

**SİĞİR MASTİTİSLERİNDEN İZOLE EDİLEN
Staphylococcus aureus SUŞLARINDA METİSİLİN,
VANKOMİSİN DİRENCİ VE
PANTON-VALENTINE LÖKOSİDİN
VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim Müesser YILMAZ

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Esra ŞEKER
Tez No: 2019-017**

2019 – AFYONKARAHİSAR

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIĞIR MASTİTİSLERİNDEN İZOLE EDİLEN
Staphylococcus aureus SUŞLARINDA METİSİLİN, VANKOMİSİN
DİRENCİ VE PANTON-VALENTINE LÖKOSİDİN VARLIĞININ
ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim Müesser YILMAZ

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Esra ŞEKER**

**Bu tez, Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Birimi tarafından 17.SAĞ.BİL.07 proje numarası ile desteklenmiştir.**

Tez No: 2019-017

2019 – AFYONKARAHİSAR

KABUL ve ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Mikrobiyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

çerçevesinde yürütülmüş bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından

Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 13/06/2019



Prof. Dr. Yahya KUYUCUOĞLU
Selçuk Üniversitesi
Jüri Başkanı



Doç. Dr. Esra ŞEKER
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye



Doç. Dr. Beytullah KENAR
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programı öğrencisi Müesser YILMAZ'ın "Sığır Mastitislerinden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarında Metisilin, Vankomisin Direnci ve Panton-Valentine Lökosidin Varlığının Araştırılması" başlıklı tezi.....günü saat.....'da Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Esmâ KOZAN
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Mastitis, hem tedavi masrafları ile süt verim ve kalitesindeki düşüşler dikkate alındığında neden olduğu ekonomik kayıplar, hem de hayvan refahı açısından tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de süt yönlü sığır yetiştiriciliğinin en önemli sorunlarından biridir. Etiyolojisinde pek çok faktör etkili olmakla birlikte, mikroorganizma nedenli mastitislerde *Staphylococcus aureus* ilk sıralarda yer almaktadır. Bakteriyel nedenli mastitislerin sağaltımında veteriner sahada yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere karşı artan oranda gelişen direnç, mastitis etkenleri ile mücadeleyi güçleştiren önemli bir sorun haline dönüşmüştür.

Sunulan çalışmanın temel amacı; örneklemenin yapıldığı Afyonkarahisar'da mastitisli ineklerden *S. aureus*'un izolasyonu, izole edilen suşların metisilin ve vankomisine dirençlilik durumu ile suşlarda Panton-Valentine Lökosidin toksin varlığının genotipik düzeyde araştırılmasıdır.

"Sığır mastitislerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında metisilin, vankomisin direnci ve Panton-Valentine lökosidin varlığının araştırılması" konulu yüksek lisans tez çalışmamda, bilgi ve tecrübesiyle her zaman yanımda olan danışmanım Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Esra ŞEKER başta olmak üzere, Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Beytullah KENAR ve Selçuk Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Yahya KUYUCUOĞLU'na teşekkür ederim. Ayrıca saha çalışmalarımnda desteklerini esirgemeyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Erhan ÖZENÇ ve ALGAN Veteriner Kliniği hekimi Uzman Veteriner Hekim Muhammed Nevzat ALGAN'a; laboratuvar uygulamalarım sırasında yardımcı olan Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Dr. Yağmur Nil DEMİREL ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Oğuz Kağan TÜREDİ'ye teşekkür ederim. Son olarak; ilk günden son güne kadar yanımda olan canım ablam Laborant ve Veteriner Sağlık Teknikeri Mukaddes YILMAZ'a ve

beni hep destekleyen hayattaki en değerli varlıklarım olan anneme ve babama teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

Kabul ve Onay	
Önsöz	i
İçindekiler	iii
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	viii
Tablolar	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Tarihçe.....	3
1.1.1. <i>Staphylococcus</i> spp.	3
1.1.2. Metisilin	4
1.1.3. Vankomisin	5
1.2. Etiyoloji	6
1.2.1. Sınıflandırma	6
1.2.2. Genel Özellikler	7
1.2.3. Virulens Faktörleri	9
1.2.3.1. Yapısal Bileşenler	10
1.2.3.1.1. Hücre Duvarı ve Kapsül	10
1.2.3.1.2. Yüzey Proteinleri (Microbial Surface Proteins Recognizing Adhesive Matrix Molecules - MSCRAMM)	11
1.2.3.1.3. Slaym Faktörü (Slime Factor)	12
1.2.3.2. Enzimler	12
1.2.3.2.1. Katalaz	12
1.2.3.2.2. Koagülaz	12
1.2.3.2.3. Lipaz	13
1.2.3.2.4. Hyaluronidaz	13
1.2.3.2.5. Deoksiribonükleaz (DNaz)	13
1.2.3.2.6. Betalaktamaz (Penisilinaz)	14
1.2.3.3. Toksinler	14
1.2.3.3.1. Sitolitik Toksinler	14

1.2.3.3.1.1. Hemolizinler	14
1.2.3.3.1.2. Lökosidinler (Lökotoksinler)	16
1.2.3.3.1.3. Epidermolitik Toksin (Eksfoliyatin)	16
1.2.3.3.1.4. Enterotoksinler	17
1.2.3.3.1.5. Toksik Şok Sendromu Toksini-1 (TSST-1)	17
1.3. Antibiyotik Etki ve Direnç Mekanizmaları	18
1.3.1. Metisilin Etki Mekanizması	18
1.3.2. Metisiline Direnç Mekanizması	18
1.3.4. Vankomisin Etki Mekanizması	20
1.3.5. Vankomisine Direnç Mekanizması	21
2. GEREÇ VE YÖNTEM	23
2.1. Gereç	23
2.1.1. Örneklenen Hayvanlar ve Örneklerin Toplanması	23
2.1.2. Standart Suşlar	24
2.1.3. Besiyerleri, Solüsyonlar, Çözeltiler, İdentifikasyon Kitleri ve Antibiyotik Diskleri	24
2.1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda (PZR) Kullanılan Buffer, Solüsyon, Ekipman ve Cihazlar	25
2.2. Yöntem	26
2.2.1. Örneklerden <i>Staphylococcus aureus</i> 'un İzolasyonu ve İdentifikasyonu	26
2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	27
2.2.2.1. DNA Ekstraksiyonu	27
2.2.2.2. Amplifikasyon Koşulları	27
2.2.3 Antibiyotik Duyarlılık Testleri	30
3. BULGULAR.....	31
3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları	31
3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları	31
3.3. Antibiyotik Duyarlılık Testi Bulguları	33
4. TARTIŞMA.....	34

5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	43
ÖZET.....	45
SUMMARY.....	46
KAYNAKLAR.....	47
ÖZGEÇMİŞ.....	57

