültür ve PZR Aşamalarında Kullanılan Ayıraçlar**

##### **4.6.1.İzolasyon ve identifikasyonda kullanılan besiyerleri ve ayıraçlar**

###### **California Mastitis Test (CMT) Ayıracı**

Aniyonik deterjan	100 ml
Bromkrezol moru (1/300)	50 ml
Distile su	900 ml

Bromkrezol moru 0.17 g tartıldıktan sonra 50 ml distile su içinde eritildi. Üzerine 100 ml anyonik deterjan ve 900 ml distile su ilave edilip iyice karıştırıldıktan sonra pH 6.8’e ayarlandı.

###### **Kanlı Agar (Merck, Almanya)**

Nutrient Substrat	20 g
Agar	15 g
Sodyum Klorid	5 g

Kanlı agar hazırlamak için 40 g kanlı agar 1 L distile su içinde eritildikten sonra 121 °C’de 15 dk otoklavlandı. Besi yeri 45-50 °C’ye kadar soğutulduktan sonra içerisine % 7 oranında defibrine koyun kanı ilave edildi. Besiyeri ve kan dikkatlice karıştırıldıktan sonra steril petri kutularına taksim edildi.

###### **Triptik Soy Agar (TSA) (Merck, Almanya)**

Kasein	17 g
Pepton	3 g
Agar	15 g
Sodyum Klorid	5 g

TSA besiyeri 40 g tartılıp 1 L distile su içerisinde eritilip, 121 °C’de 15-20 dk otoklavlandı. Besi yeri 45-50 °C’ye kadar soğutulduktan sonra steril petri kutularına taksim edildi.

**Tripton Soy Brot (TSB) (Merck, Almanya)**

Kazein	17 g
Pepton	5 g
Di-potasyum hidrojen fosfat	2.5 g
Glukoz	2.5 g
Sodyum klorid	5 g

TSB besiyeri 30 g tartılıp 1 L distile su içerisinde eritildikten sonra % 15 oranında gliserin ilave edildi ve 121 °C’de 15-20 dk otoklavlandı. Steril ependorf tüplerine 1 ml dağıtılarak *S. aureus* izolatlarının uzun süreli -20 °C’de derin dondurucuda saklanması için kullanıldı.

**Katalaz test ayıracı:** Çalışmada % 3’lük hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) kullanıldı. Gram boyama sonucunda gram pozitif kok görünümündeki izolatların TSA’da üretilen saf ve taze kültürlerinden bir koloni alınarak temiz bir lam üzerinde ezildi. Lam üzerindeki koloniye % 3’lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonundan bir damla damlatıldı. Reaksiyon sonucunda gaz kabarcıklarının görülmesi katalaz pozitif, kabarcık görülmemesi ise katalaz negatif olarak değerlendirildi.

**Oksidaz test ayıracı:** N,N,N, tetrametil-p-fenilendiamin dihidroklorid’in % 0,5’lik solüsyonu kullanıldı. *Staphylococcus* spp ve *Streptococcus* spp olarak şüphelenilen izolatları *Mirococcus* spp’lerden ayırmak için oksidaz testi uygulandı. Oksidaz test ayıracından bir öze dolusu alınıp şüpheli izolatların kolonilerine damlatıldı. Reaksiyon sonucunda ayıracın mor rengini almayan koloniler oksidaz negatif olarak değerlendirildi ve *Staphylococcus* spp ve *Streptococcus* spp şüpheli olarak ayrıldı.

## **Oksidasyon-Fermentasyon(O/F) Testi Besi Yeri (Hugh and Leifson's Medium)**

**(Merck, Almanya)**

Pepton	2 g
Sodyum klorid	5 g
Dibazik Potasyum Fosfat	3 g
Agar	1.5 g
Distile Su	1000 ml
% 0.2 Bromtimol mavisi	15 ml

Besiyeri bromtimol mavisi katılmadan önce distile su içerisinde eritildi. pH 7.1'e ayarlanıp bromthymol blue eklendikten sonra 121 °C'de 15 dk otoklavlandı. Son konsantrasyon % 1 olacak şekilde steril glikoz eklendi ve iyice karıştırıldıktan sonra steril tüpler içerisine 10'ar ml dağıtıldı.

Gram boyama sonucunda şüpheli izolatların her birinin O/F besiyeri bulunan iki tüp içerisine ekimleri gerçekleştirildi. Tüplerden birinin üzerine sıvı parafin damlatıldıktan sonra 24 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonucunda her iki tüpteki besiyeri renginin mavi-yeşilden sarıya dönüşmesi fermentatif olarak değerlendirildi. Bu şekilde reaksiyon veren izolatlar *Staphylococcus* spp ve *Streptococcus* spp şüpheli olarak ayrıldı.

### **4.6.2.PZR işleminde kullanılan ayıraçlar**

#### **4.6.2.1.DNA ekstraksiyonunda kullanılan ayıraçlar**

**Lizostafin solüsyonu:** Lysostaphin solüsyonu (Sigma, St. Louis, Amerika Birleşik Devletleri) ml'sinde 100 µg olacak şekilde hazırlandı. *S. aureus* izolatlarının DNA ekstraksiyonunda 12.5 µl kullanıldı.

**Lizozim solüsyonu:** Stok lizozim (Sigma, St. Louis, Amerika Birleşik Devletleri) solüsyonu ml'sinde 100 µg olacak şekilde hazırlandı. *S. aureus* izolatlarının DNA ekstraksiyonunda 12.5 µl kullanıldı.

**Proteinaz K solüsyonu:** Proteinaz K Solüsyonu (Sigma, St. Louis, Amerika Birleşik Devletleri) 1 ml'sinde 100 µg olacak şekilde hazırlandı

**Tris-HCl solüsyonu:** Tris-HCl solüsyonu (Sigma, St. Louis, Amerika Birleşik Devletleri) çalışmada 1/10 oranında sulandırılarak 0.1 M'lık solüsyonu hazırlandı

**1x Tris-EDTA (TE) buffer:** Ticari olarak temin edilen 1x Tris-ETDA (Promega, Madison, Amerika Birleşik Devletleri) tableti 100 ml steril distile su içerisinde eritildikten sonra kullanıldı.

#### **4.6.2.2.PZR-RFLP analizinde kullanılan ayıraçlar**

##### **10x PZR Buffer (Fermentas, Litvanya)**

750 mM Tris-HCl (pH 8,8; 25 °C)

200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>

% 0.1 Tween 20

Her PZR numunesi için 5 µl kullanıldı.

##### **10x Tris-Borik Asit-EDTA (TBE) Elektroforez Tampon Solüsyonu**

Tris baz 108 g

Borik asit 55 g

EDTA (0.5 M, pH 8.0) 40 ml

##### **TES buffer**

10 mM Tris-HCl, pH 8.0

1 mM EDTA

100 mM NaCl

Yukarıdaki maddeler tartılıp ihtiyaç duyulan miktarda hazırlandı ve her örnek için 1 ml kullanıldı.