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATCC	American Type Culture Collection
β	Beta
bç	Baz çifti
BORSA	Borderline resistant <i>S. aureus</i>
cAMP	Siklik Adenozinmonofosfat
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMT	California Mastitis Testi
DNA	Deoksiribonükleik asit
ET-A	Epidermolitik Toksin A
ET-B	Epidermolitik Toksin B
Fc	Kristalize fragment
FTS	Fizyolojik tuzlu su
g	Gram
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HK-MRSA	Hastane kaynaklı Metisiline Dirençli <i>S. aureus</i>
IL-1	İnterlökin-1
Kb	Kilobayt
kDa	Kilodalton
KNS	Koagülaz Negatif Stafilokok
KPS	Koagülaz Pozitif Stafilokok
μ g	Mikrogram
μ l	Mikrolitre
ml	Mililitre
MHA	Mueller Hinton Agar
MRS	Metisiline Dirençli Stafilokok
MRSA	Metisiline Dirençli <i>S. aureus</i>
MSS	Metisiline Duyarlı Stafilokok
MSSA	Metisiline Duyarlı <i>S. aureus</i>
NaCl	Sodyum klorür
NAGA	N-asetilglukozamin
NAMA	N-asetilmuramikasit
NB	Nutrient Broth

O/F	Oksidasyon/Fermentasyon
PBP	Penisilin Bağlayan Protein
PVL	Panton-Valentine Lökosidini
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
SCC	Stafilokokal Kaset Kromozom
SE-like, SEI	Stafilokokal enterotoksin benzeri toksinler
SEs	Stafilokokal enterotoksinler
SHS	Somatik Hücre Sayısı
TK-MRSA	Toplum Kaynaklı-Metisiline Dirençli <i>S. aureus</i>
TSA	Trypticase Soy Agar
TSB	Trypticase Soy Broth
TSST-1	Toksin Şok Sendrom Toksini-1
VP	Voges Prouskauer
VISA	Vankomisine Orta Derecede Duyarlı <i>S. aureus</i>
VRE	Vankomisine Dirençli Enterokok
VRSA	Vankomisine Dirençli <i>S. aureus</i>
VSSA	Vankomisine Duyarlı <i>S. aureus</i>

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 3.1. 16S rDNA ve <i>mecA</i> genlerine ait PZR bulguları	32
Şekil 3.2. 16S rDNA ve <i>mecA</i> genlerine ait PZR bulguları	32

TABLolar

Sayfa

Tablo 1.1. <i>S. aureus</i> 'un Sınıflandırılması	6
Tablo 1.2. Hayvanlarda <i>S. aureus</i> etiyolojili bazı infeksiyonlar	9
Tablo 2.1. Örneklenen hayvanların örnekleme yerlerine göre dağılımı ...	23
Tablo 2.2. Kullanılan primerlere ait oligonükleotid sekansları, bant büyüklükleri ve referanslar	28
Tablo 2.3. PZR karışımını oluşturan bileşenler ve miktarları (16S rDNA ve <i>mecA</i>)	29
Tablo 2.4. PZR karışımını oluşturan bileşenler ve miktarları (<i>pvl</i> ve <i>vanA</i>)	29
Tablo 2.5. 16S rDNA, <i>mecA</i> , <i>pvl</i> ve <i>vanA</i> genleri için uygulanan amplifikasyon koşulları	29
Tablo 3.1. İdentifiye edilen <i>S. aureus</i> suşlarının CMT skorlamasına göre dağılımı	31
Tablo 3.2. <i>S. aureus</i> suşlarının antibiyotiklere duyarlılık/dirençlilik oranları	33

1. GİRİŞ

Mastitis, sütte birtakım fiziksel ve kimyasal değişikliklere neden olan meme bezi dokusunun yangısıdır (Bradley, 2002; Akan, 2006; Macun ve ark., 2011; Acar ve ark., 2012). Mastitis, gelişen sağlık kontrol yönetimlerine rağmen tüm dünyada ve ülkemizde süt yönlü sığır yetiştiriciliğinin en önemli sorunları arasında yer alır (Bhutto ve ark., 2012; Galfi ve ark., 2017). Mastitisin, sütte ve meme dokusunda oluşturduğu patolojik semptomlar ekonomik kaybın primer nedenleri arasında yer alırken, özellikle hastalığın reproduktif sistem üzerindeki etkileri de ekonomik kayıpların artmasında etkin bir sebep olmaktadır (Halasa ve ark., 2007). Mastitisin halk sağlığı üzerindeki etkileri de göz önüne alındığında ülke ekonomisindeki kayıpların arttığı bilinmektedir. Ülkemizde mastitis kaynaklı ekonomik kayıpların yıllık 57,7 milyon Türk Lirası dolaylarında olduğu tahmin edilmektedir (Akan, 2006; Çokal ve Konuş, 2012).

Multifaktöriyel nedenlere bağlı olarak oluşabilen mastitis etiyojisinde çok sayıda mikroorganizma etkili olmakla birlikte, bakteriyel nedenli mastitisler oldukça yaygındır. Mastitis etiyojisinde rol alan majör etkenler temel olarak bulaşıcı mastitis etkenleri ve çevresel mastitis etkenleri olarak ikiye ayrılmaktadır. Bulaşıcı mastitis etkenleri *Staphylococcus aureus* veya *Streptococcus agalactiae* gibi patojen mikroorganizmaları kapsar. Bu patojen ve bulaşıcı mikroorganizmalar konakçıda somatik ve epitel hücre (lökosit ve nötrofil) sayılarındaki artışla karakterize ve sürüde hızla yayılabilen subklinik infeksiyonlara neden olmaktadır. Çevresel mastitis etkenleri ise *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, mantar ve mayaları kapsamaktadır. Bu patojenler meme bezinin bilinen en iyi fırsatçı mikroorganizmaları olarak tanımlanırlar (Baştan, 2007; Vural ve ark., 2016).

Meme, tüm bu patojen mikroorganizmaların yol açtığı olumsuz etkileri nötralize ederek sağlıklı yapısındaki normal fonksiyonlarını yerine getirmek için gerek fiziksel gerekse kimyasal cevaplar vermektedir. Meme dokusunun etkenlere karşı gösterdiği bu reaksiyonlar sonucu çeşitli mastitis formları ortaya çıkmaktadır. Mastitisler, etkenlerin sütte ve meme dokusunda oluşturdukları değişikliklere göre

linik ve sublinik mastitisler olarak sınıflandırılmaktadır. Klinik mastitisler, meme dokusu ve sütte gözle görülebilir değişikliklerin olduğu mastitis formudur. Klinik tabloda meme dokusunda şişlik, ağrı, kızarıklık görülürken sütte ise renk değişimleri, kıvamda sulanma, koku, flakonlar ve pıhtı görülebilmektedir. Klinik mastitisler; infeksiyonun yayılma süresiyle ilişkili olarak perakut, akut, subakut ve kronik mastitisler olarak sınıflandırılır. Sublinik mastitisler ise etkenlerin meme dokusunda bulunmasına rağmen memede ve sütte gözle görülebilir bir bozukluğa neden olmadığı mastitis formudur. Buna rağmen sublinik mastitislerde sütteki değişiklikler indirekt testlerle ortaya konulabilmektedir. Sublinik mastitisler, sütte somatik hücre sayısının (SHS) artması, süt veriminde %15-45'lik düşüş, sütün bileşenlerinde değişme ve patojen etkenlerin izolasyonu ile tanımlanabilen, infeksiyöz etkenleri taşıyan ve yayan, ayrıca sütçü inek işletmelerinde ekonomik kayıpların %70-80'nine sebep olan infeksiyonlardır (Baştan, 2007; Bhutto ve ark., 2012; Vural ve ark., 2016; Galfi ve ark., 2017).

Dünya genelinde olduğu gibi ülkemizde de en önemli patojen mastitis etkenleri arasında yer alan Stafilokoklar, tavşan ve insan plazmasını koagüle etme yeteneklerine göre koagülaz pozitif Stafilokoklar (KPS) ve koagülaz negatif Stafilokoklar (KNS) olarak gruplandırılmaktadır (Quinn ve ark., 1999; Ilgaz ve ark., 2005; Kaliwal ve ark., 2011). KPS grubu içerisinde mastitis etkeni olarak *S. aureus*, *Staphylococcus intermedius* ve *Staphylococcus hyicus* (koagülaz reaksiyonu değişken) bulunurken, KNS grubunda ise 10'dan fazla türün mastitis vakalarından izole edildiği bildirilmiştir (Pyörälä ve Taponen, 2009; Şeker ve Özenç, 2010).

Mastitis olgularının tedavisinde geçmişten günümüze yaygın olarak beta laktam grubu antibiyotikler veya bu grubu içerisinde bulunduran antibiyotik kombinasyonlarının aşırı kullanılması sonucu özellikle Stafilokoklarda beta-laktamaz enzimine dayanıklı penisilinlere karşı oluşan ve genel anlamda metisilin direnci olarak adlandırılan direncin oluşması, insanlardaki ve hayvanlardaki infeksiyonların yaygın bir nedeni olarak ortaya çıkmaktadır. Metisilin direncinin *S. aureus* suşlarında da belirlenmesi ile antibiyotik dirençliliği konusu önemini daha da artırmıştır (Sawant ve ark., 2005; Dorneles ve ark., 2018).

Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşlarının yayılımı ile birlikte tedavi seçenekleri içerisinde vankomisin kullanılması sonucu yıllar içinde *S. aureus* suşlarının vankomisine duyarlılıklarında da azalmalar görülmüştür (Peng ve ark., 2018).

Bazı *S. aureus* suşları tarafından sentezlenen Panton-Valentine Lökositini (PVL), lökositik etkiye sahip toksin ailesinde yer alıp, insan ve tavşan polimorf nükleer lökositleri ve makrofajları üzerinde litik etkiye sahiptir. PVL, özellikle *S. aureus* infeksiyonlarının patogeneğinde rol alan virulens faktörleri arasında en önemlilerinden biri olarak kabul edilmektedir (Barrio ve ark., 2006; Lo ve Wang, 2011).

Hijyenik olarak tüm önlemlerin alınmasına rağmen, aile tipi işletmelerden modern işletmelere kadar geniş bir skalada mastitis problemlerinin süregelmesi medikal yönlü koruma ve kontrol programlarının gerekliliğine dikkatleri çekmiştir. Fakat bakteriyel infeksiyonlara karşı etkili mücadeleler yürütebilmek için mastitislerin etiolojisinin, patogeneğinin ve epidemiyolojisinin bilinmesi gerekmektedir.

1.1. Tarihçe

1.1.1. *Stapylococcus* spp.

İnsanlar ve hayvanlar için patojenitesi oldukça yüksek olan *Staphylococcus* türlerinin ışık mikroskopunda görüntülenerek tanımlanması ilk kez 1878 yılında Robert Koch tarafından, sıvı besiyerlerinde üretilmesi ise 1880 yılında Louis Pasteur tarafından başarılmıştır. İskoç cerrah Alexander Ogston 1881 yılında etkenlere üzüm salkımı anlamındaki *Stapylococci* ismini verirken, bu etkenlerin fareler ve kobaylar için patojen bir mikroorganizma olduğunu bildirmiştir. Friedrich Julius Rosenbach ise 1884 yılında beyaz renkli koloniler oluşturan Stafilokok türlerine latince kökenli beyaz anlamında *Stapylococcus albus*, sarı-portakal renkli koloniler oluşturan Stafilokok türlerine ise yine latince kökenli altın sarısı anlamında *Stapylococcus*

aureus isimlerini vermiştir. İlerleyen zamanlarda *S. albus*'un ismi *Stapylococcus epidermidis* olarak değiştirilmiştir. Bu aşamadan sonra yapılan çalışmalarda daha çok *S. aureus*'un patojen olmayan Stafilokok türlerinden ayırımına yoğunlaşmış ve 1930 yılından itibaren koagülaz reaksiyonu *S. aureus*'un diğer türlerden ayırımında kullanılmaya başlanmıştır. Diğer Stafilokok türlerinin belirlenmesi için yapılan çalışmalar 1960'lı yılların ortalarında Baird Parker tarafından başlatılmıştır. KNS türleri 1970'li yılların ortalarına kadar patojen sınıf içerisinde değerlendirilmezken, vaka olgularında sıklıkla KNS izole edilmesinin ardından araştırmalar yön değiştirmiştir. Yıllar içinde sürdürülen araştırmalar sonucunda 1994 yılında *Stapylococcus* cinsi içerisinde 31 tür belirtilirken, araştırmaların derinleşmesi ile günümüzde 50'nin üzerinde tür ve alt türün varlığından bahsedilmektedir (Kloos ve Bannerman, 1994; Quinn ve ark., 1999; Ilgaz ve ark., 2005; Akan, 2006).

1.1.2. Metisilin

İlk kez 1896 yılında Fransız tıp öğrencisi Ernest Duchesne, *S. aureus* kolonilerinin *Penicillium notatum* tarafından yıkımlandığına dikkatleri çekmiştir. Alexander Fleming 1928 yılında *P. notatum*'un *S. aureus*'lar üzerindeki yıkımlama etkisini yeniden ve derinlemesine inceleme altına almıştır (Waness, 2010). Bu araştırmanın sonuçlarının 1929 yılında yayınlanmasını takip eden 10 yıl sonunda Oxford Üniversitesi'nde *P. notatum*'dan penisilin ekstraksiyonu yapılmış ve penisilin 1941'de Stafilokok kaynaklı infeksiyonlarda tedavi amaçlı kullanılmaya başlanmıştır. Tıp tarihinin mihenk taşlarından birisi olan penisilin keşfini takiben özellikle 1943 yılında ABD'de penisilin üretimi artmıştır. Ancak 1944 yılında Kirby tarafından penisilinaz (beta laktamaz) enzimi oluşturulmasına bağlı ilk penisilin direncinin belirlenmesi ve 1947 yılında belirgin bir şekilde penisilin dirençli *S. aureus* suşlarının izole edilmeye başlanması ile birlikte penisilinler etkinliklerini kaybetmiştir. Ardından 1959 yılında *S. aureus*'un ürettiği penisilinaz enzimine dirençli semisentetik penisilin türevi metisilin üretilerek klinik kullanıma sunulmuştur. Böylelikle *S. aureus* kaynaklı infeksiyonlarda metisilinle tedavi stratejisine geçilmesine rağmen, 1961 yılında İngiltere'de ilk metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) izolasyonu bildirilmiştir (Kirby, 1944; Jevons, 1961; Enright ve

ark., 2002; Lowy, 2003; Waness, 2010). İlk izole edilen MRSA suşları hastane kaynaklı (HK-MRSA, Hospital-Associated MRSA, HA-MRSA) iken, özellikle 1990'lı yıllardan başlayarak toplumdan kazanılmış MRSA (TK-MRSA, Community-Associated MRSA, CA-MRSA) suşlarında önce toplumdaki bireyler arasında, sonra sağlık merkezlerde hızlı bir artış tespit edilmiştir (Enright ve ark., 2002; Waness, 2010). Mastitisli ineklerden ilk MRSA suşu ise 1972 yılında Belçika'da izole edilmiştir (Devriese ve ark., 1972).