### **Fenol-Kloroform-İzoamil Alkol Karışımı**

Fenol 500 ml/L

Kloroform 480 ml/L

İzoamil alkol 20 ml/L

pH (20 °C) 7.6-8.0

Fenol-Kloroform-İzoamil Alkol (Applichem, Darmstad, Almanya) karışımından her bir örnek için 600 µl miktarında kullanıldı.

**Absolut etanol:** Absolut etanol (Merck, Darmstad, Almanya) DNA'nın belirli ekstraksiyon aşamalarında kullanılmak üzere % 90 ve % 70 oranlarında hazırlandı.

**MgCl<sub>2</sub>:** 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas, Litvanya) her PZR numunesi için metoda belirtilen miktarlarda kullanıldı.

**dNTP Miks (2 mM):** dNTP miks (Fermentas, Litvanya) her PZR numunesi için 5 µl kullanıldı.

**Taq DNA polimeraz:** Taq DNA Polimeraz (Fermentas, Litvanya) çalışmada 2.5-5 U arasında (0.5-1 µl) kullanıldı.

**Primerler:** Çalışmada kullanılan tüm primerler (Thermo, Almanya) firmasından temin edildi. Primerler 25-50 pmol olacak şekilde sulandırıldıktan sonra PZR reaksiyonlarında kullanıldı (Tablo-1).

Tablo 4.1: *S. aureus* izolatlarında virulens genlerinin belirlenmesinde ve tiplendirilmesinde kullanılan primerler

Gene	Sekans (5' → 3')	Amplikon	Literatür
<i>sea</i>	GGT TAT CAA TGT GCG GGT GG	102	Mehrotra ve ark (2001)
	CGG CAC TTT TTT CTC TTC GG		
<i>seb</i>	GTA TGG TGG TGT AAC TGA GC	164	
	CCA AAT AGT GAC GAG TTA GG		
<i>sec</i>	AGA TGA AGT AGT TGA TGT GTA TGG	451	
	CAC ACT TTT AGA ATC AAC CG		
<i>sed</i>	CCA ATA ATA GGA GAA AAT AAA AG	278	
	ATT GGT ATT TTT TTT CGT TC		
<i>see</i>	AGG TTT TTT CAC AGG TCA TCC	209	
	CTT TTT TTT CTT CGG TCA ATC		
<i>seg</i>	CGT CTC CAC CTG TTG AAG G	327	
	CCA AGT GAT TGT CTA TTG TCG		
<i>seh</i>	CAA CTG CTG ATT TAG CTC AG	360	
	GTC GAA TGA GTA ATC TCT AGG		
<i>sei</i>	CAA CTC GAA TTT TCA ACA GGT AC	465	
	CAG GCA GTC CAT CTC CTG		
<i>sej</i>	CAT CAG AAC TGT TGT TCC GCT AG	142	
	CTG AAT TTT ACC ATC AAA GGT AC		
<i>tst</i>	ACC CCT GTT CCC TTA TCA TC	326	
	TTT TCA GTA TTT GTA ACG CC		
<i>coa</i>	CGA GAC CAA GAT TCA ACA AG	Random	Goh ve ark (1992)
	AAA GAA AAC CAC TCA CAT CA		

**Alul restriksiyon enzimi:** Alul restriksiyon enzimi (Fermentas, Litvanya) her PZR ürünü 1.0 µl enzim kullanıldı.

**10x Restriksiyon Buffer**

33 mM Tris asetat (pH 7,9)

10 mM Magnezyum asetat

66 mM Potasyum asetat

0,1 mg/ml Sığır Serum Albümin (BSA)

Her PZR ürünü için 1,5 µl 10x Restriksiyon buffer'ı (Fermentas, Litvanya) kullanıldı.

**4.6.2.3. Elektroforez işleminde kullanılan ayıraçlar**

**10x Tris-Boric Acid-EDTA (TBE) Elektroforez Tampon Solüsyonu**

Tris baz 108 g

Borik asit 55 g

EDTA (0.5 M, pH 8.0) 40 ml

Yukarıdaki maddeler tartılıp distile su ile 1L'ye tamamlandı ve pH 8,0 olacak şekilde ayarlandı. Elektroforez solüsyonu olarak 1/10 oranında sulandırılarak kullanıldı.

**Agaroz:** PZR ürünlerinin gözlenmesi için hazırlanan agaroz jeli (Prona, İtalya) 1x TBE ile % 1.5 oranında hazırlandı.

**100 bp DNA marker:** 100 bp DNA Marker (Fermentas, Litvanya) 1/6 oranında sulandırıldı ve agaroz jel kuyucuğuna 5 µl yüklendi.

**6x yükleme boyası solüsyonu:** Yükleme Boyası Solüsyonu (Fermentas, Litvanya) 1/5 oranında sulandırıldı ve her 20 µl PZR ürünü için 5 µl kullanıldı.

**Etidium bromid:** Etidium bromide (AppliChem, Darmstad, Almanya) solüsyonundan 0.5 ml alınarak distile su ile 15 ml'ye tamamlandı. Agaroz jelin boyanması için 300 ml distile suya 600 µl etidium bromid katılarak kullanıldı.

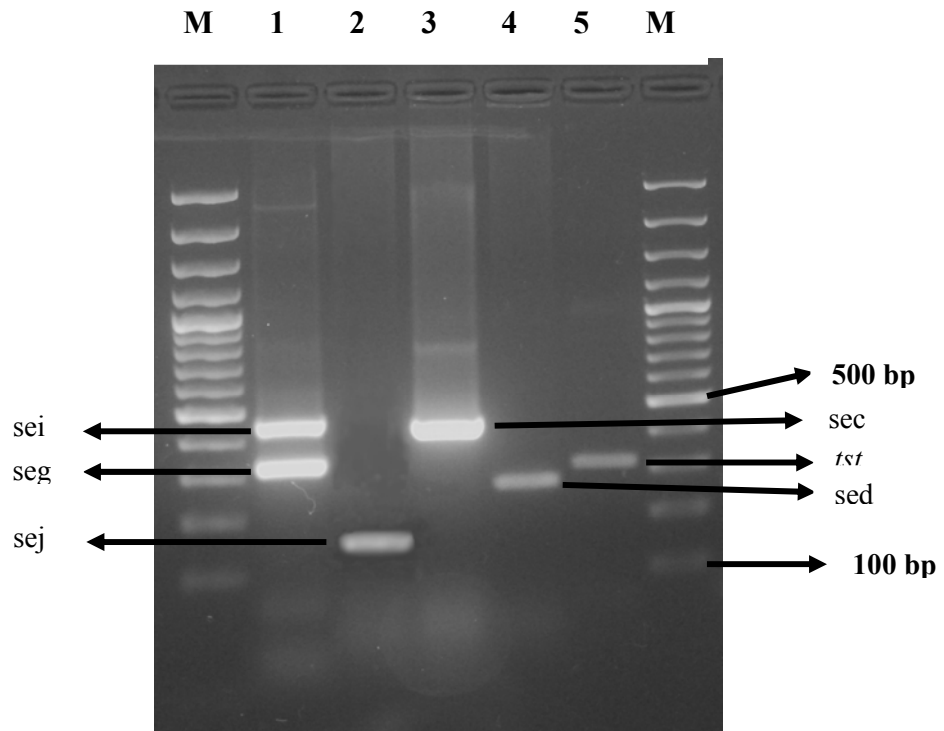
## 5.BULGULAR

### 5.1.S. aureus İzolasyon ve İdentifikasyon Sonuçları

Subklinik mastitisli 280 inekten alınan toplanan süt örneklerinin % 64.5'i (330/512) uygulanan kültür ve biyokimyasal işlemler sonucunda *Staphylococcus* spp, bunlardan ise 130'u *S. aureus* olarak izole ve identifiye edildi.