1.1.3. Vankomisin

İlk kez 1956 yılında Hindistan ve Endonezya toprak örneklerinden izole edilen *Amycolatopsis orientalis* tarafından Gram pozitif bakterilere karşı yüksek aktivite gösteren bir madde üretildiği bildirilmiştir (McCormick ve ark., 1956). Daha sonra vankomisin olarak adlandırılan bu maddenin penisiline dirençli Stafilokok türlerinin oluşturduğu infeksiyonların tedavisinde oldukça başarılı olduğu gözlemlenmiş ve kullanımını artmıştır (Levine, 2006).

Vankomisine karşı direnç tespit edilen ilk Stafilokok türü *Staphylococcus haemolyticus*'tur (Schwalbe ve ark., 1987). İlk vankomisine duyarlılığı azalmış, "vankomisine orta derecede duyarlı *S. aureus* (VISA)" 1997 yılında Japonya'da tespit edilmiştir (Hiramatsu ve ark., 1997). Ardından 1998 yılında Fransa'da ve İngiltere'de, 1999 yılında Hong Kong'da ve İspanya'da, 2001 yılında ise Brezilya'da ve Avustralya'da insan kökenli VISA vakaları bildirilmiştir (Howe ve ark., 1998; Ploy ve ark., 1998; Wong ve ark., 1999; Ariza ve ark., 1999; Oliveraira ve ark., 2001; Ward ve ark., 2001).

VanA direnç genini taşıyan ilk vankomisine dirençli *S. aureus* (VRSA) ise 2002 yılında Amerika'nın Michigan eyaletinde diyaliz hastasında kullanılan bir kataterden izole edilmiştir (Chang ve ark., 2003). Yine 2002 yılında diğer bir VRSA suşu Pennsylvania eyaletinde kronik topuk ülserine sahip bir hastanın irinli akıntısından alınan sıvı örneklerinden izole edilmiş (Tenover ve ark., 2004), ardından beş vakadan daha VRSA izolasyonu bildirilmiştir. Tüm bu vakalardaki VRSA'ların

vanA genini taşıdıkları ve hastaların anemnezinde MRSA kolonizasyonu ve sağaltım seçeneği olarak vankomisin kullanıldığı tespit edilmiştir (Sievert ve ark., 2008).

Hayvanlarda vankomisine fenotipik direnç varlığı ise, 2016 yılında Hindistan'ın Batı Bengal bölgesinde bulunan subklinik mastitisli inek ve keçilerin sütünden yapılan bir araştırmada bildirilmiştir (Bhattacharyya ve ark., 2016). Nijerya'da taze ve fermente süt örneklerinde yapılan bir çalışma ve yine Nijerya'da kanatlılarda yapılan çalışmalarda da sadece vankomisine karşı fenotipik direnç tespit edildiği bildirilmiştir (Otalı ve ark., 2011; Umaru ve ark., 2014; Okolie ve ark., 2015).

1.2. Etiyoloji

1.2.1. Sınıflandırma

Bergey's Manual Bakteri Sistematığı'ne göre *Stapylococcus* türleri Eubacteria alemi, Firmicutes şubesi, Bacilli sınıfı, Bacillales takımı, Stapylococcaceae ailesi ve *Stapylococcus* cinsi içerisinde yer alırlar (Akan, 2006). *Staphylococcus* cinsi içerisinde insan ve hayvanlar için en patojen tür *S. aureus* olarak bilinmektedir (Quinn ve ark., 1999; Quinn ve ark., 2004; Akan, 2006).

Tablo 1.1. *S. aureus*'un Sınıflandırılması (Akan, 2006).

Alem	Eubacteria
Şube	Firmicutes
Sınıf	Bacilli
Takım	Bacillales
Aile	Stapylococcaceae
Cins	<i>Stapylococcus</i>
Tür	<i>Staphylococcus aureus</i>

1.2.2. Genel Özellikler

Stafilokoklar, 0,5-1,5 µm çapına sahip, Gram pozitif, hareketsiz, sporsuz, bazı suşları hariç kapsülsüz, *Staphylococcus saccharolyticus* ve *Staphylococcus aureus* subsp. *anaberoibius* hariç fakültatif anaerofilik özellikte, yuvarlak şekilli bakterilerdir. Mikroskopik sahada tekli, ikili, dördü koklar halinde görülürler. Ayrıca birkaç kokun yan yana dizilmesi ile kısa zincirler veya üzüm salkımı benzeri şekiller oluşturabilirler (Holt ve ark., 1994; Quinn ve ark., 2004; Akan, 2006; Ilgaz ve ark., 2012).

Stafilokoklar, koyun kanlı agar ve nutrient agar gibi genel besiyerlerinde üreyebilmektedirler. Etkenler, 37 °C'de 24 veya 48 saatlik inkübasyonlar sonucunda makroskopik olarak agarda pürüzsüz ve parlak yüzeyle, düzgün kenarlı, dışı doğru hafif kabarıklık ve Smooth tipli (S-tipi) koloniler oluştururlar. Tüm Stafilokok türleri buyyonda inkübasyon sonucu homojen bulanıklık oluştururlar. *S. aureus* suşlarının bazıları kolonilerinde sarı-portakal renginde pigmentler oluştururken, bazı suşlar ise beyaz-gri renkli koloniler oluştururlar. *S. aureus* suşlarının birçoğu koyun kanlı agarda hemoliz zonları oluşturarak ürerler (Quinn ve ark., 2004; Akan ve ark., 2006; Winn ve ark., 2006; Ilgaz ve ark., 2012). Optimal üreme ısıları 37 °C olan Stafilokokların, optimal üreme pH'sı ise 7,4'tür. Bununla birlikte etkenler 7 °C- 48,5 °C arasındaki sıcaklıklarda ve pH 4,2-9,3 arasında da üreyebilmektedir (Quinn ve ark., 2004; Akan, 2006; Winn ve ark., 2006).

Stafilokoklar, biyokimyasal özellikleri yönünden değerlendirildiklerinde *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus vitulinis*, *Staphylococcus fleurettii* hariç oksidaz negatif olup, tüm türler katalaz pozitifdir. Tavşan ve insan plazmasını koagüle etme yeteneklerine göre KPS ve KNS olmak üzere iki gruba ayrılırlar. *S. aureus* koagulaz pozitifdir (Quinn ve ark., 1999; Quinn ve ark., 2004). Stafilokoklar, ihtiyaç duydukları enerjiyi oksidatif ve fermantatif yollarla üretme kapasitesindedirler. Stafilokokların çoğu türü kompleks nitrojen gereksinimlerinin sonucu olarak beslenmelerinde çeşitli amino asitler ile tiamin ve niasin vitaminlerine ihtiyaç duyarlar. Ayrıca Stafilokoklar glukozu fermantatif olarak parçalayıp son ürün

olarak gaz oluşturmaksızın laktik asit açığa çıkarırlar. Genellikle nitratları nitritleri indirgemektedirler (Winn ve ark., 2006; Ilgaz ve ark., 2012).

Stafilokoklar, ısı ve çevre koşullarına dirençli bakterilerdir. Etkenler, yüksek tuz yoğunluklarına dayanıklılık gösterip, %7,5-10 NaCl içeriğine sahip ortamlarda üreyebilmektedirler. Genel amaçlı kullanılan dezenfektanlara genellikle duyarlı olan etkenler, fenol bileşenli dezenfektanlara karşı direnç gösterirler. Genellikle 60 °C'de 1 saat tutulduklarında aktivitelerini kaybeden Stafilokoklar, kuruluğa karşı dirençlidir (Quinn ve ark, 2004; Akan, 2006; Winn ve ark., 2006).

S. aureus, neredeyse tüm evcil hayvanlarda çeşitli klinik tablolara sebep olur. Tüm türlerde irinli infeksiyonlar ve septisemiye neden olan *S. aureus* özellikle sığırların mastitis nedenleri arasında major etkenler olarak bilinirler (Ilgaz ve ark., 2012).

Tablo 1.2. Hayvanlarda *S. aureus* etiyojili bazı infeksiyonlar (Quinn ve ark., 1999; Quinn ve ark., 2004)

	Konakçı	İnfeksiyon
<i>S. aureus</i>	Sığır	Subklinik, kronik, akut, perakut veya gangrenöz mastitis Meme impetigosu Meme başı püstülleri
	Koyun	Akut, perakut, veya gangrenöz mastitis Kene piyemisi Periorbital egzama Stafilokokkal dermatitis
	Keçi	Subakut veya perakut mastitis Stafilokokkal dermatitis
	Domuz	Akut, subakut ve kronik mastitis Botriyomikoz Nekrotik stafilokokal endometritis Meme impetigosu
	At	Akut mastitis Botriyomikoz (Kastrasyonu takiben)
	Tavşan	Yeni doğan eksudatif dermatitisi Apse Konjunktivitis Piyemi
	Kümes Hayvanları	Bumble-foot Artritis ve septisemi (Hindi) Omfalitis (nadir)
	Kedi-Köpek	Supuratif lezyonlar

1.2.3. Virulens Faktörleri

Stafilokoklar konakçı vücuduna giriş yapması halinde immun sistem hücreleri olan nötrofiller tarafından öldürülürler. Bu sebeple Stafilokokların virulens faktörleri daha çok hücre içi ölümlerden veya fagositozdan kurtulma yönünde gelişim göstermiştir. İnsan ve hayvanlar için en önemli ve patojen tür olan *S. aureus* aynı zamanda virulensi en yüksek olan Stafilokok türüdür (İlgaz ve ark., 2012). *S. aureus*'un virulens faktörleri yapısal bileşenler, enzimler ve toksinler olmak üzere üç ana başlık altında toplanır (Peacock, 2006).

1.2.3.1. Yapısal Bileşenler

1.2.3.1.1. Hücre Duvarı ve Kapsül

Stafilokokların hücre duvarı standart Gram pozitif bakteri hücre duvarı yapısında olup, hücre duvarının ana bileşenlerini peptidoglikan ve teikoik asit oluşturur (İlgaz ve ark., 2012).

Peptidoglikan, N-asetilglukozamin (NAGA) ve N-asetilmuramik asit (NAMA) polimerlerinden oluşan bir disakkarittir. Peptidoglikan, bakterinin hücre duvarı kuru ağırlığının %50'sini oluşturur. Peptidoglikan tabakası bakterinin ozmotik basıncını stabilize ederek bakteriye şekli verir. Ayrıca bu tabaka makrofajlardan sitokin salınımını uyarması ile komplement aktivasyonuna ve trombosit agregasyonuna sebep olur. Diğer bir etkisi ise monositlerden interlökin (IL)-1 salınımını uyarmasıdır. Böylece polimorf nükleer lökositler infeksiyon bölgesine toplanır ve bu bölgede apse oluşumu gözlenir (Peacock, 2006).

Teikoik asit, ribitol veya gliserol fosfat polimerlerinin birbirlerine fosfodiester bağları ile bağlanması sonucu oluşur ve peptidoglikan tabakası içerisinde yer alır. *S. aureus*'ta iki tip teikoik asit bulunur. Birincisi; peptidoglikan tabakasına kovalent bağlarla bağlı hücre duvarı teikoik asididir. İkincisi ise stoplazmik membran glikolipitleri ile bağlantı kurmuş olan membran teikoik asididir. Teikoik asit, bakterinin konakçı mukozasına adhezyonunu sağlar. Tek başına zayıf bir immunojen olan teikoik asit, peptidoglikan ile birleştiğinde spesifik antikor yanıtını uyaran güçlü bir virulens faktörüne dönüşür (Peacock, 2006; İlgaz ve ark., 2012).

Ekzopolisakkarit yapıya sahip olan **kapsül**, bakteriyi fagositoza karşı korurken ayrıca etkenin uygun yüzeylere tutunmasını da sağlar (Sutra ve ark., 1990; Sutra ve Poutrel, 1994). *S. aureus*'un bilinen 11 farklı kapsül serotipi tanımlanmıştır. Özellikle tip 5 ve tip 8 serotipi klinik izolatlarda en yaygın bulunan serotipler olup, bu serotiplerin *S. aureus* ile ilişkili insan infeksiyonlarının ve sığır

mastitislerinin %70-80'inden sorumlu olduğu bildirilmiştir (Sutra ve Poutrel, 1994; Ilgaz ve ark., 2012).

1.2.3.1.2. Yüzey Proteinleri (Microbial Surface Proteins Recognizing Adhesive Matrix Molecules - MSCRAMM)

MSSCRAMM (Microbial Surface Proteins Recognizing Adhesive Matrix Molecules) olarak tanımlanan yüzey proteinleri, Stafilokokların konakçı dokularına yapışarak kolonize olmasını sağlayan en önemli faktördür. Stafilokokal yüzey proteinlerini; protein A, elastin bağlayıcı protein, kollajen bağlayıcı protein ve fibronektin bağlayıcı protein oluşturur.

Protein A, *S. aureus* suşlarının çoğunda iki formu bulunan bir yüzey proteindir. Biri, peptidoglikan tabakasına kovalent bağlarla bağlanmış hücre yüzeyine bağlı protein A, diğeri ise etkenin üretimi sırasında ortama salınan protein A'dır. Protein A'nın en önemli özelliği immunglobulinlerin (IgG₁, IgG₂, IgG₄, IgA₂, bazı IgM) Fc (kristalize fragment) reseptörlerine bağlanabilmesidir (İmmunglobulin bağlayan protein). Böylelikle güçlü immunojenik karaktere sahip olan protein A komplemanı aktive etme özelliği ile antifagositik, kemotaktik ve mitojenik etkilere sahip önemli bir virulens faktörüdür. *S. aureus* infeksiyonlarının teşhisinde kullanılan önemli bir yapı olan protein A ayrıca sığırlarda *S. aureus* mastitislerinden izole edilen suşlarda %50-60 oranında belirlenmiştir (Sutra ve Poutrel, 1994; Dego ve ark., 2002; Arda, 2011; Ilgaz ve ark., 2012).