### 5.2.S. aureus İzolatlarının Toksin Gen ve Genotiplerine Göre Dağılımı

İncelenen 130 *S. aureus* izolatının 60 (% 46.2)'sında bir veya birden fazla toksin geni tespit edildi. Toksin genleri yönünden pozitif bulunan izolatlar gen kombinasyonları Tablo 2'de sunulmuştur. Pozitif bulunan izolatların 18'inde *seg - sei* ve *sec*, 14'ünde *sed - sej*, 6'sında *tst*, 2'sinde *sed - sej - seg - sei*, 1'er izolatta ise *sec - seg - sei* ve *sec - tst* genleri tespit edildi. *sea*, *seb*, *see* ve *seh* genleri yönünden ise tüm izolatlar negatif bulundu.



Şekil 5.1: *S. aureus* izolatlarında tespit edilen toksin genleri.

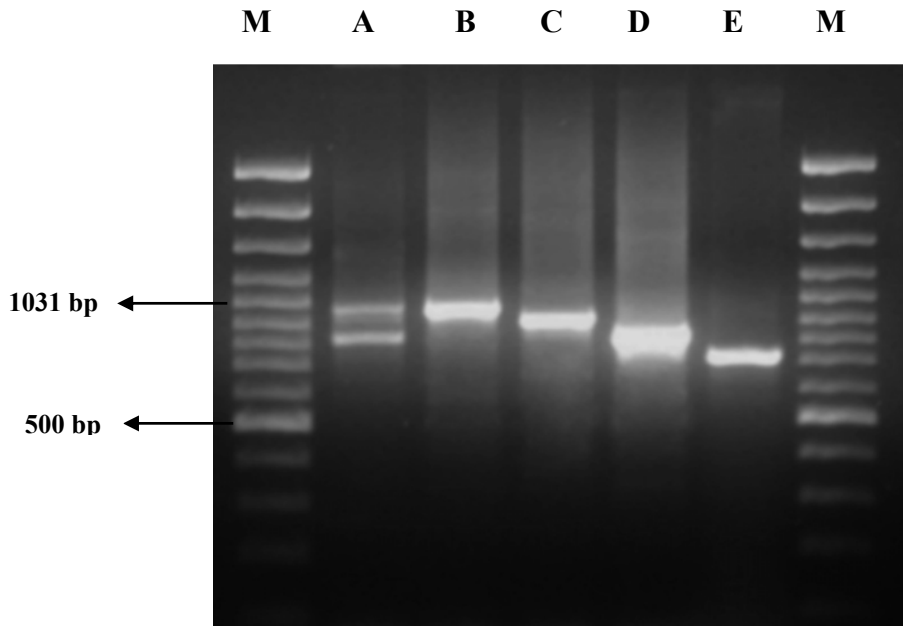
M: DNA ladder (100 bp), 1: *seg-sei*, 2: *sej*, 3: *sec*, 4: *sed*, 5: *tst*

Tablo 5.1: Toksin genlerinin RFLP alt tiplerine göre dağılımı

Genotip		Toksin Genleri								
PZR	RFLP	<i>tst</i>	<i>sec</i>	<i>sec-tst</i>	<i>sed-sej</i>	<i>seg-sei</i>	<i>sed-sej-seg-sei</i>	<i>sec-seg-sei</i>	Negatif	Toplam
A (810+1050 bp)	A	-	-	-	-	2	-	-	1	3
B (970 bp)	B1	2	8	1	9	1	-	-	13	34
	B2	-	6	-	5	1	-	-	9	21
C (890 bp)	C1	-	-	-	-	-	-	-	3	3
	C2	-	-	-	-	-	-	-	3	3
D (810 bp)	D1	-	-	-	-	-	-	-	10	10
	D2	-	-	-	-	-	-	-	4	4
	D3	-	-	-	-	4	-	-	6	10
E (730 bp)	E1	4	4	-	-	6	2	1	17	34
	E2	-	-	-	-	4	-	-	4	8
		6	18	1	14	18	2	1	70	130

### 5.3.S. aureus coa-PZR Bulguları

İncelenen 130 *S. aureus* izolatının 127'sinde moleküler büyüklükleri 730-970 bp arasında değişen tek band ve 3'ünde ise moleküler büyüklüğü 810 + 1050 bp olan iki band tespit edildi (Şekil 2). Pozitif *coa*-PZR ürünleri 5 farklı tip (A, B, C, D, E) meydana getirdi.

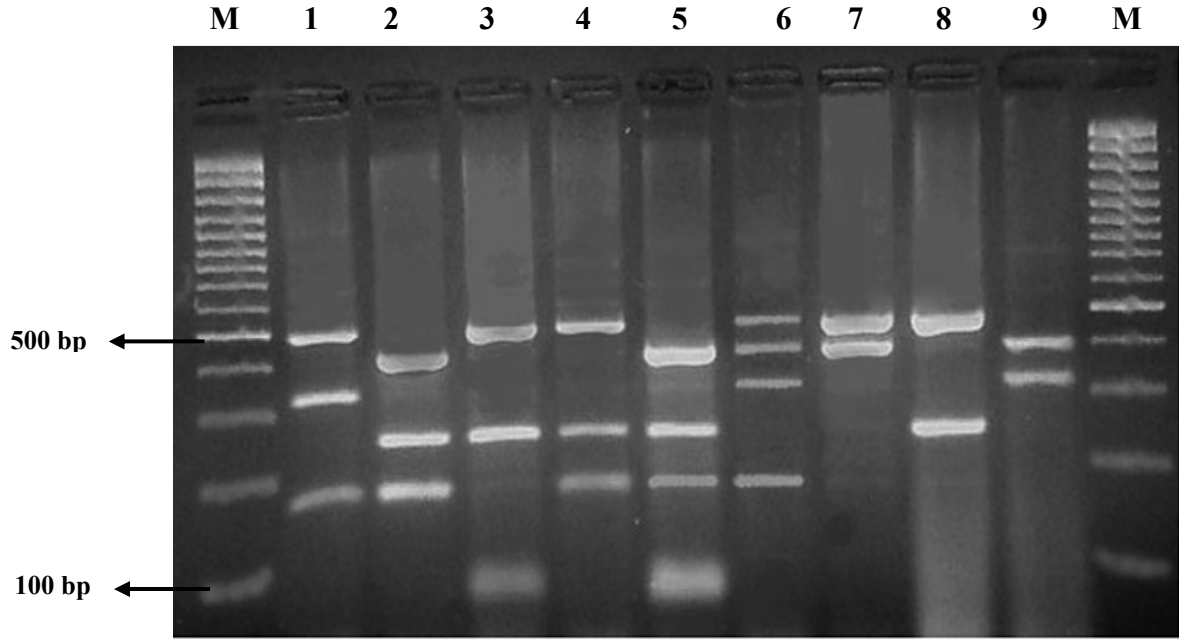


Şekil 5.2: *S. aureus* izolatlarının *coa*-PZR ürünlerinin agaroz jelde görünümü.