Elastin, kollajen ve fibronektin bağlayıcı proteinler etkenin konakçı ekstrasellüler matriksine adezyonunda görev alırlar. Sığırların mastitis vakalarında bu yüzey proteinlerinin bakterinin özellikle meme dokusuna adezyonunda rol aldıkları belirtilmiştir (Sutra ve Poutrel, 1994).

1.2.3.1.3. Slaym Faktörü (Slime Factor)

Slaym maddesi, %40'ı karbonhidrattan, %27'si ise proteinden oluşan amorf kapsül yapısında glikokaliks bir materyaldir. Slaym faktörü bakteriyi fagositozdan korur, nötrofillerin etkisini önler ve lenfositlerin aktivitesini azaltır. Slaym faktörü özelliğinden dolayı Stafilokoklar metal ve plastik yüzeylere kolayca tutunabilirler. Slaym faktörüne sahip *S. aureus*, meme dokusu epitel hücrelerine slaym faktörü üretmeyen Stafilokoklara göre daha hızlı tutunur. Slaym faktörü çok güçlü antijenik yapıda olup, konakçıda yüksek titrede antikor oluşumuna neden olur (Baselga ve ark., 1993; Arslan ve Uçan, 2005; Yaşar ve ark., 2011).

1.2.3.2. Enzimler

Stafilokoklar, konakçı sisteminde kendilerine avantaj sağlayan birçok enzime sahiptir. Bu enzimler Stafilokokların yayılımını kolaylaştırarak infeksiyon patogenezinde önemli rol oynar (Peacock, 2006). Mastitis vakalarında *S. aureus*'un süt içinde hızla çoğalabilmesinde de bu enzimlerin önemli katkısı vardır (Sutra ve Poutrel, 1994).

1.2.3.2.1. Katalaz

S. aureus ve diğer tüm Stafilokok türleri ürettikleri katalaz enzimi sayesinde toksik olan hidrojen peroksidi (H_2O_2) toksik olmayan hidrojene ve suya ayrıştırabilirler. Ayrıca bakteriler katalaz enzimini üretmeleriyle birlikte fagositlerin içerisinde toksik oksijen radikalleri tarafından öldürülmeye karşı da direnç kazanırlar (Peacock, 2006).

1.2.3.2.2. Koagülaz

Koagülaz, patojenite ile ilgili bir faktördür ve plazmanın pıhtılaşmasına neden olur. *S. aureus*'un tüm suşları koagülaz pozitifdir. Stafilokoklarda koagülaz özelliği lam ve tüp koagülaz testi ile belirlenir. Lam koagülaz testinde kümeleştirme faktörü

(clumping factor), tüp koagülaz testinde ise serbest koagülaz varlığı saptanır (Akan, 2006).

Kümeleştirme faktörü (clumping factor), *S. aureus*'un hücre yüzeyinde bulunur ve fibronojene bağlanabilir. Fibronojenin fibrine dönüşümü ile bakteri yüzeyinde fibrin presipitasyonunu takiben kümeleşme ve aglütinasyon oluşur. Böylece bakterinin çevresinde fibrinden bir tabaka oluşması ile etken konakçı immun sisteminden korunur (Peacock, 2006).

Serbest koagülaz bakteriden dışarıya salgılanarak globülin yapısındaki plazma faktörü ile birleşerek trombin benzeri stafilotrombini oluşturur. Stafilotrombin ise fibronojeni fibrine dönüştürerek plazmayı pıhtılaştırır (Peacock, 2006).

1.2.3.2.3. Lipaz

Lipaz enzimi yağları hidrolize ederek lipid barındıran vücut bölgelerinde Stafilokokların lokalize olmasına yardımcı olur. Özellikle derideki yağ asitlerinin koruyuculuğunu azaltan lipaz enzimi sayesinde etkenler deride ve deri altında apse oluştururlar (Akan, 2006).

1.2.3.2.4. Hyaluronidaz

Yayıma faktörü olarak da bilinen hyaluronidaz enzimi, konakçı bağ dokusunda bulunan ve bağ dokusunun koruyucu maddesi olan hyaluronik asiti parçalayarak bakterilerin dokulara yerleşmesini ve yayılmasını kolaylaştırır (Akan, 2006).

1.2.3.2.5. Deoksiribonükleaz (DNaz)

DNaz enzimleri endonükleaz ve ekzonükleaz aktivitesine sahip, nükleik asitleri parçalayan fosfodiesterlerdir (Peacock, 2006).

1.2.3.2.6. Betalaktamaz (Penisilinaz)

Penisilinaz, Stafilokokların beta laktam grubu antibiyotiklere karşı kazandığı dirençte en önemli rolü oynayan enzimdir. Rezistanslık plasmidi (R-plasmidi) tarafından kodlanan penisilinaz, beta laktam grubu antibiyotiklerdeki β -laktam halkasının hidroksil grubunu parçalayarak antibiyotiği etkisiz hale getirir (Fuda ve ark., 2005; Akan, 2006).

1.2.3.3. Toksinler

S. aureus toksinleri, hastalık patogenezinde önemli rol oynayan virulens faktörleridir. Bu toksinler aracılığı ile etken hücre içinde canlı kalabilir ve yayılabilir. Ayrıca bazı membran aktif toksinler bakteriyi konak immün yanıtından korumakta ve konaktan sağlanan besinlere erişim yolunu açmaktadır (İlgaz ve ark., 2012)

1.2.3.3.1. Sitolitik Toksinler

1.2.3.3.1.1. Hemolizinler

Hemolizinler, çeşitli hayvanların eritrositlerinde hemoliz yapıp yapmamaları, hemoliz için gerekli koşullar ve toksitite kapasitelerine göre dörde ayrılır. *S. aureus*, bu dört hemolizine de (alfa, beta, gama, delta) sahiptir (Quinn, 2004; Peacock, 2006).

Alfa Hemolizin (Alfa Toksin), *S. aureus*'un en patojen hemolizini dir. Bakteriyel kromozamlarda ve plazmidlerde kodlanır. Antijenik, hemolitik, dermonekrotik ve sitolitik özelliklere sahip olan alfa toksini formolle toksoid hale getirilebilir. Kanlı agarda üreyen *S. aureus* kolonilerinin çevresindeki tam hemolizden sorumludur. Alfa toksin memeli hücre membranlarına bağlanarak oligomerize olur ve nekroza yol açan porlar oluşturur. Eritrositler alfa toksine en duyarlı hücrelerdir. Özellikle tavşan eritrositlerine karşı yüksek oranda litik aktivite gösterir. Ayrıca lökositlerde lizozomal parçalanmaya neden olarak düz kasları etkiler, kasılmalar ve paralizler sonucunda kan damarlarının düz kas epitel

dokusunda nekroza yol açarlar. Alfa toksin sığırların gangrenöz mastitisi ile de ilişkilendirilir (Quinn, 2004; Peacock, 2006; Müştak ve Esendal, 2008; Ilgaz ve ark., 2012).

Beta Hemolizin (Beta Toksin), ilk kez 1935 yılında Glenny ve Stevens tarafından tanımlanmış olmakla birlikte "sfingomiyelinaz C" olarak da bilinir (Glenny ve Stevens, 1935). Hücre membranında bulunan sfingomiyelin ile eritrosit, lökosit ve fibroblast hücrelerine etki eden bir toksindir. Bu toksinin hemolitik aktivitesinin ısı düşüşüyle birlikte artması sebebiyle "sıcak-soğuk hemolizin" olarak kaydedilmiştir. En güçlü litik etkisini sığır ve koyun eritrositlerine karşı gösterir. Sığır mastitis vakalarında rol oynayan önemli bir virulens faktörü olup alfa toksin ile birlikte doku yıkımı ve apse oluşumundan sorumludur. Beta toksin, sığırların meme bezlerindeki sekresyon üreten epitel hücrelerini yıkmalar, alfa toksinin etkisini artırır. Etkenin meme epitel hücrelerine adezyonunu kolaylaştırır ve bölgede proliferasyonunu artırır. Beta toksin antijenik yapıda olup antitoksini ile nötralize olur ve formol ile toksoid haline getirilebilir (Glenny ve Stevens, 1935; Sutra ve Poutrel, 1994; Cifrian ve ark., 1996; Dego ve ark., Peacock, 2006; Müştak ve Esendal, 2008).

Gama Hemolizin (Gama Toksin), özellikle tavşan, koyun ve insan eritrositleri üzerinde litik etkiye sahiptir. Bunun yanı sıra lökositleri lize etme yeteneğine de sahiptir. Gama toksinin patogenezdaki etkin rolü tam olarak bilinmemekle birlikte nötrofiller üzerindeki sitotoksik etkisi infeksiyonun başlangıç safhaları ile bağdaştırılır (Fitzgerald ve ark., 2000).

Delta Hemolizin (Delta Toksin), eritrosit, lökosit, makrofaj, lenfosit ve trombositler üzerinde hasara yol açan toksindir. Özellikle insan, tavşan, koyun ve maymun eritrositleri üzerine litik etkiye sahiptir. Ayrıca delta toksin, adenilat siklazı aktive ederek siklik adenozin monofosfat (cAMP) salınımına neden olur. Bunun sonucunda toksik şok sendromunda ve Stafilokok etiyolojili gıda zehirlenmelerinde diyare semptomlarının oluşumunda rol aldığı düşünülmektedir (Dinges ve ark., 2000; Müştak ve Esendal, 2008).

1.2.3.3.1.2. Lökosidinler (Lökotoksinler)

Lökosidinlerin polimorf nükleer nötrofiller ve makrofajlar üzerinde sitolitik ve lökotoksik etkisi vardır. Lökosidinler, moleküler ağırlığı 32 kilodalton (kDa) olan fast (F) ve 35 kDa olan slow (S) komponentlerden oluşur. Bu komponentlerden her biri ayrı ayrı antijenik yapıda olmasına rağmen, litik etkilerini gösterebilmeleri için bir arada bulunmaları gerekir. Sinerjik etki ile bu komponentler lökositlerin membranlarında iyon geçirgenliğini artıran gözeneklerin açılmasına neden olurlar. *S. aureus*'un en önemli lökosidini olan Panton-Valentine lökosidin (PVL), insanlarda nekrotizan primer kutanöz infeksiyonlar, deri ve yumuşak doku infeksiyonları, nekrotizan pnömoni ve tekrarlayan osteomyelitler ile ilişkilendirilmesi sebebiyle MRSA infeksiyonlarının patogeneziindeki en önemli virulens faktörlerinden biri olarak kabul edilmektedir. PVL toksini 1932 yılında keşfedilmesine rağmen 19. yüzyıl sonlarına doğru literatürlere geçmiştir (Monecke ve ark., 2007). Stafilokokkal toksin ailesi PVL (*lukS*-PV + *lukF*-PV), hemolizin (HIgA + HIgB ve HIgC + HIgB) ve *lukM* (*lukM* + *lukF*-PV) ile *lukE/D* (*lukE* + *lukD*)'den oluşmaktadır (Quinn ve ark., 2004; Winn ve ark., 2006; Müştak ve Esendal, 2008; Lo ve Wang, 2011). Meme bezlerinin savunma mekanizmasında en önemli defansının polimorf nükleer lökositler tarafından yapılan fagositoz olduğu göz önünde bulundurulduğunda, Stafilokok etiyolojisi ile ilişkili mastitislerin patogeneziinde PVL'nin önemli bir faktör olduğu düşünülmektedir (Rainard ve ark., 2003). Bunun yanı sıra, PVL'nin *S. aureus* mastitislerinin patogeneziindeki rolünün açık olmadığı ya da patogeneziinde öneminin olmadığını bildiren araştırmacılar da bulunmaktadır (Ikawaty ve ark., 2010; Gezgen ve Seker, 2016).

1.2.3.3.1.3. Epidermolitik Toksin (Eksfoliyatin)

Eksfoliyatin, ekzotoksin niteliğinde olan protein yapılı bir toksindir. Epidermolitik toksinler, immunolojik özellikleri birbirinden farklı, aynı 24 kDa moleküler ağırlığa sahip ve proteolitik özellikleri sayesinde epiderminin mukopolisakkarit matriksini parçalayarak aynı biyolojik aktiviteleri gösteren Epidermolitik Toksin A (ET-A) ve Epidermolitik Toksin B (ET-B) olmak üzere iki toksinden oluşur. ET-A kromozomal

kökenli olup 100 °C ısıya 20 dakikaya kadar dayanıklıdır, ET-B ise plazmid kökenli olup ısıya dayanaksızdır. İnsanlarda Stafilokokal haşlanmış deri sendromuna neden olan her iki toksin de insanlar için immunojenik yapıdadır (Winn ve ark., 2006).

1.2.3.3.1.4. Enterotoksinler

Bakteriler tarafından enterotoksin salınımını takiben konakçı immun sisteminin antijen sunan hücreleri ile karşılaşan toksin işlenerek T lenfosit sunulur böylece T lenfosit proliferasyonuna ve yüksek oranda sitokin ekspresyonuna neden olur (Balaban ve Rasooly, 2000). Önceleri Stafilokokal enterotoksilerin SEA, SEB, SEC, SED ve SEE olarak kodlanan beş immünolojik tipi belirlenmişken günümüzde bunlara ek olarak SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEQ, SER ve SET olarak kodlanan yeni immünolojik tipler de belirlenmiştir. Stafilokoklar tarafından üretilen polipeptid yapılı enterotoksinler ısıya dayanıklıdır ve 100 °C'de 30 dakikaya kadar direnç gösterirler (Winn ve ark., 2006). İnsanlarda özellikle besin zehirlenmelerinden sorumlu olan enterotoksinler, sığır mastitis vakalarından izole edilen Stafilokok suşlarında da tespit edilmiştir. Türkiye' de yapılan çalışmalarda Karahan ve ark. (2009), sığır mastitis vakalarından izole edilen *S. aureus* suşlarının %29,3'ünün bir veya daha fazla enterotoksin geni taşıdığını ve en yaygın genin SEI olduğunu bildirmişlerdir. Van'da 2008 yılında yapılan bir çalışmada ise Boynukara ve arkadaşları sığır mastitis vakalarından izole edilen *S. aureus* suşlarının %25,5'inde enterotoksin genlerini belirlediklerini ve en yaygın enterotoksin tipinin SEA olduğunu vurgulamışlardır (Boynukara ve ark., 2008).