M: DNA ladder (100 bp), A: çift band amplifikasyon ürünü, B-E: çift band amplifikasyon ürünleri

#### 5.4.S. aureus coa-RFLP Bulguları

*coa* pozitif PZR ürünlerinin *AluI* restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucu toplam 9 farklı restriksiyon profili elde edildi (Şekil 3). Tip B (B1 ve B2) ve Tip C (C1 ve C2)'ye ait izolatlar iki, Tip D'ye ait izolatlar ise 3 alt tipe (D1, D2 ve D3) ayrıldı. Tip B (55 izolat) ve Tip E (42 izolat) en dominant tipler olarak belirlendi.



Şekil 5.3: *AluI* ile kesilmiş *coa*-PZR ürünlerinin agaroz jelde görünümü.

M: DNA ladder (100 bp), 1-9: farklı *AluI* restriksiyon profilleri

## 6.TARTIŞMA VE SONUÇ

Mastitis, süt sgircilik endüstrisinin ekonomik yönden en önemli problemlerinden biridir. Kompleks bir etiyolojiye sahip olan mastitisin etiyolojisinde mikroorganizmalar, bunların içinde de bakteriler önemli bir yere sahiptir. Bakteriyel etkenlerin sgir mastitislerindeki önemleri ülkelere ve aynı ülkenin değişik bölgelerine göre farklılık göstermesine rağmen, *S. aureus* mastitis vakalarından sıklıkla izole edilmektedir (Aydın ve ark 1995). *S. aureus* izolatlarının patojenitesi üretilen ekzotoksin ve diğer virulens faktörlerine bağlıdır. Bu faktörlerden stafilokokkal enterotoksinler (SE) ve toksik şok sendrom toksin-1 (TSST) superantijen aktivitesine de sahiptirler. T-lenfositlerini stimüle ederek ateş, şok ve lme kadar varan aşırı sitokin sentezine yol açar (Johnson ve Magazine 1988).

Dünyanın farklı ülkelerinde yapılan çalışmalarda, SE genlerinin varlığı ve dağılımının büyük ölçüde farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Katsuda ve ark (2005) Japonya'da inceledikleri mastitisli sütlerden izole edilen 270 *S. aureus* izolatının % 67.8'ini toksin genleri yönünden pozitif bulmuşlardır. Araştırcılar, *sea* ve *seb* genlerini tespit edemezken, en yaygın toksin tipinin *tst*, *sec*, *seg* ve *sei* olduğunu bildirmişlerdir. Zschöck ve ark (2005) Almanya'da mastitisli süt ineklerinden izole edilen 104 *S. aureus* izolatını klasik (*sea-see*) ve yeni (*seg-sei*) enterotoksin genleri yönünden incelemişler ve % 58.7'ini toksin genleri yönünden pozitif bulmuşlardır. Akineden ve ark (2001) Almanya'da subklinik inek mastitisli ineklerden izole edilen 103 *S. aureus* izolatını *sea-see*, *seg-sei* ve *tst* genleri yönünden incelemişler ve % 71.4'n toksin genleri yönünden pozitif bulmuşlardır. Araştırcılar, *seb*, *see* ve *seh* genleri yönünden pozitiflik saptayamazken en yaygın toksin tipini *sei-seg* (% 16.4) ve *sed-sej* (% 23.0) olarak belirlemişlerdir. Lim ve ark (2004) Kore'de mastitisli süt örneklerinden izole ettikleri 166 *S. aureus* izolatını klasik (*sea-see*) enterotoksin genleri ve *tst* geni yönünden incelemişler, toksin genleri yönünden izolatların % 22'sini pozitif bulurken, *sed-see* genlerini



tespit edememişlerdir. Silva ve ark (2005) Brazilya’da subklinik mastitisli ineklerden izole edilen 64 *S. aureus* izolatının % 9.4’ünde *sea-seb* ve *sec* genleri yönünden pozitiflik tespit etmişlerdir. Vimercati ve ark (2006), İtalya’da subklinik mastitisli inek sütlerinden izole ettikleri 51 *S. aureus* izolatını *sea-see*, *seg-sei* ve *sel* genleri yönünden incelemişler ve izolatların % 75’ini SE genleri yönünden pozitif bulurlarken, *seb* ve *see* genlerini tespit edememişler ve en yaygın toksin tipini *sea*, *sed-sej* olarak belirlemişlerdir. Bu çalışmada, incelenen 130 *S. aureus* izolatının % 46,2 (60)’si bir veya birden fazla toksin geni yönünden pozitif bulunurken, *sea*, *seb*, *see* ve *seh* genleri yönünden negatif olarak saptandı. En yaygın SE kombinasyonu *seg-sei* ve *sed-sej* olarak belirlendi.

Sığır mastitis vakalarında *S. aureus* izolatlarının sentezlediği enterotoksinlerin infeksiyonun gelişimi üzerindeki rolü tartışmalıdır. Ancak, enterotoksinlerin tek veya TSST-1 ile birlikte superantijen olarak çalışarak T-lenfositlerini uyararak aşırı sitokin sentezine neden olduğu ve immun yanıtı inhibe ettiği bildirilmiştir (Ferens ve ark 1998). Sutra ve Poutrel (1994) *sec* ve *sed* enterotoksinlerinin yangısal faktörleri indüklemeleri nedeniyle meme içi infeksiyon için gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Zecconi ve ark (2006) İtalya’da çiftliklerden izole edilen *S. aureus* izolatlarının en az bir enterotoksin geni taşıdığını, özellikle de *sej* geninin bir risk faktörü olduğunu ifade etmişlerdir. Fakat, Larsen ve ark (2000) SE’lerin mastitis oluşumu için çok önemli olmadığını, çünkü Danimarka’da inek mastitislerinden izole ettikleri 414 *S. aureus* izolatının sadece 1’nin *sec* geni taşıdığını tespit etmişlerdir. Bununla birlikte araştırmacılar, yeni tanımlanan enterotoksin genlerini (*seg-sei*) araştırmamışlardır.

SEA, SEB ve SED’nin insanlardaki stafilokokkal gıda zehirlenmesi salgınlarında sıklıkla tespit edilen enterotoksinlerdir (Kérouanton ve ark 2007). Yeni tanımlanan enterotoksinlerin insan sağlığı ve inek mastitisleri açısından önemi tam olarak ortaya konulamamıştır. Nazogastrik olarak SEG ve SEI’nin rhesus maymunlara verilmesinin emetik

etki gösterdiği, IL-2 ve IFN- $\gamma$  sentezi ile birlikte T lenfositlerinin proliferasyonunu stimule ettiği belirlenmiştir (Munson ve ark 1998). SED'nin sentezinden sorumlu olan plazmidin karakterizasyonu sonucu aynı plazmid üzerinde yeni bir enterotoksin sentezinden sorumlu tutulan SEJ'nin varlığı tespit edilmiştir (Zhang ve ark 1998). SEJ'nin klinik önemi henüz ortaya konulmuş değildir. Jarraud ve ark (1999) SEG ve SEI'nin stafilokokkal toksik şok sendrom oluşumundaki rolünü araştırmışlar ve *S. aureus* izolatlarında *seg* ve *sei* genlerini PZR ile ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar aynı zamanda kültür supernatantlarında süperantijenik aktivite tespit etmişler ve bu toksinlerin insanlarda toksik şok sendromuna neden olabileceğini saptamışlardır. Abe ve ark (2000) ise, *seg* pozitif *S. aureus* izolatlarının supernatijenik özelliklerini karakterize etmişler ve klinik izolatlarda dağılımını ortaya koymuşlardır. Omoe ve ark (2002) insanlardaki gıda zehirlenmelerinden izole edilen 71 *S. aureus* izolatının 12'sinin (% 16.9) *seg/sei* genlerini taşıdığını belirlemişlerdir. Kérouanton ve ark (2007) stafilokokkal gıda zehirlenmelerinden izole edilen 178 koagulaz pozitif stafilokok izolatı içerisinde farklı biotip profillerine ait 33 *S. aureus* izolatını klasik (*sea-see*) ve yeni belirlenen (*seg-sei*) SE genleri yönünden incelemişlerdir. Araştırmacılar, 23 izolatta *sea*, 12 izolatta *sed*, 5 izolatta *seh* geni tespit ederlerken, sadece *seg/sei* taşıyan bir izolat hariç *seg* ve *sei* genlerini *sea* ve *sed* genleri ile birlikte tespit etmişlerdir. Çalışmada, klasik enterotoksin genleri ile *seg* ve *sei* genlerinin birlikte ve ayrı olarak tespit edilmesi mastitisli sığır sütlerinin insan sağlığı açısından potansiyel bir risk oluşturduğunu göstermektedir.

SE ve *coa* alt tipleri arasında korelasyon olduğu ve yaygın alt tiplerin enterotoksijenik olduğu farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Vimercati ve ark 2006, Katsuda ve ark 2005, Fueyo ve ark 2005). Su ve ark (1999) bir coğrafik bölgede sadece birkaç genotipin dominant olduğunu ve dominant olan genotipin ise nadir bulunan genotiplere oranla nötrofil öldürme aktivitesine dirençli olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada, yaygın genotiplere ait izolatların büyük kısmının enterotoksijenik olduğu (Tablo 2), bir veya birden fazla toksin

geni taşıdığı tespit edilirken, C, D1 ve D2 genotipine ait izolatlarda toksin genlerinin varlığı belirlenemedi. Patojen ve konağın birlikte geçirdiği evrimin bu genetik farklılığın oluşmasında önemli olduğu bildirilmiştir (Hafler ve Nadler 1988, May ve Anderson 1990). Farklı genotipe ait patojenlerin bir konağı infekte etmesi durumunda, patojenler gıda ve diğer duyarlı konakçıları infekte etmek için yarışacaklar, virulensi yüksek olan genotip daha yarışmacı olacak ve daha dominant hale geçecektir (Su ve ark 1999, Nowak ve May 1994). Yukarıda belirtilen bir veya iki genotipin bir bölgede yaygın bulunması yukarıdaki görüş ile izah edilebilir.

Sonuç olarak, (i) Hatay ilinde subklinik inek mastitislerinin farklı *S. aureus* genotipleri tarafından meydana getirildiği, ancak bir veya iki genotipin dominant olduğu, (ii) dominant genotiplerin enterotoksijenik olduğu, bu genotiplerin bir veya birden fazla enterotoksin geni taşıdığı, (iii) *S. aureus*'un sığırlarda neden olduğu meme içi infeksiyonların patogenezinin anlaşılması için farklı bölgelerden toplanan çok sayıda izolat ile yapılacak daha kapsamlı çalışmaların yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

## 7.TEŞEKKÜR

Bu yüksek lisans çalışmasının yürütülmesinde, yardım ve ilgilerini gördüğüm danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Özkan ASLANTAŞ'a, laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencileri Cemil DEMİR ve Bilge DİLSİZ'e, bu çalışmaya maddi destek sağlayan Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığı'na ve çalışma süresince gösterdikleri sabır, hoşgörü ve desteklerinden dolayı eşime, kızlarım İpek ve İrem'e teşekkür ederim.

## 8.KAYNAKLAR

**Abe J, Ito Y, Onimaru M, Kohsaka T and Takeda T (2000)**, *Characterization and distribution of a new enterotoxin-related superantigen produced by Staphylococcus aureus*. Microbiol Immunol, 44, 79-88.

**Akan M (2006)**, *Staphylococcus infeksiyonları*. Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). Ed. Nejat Aydın, Jale Paracıkoğlu. İlke Emek Yayınları, Ankara.

**Akay Ö, Aydın N (1984)**, *Stafilokokal Mastitisler*. I. Mastitis Semineri, Ankara

**Akineden O, Annemuller C, Hassan AA, Lämmel C, Wolter W and Zschock M (2001)**, *Toxin genes and other characteristics of Staphylococcus aureus isolates from milk of cows with mastitis*. Clin Diagn Lab Immunol, 8, 959-864.

**Aydın F, Leloğlu N, Şahin M, Çolak A, Otlı S (1995)**, *Kars yöresi süt ineklerinde klinik ve subklinik mastitislere neden olan mikroorganizmaların identifikasyonları ve antibiyotiklere duyarlılıkları üzerine araştırmalar*. Pendik Vet Mikrobiyol Derg, 26, 55-65.

**Balaban N and Rasooly A (2000)**, *Staphylococcal enterotoxins*. Int J Food Microbiol, 61, 1-10.

**Bannerman TL, Hancock GA, Tenover FC and Miller JM (1995)**, *Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol, 33, 551-555.

**Baştan A (2002)**, *İneklerde meme hastalıkları*. 1. Baskı, Ankara, Hatiboğlu Yayınevi.

**Baumgartner A, Nicolet J, Eggimann M (1984)**, *Plasmid profiles of Staphylococcus aureus causing bovine mastitis*. J Appl Bacteriol, 56, 159-163.

**Blomster-Hautamaa DA, Kreiswirth BN, Kornblum JS, Novick RP and Schlievert PM (1986)**, *The nucleotide and partial amino acid sequence of toxic shock syndrome toxin-1*. J Biol Chem, 261, 15783-15786.

**Blair JE and Williams REO (1961)**, *Phage type of staphylococci*. Bull Wld Hlt Org, 24, 771-784.

**Blood DC and Radostis OM (1989)**, *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs and horses*. Bailliere Tindall, London.

**Bramley AJ and Dodd FH (1984)**, *Reviews of the progress of dairy science: Mastitis control-progress and prospects*. J Dairy Res, 51(3), 481-512.

**Chen TR, Hsiao MH, Chiou CS and Tsen HY (2001)**, *Development and use of PCR primers for the investigation of CI, C2 and C3 enterotoxin types of Staphylococcus aureus stains isolated from food-borne outbreaks*. Int J Food Microbiol, 71, 63-70.

**Cifrian E, Guidry AJ, O'Brien CN and Marquardi WW (1996)**, *Effect of antibodies to alpha and beta toxins, cell wall and exopolysaccharide capsule on the cytotoxicity and adherence of staphylococcus aureus to bovine mammary secretory epithelial cells*. Am J Vet Res, 57(9), 1308-1311.

**Cremonesi P, Luzzana M, Brasca M, Morandi S, Lodi R, Vimercati C, Agnellini D, Caramenti G, Moroni P and Castiglioni B (2005)**, *Development of a multiplex PCR assay for the identification of Staphylococcus aureus enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products*. Mol Cell Probes, 19, 299-305.

**Creven N, Anderson JC (1984)**, *Phagocytosis of Staphylococcus aureus by bovine mammary gland macrophages and intracellular protection from antibiotic action in vitro and in vivo*. J Dairy Res, 51, 513-523.

**Cuteri V, Marenzoni ML, Mazzolla R, Tosti N, Merletti L, Arcioni, S and Valente C (2004)**, *Staphylococcus aureus: study of genomic similarity of strains isolated in veterinary pathology using amplified fragment length polymorphism (AFLP)*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 27, 247-253.

**De Graves FJ and Fetrow J (1993)**, *Economics of Mastitis Control. Vet. Clin. North Am: Food Animal Practice*, 9, 421-434.

**Diker SK (1998)**, *İmmunoloji*. 1. Baskı, Medisan Yayınevi, Ankara.

**Erganiş O ve Uçan US (2001)**, *Veteriner Epidemiyoloji*. 2. Baskı, Mimoza Yayınları, Konya.

**Ergün Y, Aslantaş Ö, Cantekin Z ve Doğruer G (2004)**, *Hatay ilindeki aile tipi süt siğirciliği işletmelerinde subklinik mastitislerin epidemiyolojisi. Vet Bil Derg*, 20, 25-28.

**Erol İ ve İşeri Ö (2004)**, *Stafilokokkal enterotoksinler. Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 51, 239-245.

**Ferens WA, Davis WC, Hamilton MJ and Park YH (1998)**, *Activation of bovine lymphocyte subpopulations by staphylococcal enterotoxin C. Infect Immun*, 66, 573-580.

**Fitzgerald JR, Meaney WJ, Hartigan PJ, Smyth CJ and Kapur V (1997)**, *Fine-structure molecular epidemiological analysis of Staphylococcus aureus recovered from cows. Epidemiol Infect*, 119, 261-269.

**Fox LK, Ferens WA, Bohach GA, Bayles KW and Davis WC (2000)**, *Staphylococcus aureus: super mastitis pathogen. 39<sup>th</sup> Annu. Meet. Natl. Mastitis Council, Inc. Atlanta, GA.*

**Fox LK, Gershman M, Hancock DD and Hutton CT (1991)**, *Fomites and reservoirs of Staphylococcus aureus causing intramammary infections as determined by phage typing; the effect of milking time hygiene practices, Cornell Vet*, 81, 183-193.

**Frenay HME, Bunschoten AE, Schouls LM, Van Leeuwen WJ, Vandenbroucke-Grals CMJE, Verhoef J and Mooi FR (1996)**, *Molecular typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus on the basis of protein-A gene polymorphism. Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 15, 60-64.

**Fuda CCS, Fisher JF and Mobashery S (2005)**,  *$\beta$ -lactam resistance in Staphylococcus aureus: the adaptive resistance of a plastic genome*. Cell Mol Life Sci, 62, 2617-2633.

**Fueyo JM, Mendoza MC, Rodicio MR, Muniz MA, Alvarez MA and Martin MC (2005)**, *Cytotoxin and pyrogenic superantigen gene profiles of Staphylococcus aureus associated with subclinical mastitis in dairy cows and relationships with macrorestriction genomic profiles*. J Clin Microbiol, 43, 1278-1284.

**Gillespie BE, Owens WE, Nickerson SC and Oliver SP (1999)**, *Deoxyribonucleic acid fingerprinting of staphylococcus aureus from heifer mammary secretions and from horn flies*. J Dairy Sci, 82(7), 1581-1585.

**Goh SH, Byrne SK, Zhang JL and Chow AW (1992)**, *Molecular typing of Staphylococcus aureus on the basis of coagulase gene polymorphisms*. J Clin Microbiol, 30, 1642-1645.

**Güler L, Ok U, Gündüz K, Gülcü Y ve Hadimli HH (2005)**, *Antimicrobial susceptibility and coagulase gene typing of Staphylococcus aureus isolated from bovine clinical mastitis cases in Turkey*. J Dairy Sci, 88, 3149-54.

**Hadimli HH ve Erganiş O (2001)**, *Mastitis ve bağışıklık*. Veterinarium, 13(1), 37-42.

**Hadimli HH (2000)**, *Süt ineklerinde stafilokokkal mastitisler için aşı çalışmaları*. Doktora Tezi Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.

**Hafner M and Nadler S (1988)**, *Phylogenetic coevolution of parasites. And their hosts*. Nature, 332, 258-259.

**Hookey JV, Richardson JF and Cookson BD (1998)**, *Molecular typing of Staphylococcus aureus based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene*. J Clin Microbiol, 36, 1083-1089.



**Hutton CT, Fox LK and Hancock DD (1990)**, *Mastitis control practices: Differences between herds with high and low milk somatic cell counts*. J Dairy Sci, 73(4), 1135-1143.

**Jain NC (1979)**, *Common mammary pathogens and factors in infection and mastitis*. J Dairy Sci, 62, 128-134.

**Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, Nesme X, Etienne J and Vandenesch F (2002)**, *Relationships between Staphylococcus aureus genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease*. Infect Immun, 70, 631-641.

**Jarraud S, Cozon G, Vandenesch F, Bes M, Etienne J and Lina G (1999)**, *Involvement of enterotoxin G and I in staphylococcal toxic shock syndrome and staphylococcal scarlet fever*. J Clin Microbiol, 37, 2446-2449.

**Karahan M (2005)**, *Mastitisli inek sütlerinden izole edilen streptokok ve stafilokok etkenlerinde genetik polimorfizmin araştırılması*. Doktora Tezi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.

**Johnson HN and Magazine HI (1988)**, *Potent mitogenic activity of staphylococcal enterotoxin A requires induction of interleukin 2*. Int Arch Allergy Appl Immunol, 87, 87-90

**Kapur V, Sicho WM, Greer RS, Whittam TS and Musser JM (1995)**, *Molecular population genetic analysis of Staphylococcus aureus recovered from cows*. J Clin Microbiol, 33, 376-380.

**Katsuda K, Hata E, Kobayashi H, Kahmoto M, Kawashima k, Tsunemitsu H and Eguchi M (2005)**, *Molecular typing of Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitic milk on the basis of toxin genes and coagulase gene polymorphisms*. Vet. Microbiol, 105, 301-305.

**Kèrouanton A, Hennekinne J.A, Letertre C, Petit L, Chesneau O, Brisabois A and De Buyser ML (2007),** *Characterization of Staphylococcus aureus strains associated with food poisoning outbreaks in France.* Int J Food Microbiol, 115, 369-375.

**Koneman, EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC and Winn WC (1997),** *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology.* 5<sup>th</sup> Ed., Lippincott Williams and Wilkins, Wolters Kluwe Company, Philadelphia, PA, USA.

**Kuyucuoğlu Y ve Uçar M (2001),** *Afyon bölgesi süt ineklerinde sublinik ve klinik mastitislerin görülme oranları ve etkili antibiyotiklerin tespiti.* Vet. Hek. Mikrobiol. Derg. 1,19-24.

**Kwon NH, Park KT, Moon JS, Jung WK, Kim SH, Kim JM, Hong SK, Koo HC, Joo YS and Park YH (2005),** *Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) characterisation and molecular analysis for methicillin resistant Staphylococcus aureus and novel SCCmec subtype IVg isolated from bovine milk in Korea.* J Antimicrob Chemother, 56, 624-632.

**Lange C, Cardoso M, Senczek D and Shawarz S (1999),** *Molecular subtyping of S.aureus isolates from cases of bovine mastitis in Brazil.* Vet Microbiol, 67, 127-141.

**Larsen HD, Huda A, Eriksen NHR and Jensen NE (2000),** *Differences between Danish bovine and human Staphylococcus aureus isolates in possession of superantigens.* Vet Microbiol, 76, 153-162.

**Letertre C, Perelle S, Dilasser F and Fach P (2003),** *Identification of new putative enterotoxin SEU encoded by agc cluster of Staphylococcus aureus.* J Appl Microbiol, 95, 38-43.

**Lim SK, Joo YS, Moon JS, Lee AR, Nam HM, Wee SH and Koh HB (2004),** *Molecular typing of enterotoxigenic Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis in Korea.* J Vet Med Sci, 66, 581-584.

**Loeffler DA, Creasy MT, Norcross NL and Paape MJ (1988)**, *Enzyme linked immunosorbent assay for detection of leukocidin toxin from staphylococcus aureus in bovine milk samples*. J Clin Microbiol. 26(7), 1331-1334.

**Loeffler DA and Norcross NL (1985)**, *Enzyme linked immunosorbent assay for detection of milk immunoglobulins to leukocidin toxin of staphylococcus aureus*. Am J Vet Res, 46(8), 1728-1732.

**Lopes CAM, Moreno G, Curi PR, Gottschalk AF, Mondolo JR, Horacio A, Correia A and Pavan C (1990)**, *Characteristics of Staphylococcus aureus from subclinical bovine mastitis in Brazil*. Br Vet J, 146, 443-448.

**Matthews KR, Kumar SJ, O'Conner SA, Harmon RJ, Pankey JW, Fox LK and Oliver SP (1994)**, *Genomic fingerprints of Staphylococcus aureus of bovine origin by polymerase chain reaction based DNA fingerprinting*. Epidemiol Infect, 112, 177-186.

**May P and Anderson R (1990)**, *Parasite-host coevolution*. Parasitology. 100, 89-101.

**Mehrotra M, Wang G and Johnson WM (2000)**, *Multiplex PCR for detection of genes for Staphylococcus aureus enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin-1, and methicillin resistance*. J Clin Microbiol, 38, 1032-1035.

**Milner P, Page KL and Hillerton JE (1997)**, *The Effects of early antibiotic treatment following diagnosis of mastitis detected by a change in the electrical conductivity of milk* J Dairy Sci, 80(5), 859-863.

**Monday SR and Bohach GA (1999)**, *Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates*. J Clin Microbiol, 37, 3411-3414.

**Munson SH, Tremaine MT, Beteley MJ and Welch RA (1998)**, *Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin type G and I from Staphylococcus aureus*. J Immunol, 66, 3337-3348.

**Nickerson SC, Owens WE and Boddie RL (1995)**, *Mastitis in dairy heifers: Initial studies on prevalence and control*. J Dairy Sci, 78(7), 1607-1618.

**Nordhaug ML, Nesse LL; Norcross NL and Gudding R (1994)**, *A field trial with an experimental vaccine against Staphylococcus aureus mastitis in cattle: I. Clinical Parameters*. J Dairy Sci, 77(5), 1267-1275.

**Nowak M and May R (1994)**, *Superinfection and the evolution of parasite virulence*. Proc R Soc Lond. 255, 81-89.

**Omoe K, Ishikawa M, Shimoda Y, Hu DL, Ueda S and Shinagawa K (2002)**, *Detection of seg seh and sei genes in Staphylococcus aureus isolates and determination of enterotoxin productivities of S.aureus isolates harboring seg, seh, or sei genes*. J Clin Microbiol, 40, 857-862.

**Owens WE, Watts JL, Boddie RL and Nickerson SC (1988)**, *Antibiotic treatment of mastitis: Comparison of intramammary plus intramuscular therapies*. J Dairy Sci, 71(11), 343-3147.

**Philpot WN (1984)**, *Economics of mastitis control*. Vet Clin North Am: Food Animal Practice, 6, 233-245.

**Phuektes P, Mansell PD and Browning GF (2001)**, *Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of staphylococcus aureus and streptococcal causes of bovine mastitis*. J Dairy Sci, 84(5), 1140-1148.

**Poutrel B, Mendolia C, Sutra L and Fournier JM (1990)**, *Reactivity of coagulase-negative staphylococci isolated from cow and goat milk with monoclonal antibodies to*

*staphylococcus aureus capsular polysaccharide types 5 and 8*. J Clin Microbiol, 28(2), 358-360.

**Quinn PJ, Carter ME, Markey BK and Carter GR (1994)**, *Clinical Veterinary Microbiology*. Blackwell Science Ltd, Oxford.

**Riffon R, Sayasith K, Khalil H, Dubreuil P, Drolet M and Lagace J (2001)**, *Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR*. J Clin Microbiol, 39, 2584-2589.

**Roberson JR, Fox LK, Hancock DD, Gay CC and Beser TE (1994)**, *Ecology of Staphylococcus aureus isolated from various sites on dairy farms*. J Dairy Sci, 77, 3354-3364.

**Roberson JR, Fox LK, Hancock DD, Gay CC and Beser TE (1998)**, *Sources of intramammary infections from staphylococcus aureus in dairy heifers at first parturition*. J Dairy Sci, 81, 687-693.

**Rose SA, Modi NK, Tranter HS, Bailey NE, Stringer MF and Hambleton P (1988)**, *Studies on the irradiation of Clostridium botulinum and Staphylococcus aureus*. J Appl Bacteriol, 65, 223-229.

**Schlegelova J, Dendis M, Benedik J, Babak B and Rysanek D (2003)**, *Staphylococcus aureus isolates from dairy cows and humans on a farm differ in coagulase genotype*. Vet Microbiol, 92, 327-334.

**Schleifer KH (1986)**, *Gram Positive Cocci*. "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 1". Ed. PHA Sneath, NS Mair, ME Sharpe, JG Holt. Williams and Wilkins, Baltimore.

**Silva ER, Carmo LS and Silva N (2005)**, *Detection of the enterotoxins A, B, and C genes in Staphylococcus aureus from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds*. Vet Microbiol, 106, 103-107.

**Sischo WM, Heider LE, Miller GY and Moore DA (1993)**, *Prevalence of pathogens of bovine mastitis and use of mastitis control practices*. J Am Vet Med Assoc 202(4), 595-600.

**Sol J, Sampimon OC, Barkema HW and Schukken YH (2000)**, *Factors associated with cure after therapy of clinical mastitis caused by Staphylococcus aureus* J Dairy Sci,83,278-284.

**Strulens MJ, Deplano A., Godard C, Maes N and Serruys E (1992)**, *Epidemiologic typing and delineation genetic relatedness of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by macrorestriction analysis of genomic DNA by using pulsed-field gel electrophoresis*. J Clin Microbiol, 30, 2599-2605.

**Strulens MJ, Deplano A., Godard C, Maes N and Serruys E (1992)**, *Epidemiologic typing and delineation genetic relatedness of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by macrorestriction analysis of genomic DNA by using pulsed-field gel electrophoresis*. J Clin Microbiol, 30, 2599-2605.

**Strulens MJ (1998)**, *Molecular epidemiologic typing systems of bacterial pathogens: current issues and perspectives*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 93, 581-586.

**Su C, Herbelin C, Frieze N, Skardova O and Sordillo LM (1999)**, *Coagulase gene polymorphism of Staphylococcus aureus isolates from dairy cattle in different geographical areas*. Epidemiol Infect, 122, 329-336.

**Sutra L and Poutrel B (1994)**, *Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to Staphylococcus aureus*. J Med Microbiol, 40(2), 79-89.

**Şanlı Y (1984)**, *Mastitis sağıtımında kemoterapötik ilaç seçenekleri ve meme içi farmakokinetik*. I. Mastitis Semineri, Ankara.

**Tenover FC, Arbeit R, Archer G and Biddle J (1994)**, *Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol, 32, 407-415.

**Tibana A, Rayman K, Akhtar M and Szabo R (1987)**, *Thermal stability of enterotoxins A, B, and C in a buffered system*. J Food Prot, 50, 239-242.

**Türütoğlu H, Ateşoğlu A, Salihlioğlu H ve Öztürk M (1995)**, *Marmara bölgesi süt ineklerinde mastitise neden olan etkenler*. Pendik Vet Mikrobiyol Derg, 26, 125-137.

**Turutoğlu H, Mudul S and Pehlivanoglu F (2002)**, *Antibiotic susceptibility and  $\beta$  lactamase prevalence for staphylococci isolated from bovine mastitic milk samples*. Acta Veterinaria (Beograd), 52, 337-344.

**Vimercati C, Cremonesi P, Castiglioni B, Pisoni G, Boettcher P.J, Stella A, Vicenzoni G and Moroni P (2006)**, *Molecular typing of Staphylococcus aureus isolated from cows, goats and sheep with intramammary infections on the basis of gene polymorphisms and toxins genes*. J Vet Med, B 53, 423-428.

**Ward PD, Adlam C, McCartney AC, Arbuthnott JP and Thorley CM (1979)**, *A histopathological study of the effects of highly purified staphylococcal alpha and beta toxins on the lactating mammary gland and skin of the rabbit*. J Comp Pathol, 89(2), 169-177.

**Wilson DJ, Gonzalez. RN and Sears PM (1995)**, *Segregation or use of separate milking units for cows infected with Staphylococcus aureus: effects on prevalence of infection and bulk tank somatic cell count*. J Dairy Sci, 78(9), 2083-2085.

**Yancey RJ (1993)**, *Recent advances in bovine vaccine technology*. J Dairy Sci, 76(8), 2418-2436.

**Yavuz MK ve Esenal ÖM (2002)**. *Mastitisli inek sütlerinden izole edilen stafilkokların tür düzeyinde identifikasyonu ve bazı özelliklerinin belirlenmesi*. Etlik Vet. Mikrobiyal Derg, 13, 19-27.

**Zadoks RN, Van Leeuwen WB, Kreft D, Fox LK, Berkema HW, Schukken YH and Van Belkum A (2002)**, *Comparison of Staphylococcus aureus isolates from bovine and human skin, milking equipment and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis and binary typing*. J Clin Microbiol, 40, 3894-3902.

**Zecconi A, Cesaris L, Liandris E, Dapra V and Piccinini R (2006)**, *Role of several Staphylococcus aureus virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland*. Microb Pathog, 40, 177-183.

**Zhang S, Iandolo JJ and Stewart GC (1998)**, *The enterotoxin D plasmid of Staphylococcus aureus encodes a second enterotoxin determinant (sej)*. FEMS Microbiol Lett, 168, 227-233.

**Zschöck M, Botzler D, Blöcher S, Sommerhäuser J and Hamann HP (2000)**, *Detection of genes for enterotoxins (ent) and toxic shock syndrome toxin-I (tst) in mammary isolates of Staphylococcus aureus by polymerase chain reaction*. Int Dairy J, 10, 569-574.

**Zschöck M, Kloppert B, Wolter W, Hamann H. P and Lämmle Ch (2005)**, *Pattern of enterotoxin genes seg, seh, sei and sej positive Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis*. Vet Microbiol, 108, 243-249.



## 9.ÖZGEÇMİŞ

1968 yılında Gaziantep’te doğdu. İlkokul ve ortaokulu Gaziantep’te tamamladı. 1988 yılında Balıkesir Atatürk Sağlık Meslek Lisesi’nden “Hemşire” ünvanı ile mezun oldu. Aynı yıl Gaziantep Yavuzeli Ballık Sağlık Ocağı’nda göreve başladı. Bu süre zarfında hemşire olarak görev yaparken, 1990 yılında Cumhuriyet Üniversitesi Hemşirelik Yüksekokulu’nu kazandı. Bu üniversiteden 1994 yılında “Yüksek Hemşire” ünvanıyla mezun oldu. Mezuniyeti müteakiben, 1994-1996 yılları arasında Malatya Devlet Hastanesi’nde hemşire olarak, 1996-2000 yılları arasında ise Malatya Atatürk Sağlık Meslek Lisesi’nde meslek dersi öğretmeni olarak görev yaptı. 2000 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Hatay Sağlık Yüksekokulu’nda Öğretim Görevlisi olarak göreve başladı. 2005 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine başladı. Evli ve 2 çocuk annesidir.