1.2.3.3.1.5. Toksik Şok Sendromu Toksini-1 (TSST-1)

Toksik şok sendromu toksini-1 (TSST-1), protein yapıda olup 22 kDa moleküler ağırlığa sahiptir. Süper antijen olarak davranan TSST-1, T lenfosit proliferasyonu, IL-1, interferon- γ ve tümör nekrozis faktör salınımını uyarır (Winn ve ark., 2006). *S. aureus* suşlarının %5-25'i TSST-1 geni taşır. Sistemik olarak salgılanan TSST-1, insanlarda ateş, diyare, eritrodermi, mental konfüzyon, refrakter hipotansiyon ile karakterize bir tablo oluşturur ve toksik şoka neden olur (Dinges ve ark., 2000;

Moreillon ve ark., 2005; Alen ve ark., 2006). Ayrıca TSST-1 etkenin adezyonuna ve invazyonuna katkı sağlayarak *S. aureus*'un mastitislerdeki patojenitesini arttırmaktadır (Deogo ve ark., 2002).

1.3. Antibiyotik Etki ve Direnç Mekanizmaları

1.3.1. Metisilin Etki Mekanizması

Metisilin dahil tüm beta laktam grubu antibiyotikler; bakterinin hücre duvarı sentezinde görev alan ve "penisilin bağlayan proteinler (Penicillin binding proteins, PBPs)" olarak bilinen proteinlere bağlanarak, karboksipepsidaz ve transpepsidazı inhibe eder. Böylece peptidoglikanda çapraz bağlanma reaksiyonu durur. Zayıf hücre duvarı oluşumunu takiben bakteri hücre bütünlüğünü koruyamaz ve canlılığını kaybeder (Stapleton ve Taylor, 2002).

1.3.2. Metisiline Direnç Mekanizması

Metisilin direnci, beta-laktamaz enzimi ile hidrolize olmayan beta laktam antibiyotiklere (metisilin, oksasilin, kloksasilin, dikloksasilin) karşı gelişen direncin genel ismidir (Chambers, 1997; Ünal, 2009; Doğan ve ark., 2018).

Metisilin direnci, antibiyotiği inaktive eden faktörün beta-laktamaz enzimiyle değil, kromozomal yolla meydana geldiği direnç şeklidir. *S. aureus*'ta da metisilin direnci beta-laktamaz üretiminden farklı bir mekanizma olan PBP'ler vasıtasıyla gerçekleşmektedir (Chambers 1997; Doğan ve ark., 2018). *S. aureus*, bir adet iki fonksiyonlu PBP2 ile tek fonksiyonlu PBP1, PBP3 ve PBP4 olmak üzere toplam dört adet PBP'ye sahiptir (Jonge ve Tomasz, 1993; Doğan ve ark., 2018). PBP2, diğer PBP'lerden farklı olarak beta-laktam grubundaki antibiyotiklere karşı düşük affinite gösterir. Düşük affinite göstermesi sayesinde antibiyotik varlığının olduğu durumlarda yüksek affinite gösteren PBP'lerin fonksiyonunu devralarak peptidoglikan sentezinin devamlılığını sağlar (Jonge ve Tomasz, 1993; Stapleton ve

Taylor, 2002; Gordon ve Lowy, 2008; Pehlivanoglu ve Yardımcı, 2012; Doğan ve ark., 2018).

Metisiline dirençli Stafilokokların genetik yapılarında 40-60 Kilobayt (Kb) büyüklüğünde, "Stafilokokal Kaset Kromozom *mec* (Stapylococcal Cassette Chromosome *mec*, SCC*mec*)" olarak isimlendirilen DNA parçası vardır (Stapleton ve Taylor, 2002; Wielders ve ark., 2002). SCC*mec*; metisilin direncinde aktif rol oynayan ve PBP2'nin değişikliğe uğramış formu olan PBP2a'yı kodlayan *mecA* ve *mecC* geni ile *mecA* transkripsiyonunu düzenleyen *mecI* ve *mecRI* genlerinden oluşmaktadır (Chambers, 1997; Wielders ve ark., 2002; Pehlivanoglu ve Yardımcı, 2012; Hiramatsu ve ark., 2014; Doğan ve ark., 2018). Metisiline duyarlı *S. aureus*'larda (MSSA) bu genler bulunmazken, MRSA'lar bu genlere sahiptir (Appelbaum, 2007; Doğan ve ark., 2018)

S. aureus'larda *mecA* geninin varlığı ile ortaya çıkan metisilin direnci, fenotipik olarak **homojen direnç** ve **heterojen direnç** olmak üzere iki farklı şekilde ortaya çıkmaktadır (Stapleton ve Taylor, 2002; Wielders ve ark., 2002). Homojen direncin görüldüğü *S. aureus*'larda koloniyi oluşturan tüm bakteriler *mecA* genine sahiptir ve tamamında bu gen aktif haldedir. Oluşan bu yüksek düzeyli metisilin direncinin herhangi bir çevresel faktör ile bağlantısı bildirilmemiştir (Peacock, 2006; Doğan ve ark., 2018). Heterojen dirençte ise koloniyi oluşturan tüm *S. aureus*'lar *mecA* geni taşımalarına rağmen yüksek direnç sadece 10^6 - 10^8 bakteriden birinde belirlenir ve izolasyon uygulamalarında en sık karşılaşılan direnç türüdür (Henze ve ark., 1993; Hiramatsu ve ark., 2002; Doğan ve ark., 2018). İzole edilen *S. aureus* suşlarının *mecA* genini taşımalarına rağmen suşlarda heterojen direnç belirlenmesinin, *mecA* geninin fonksiyonunu kontrol ettiği düşünülen *fem* (metisilin direncinin ekspresyonu için gerekli faktörler, factors essential for the expression of methicillin resistance) faktörü olarak tanımlanan gen kompleksi üzerindeki *femA* ve *femX* kontrol genlerinin bir ya da birkaçının *mecA* geninin ekspresyonunu inhibe etmesine bağlı olduğu düşünülmektedir (Jacoby ve Archer, 1991; Chambers, 1997; Doğan ve ark., 2018).

Metisiline karşı fenotipik direnci ortaya çıkaran bir diğer durum ise aşırı beta-laktamaz üretimidir. Beta-laktamaz enzim üretiminden beta-laktamaz geni (*blaZ* geni) sorumludur ve antirepresör olan *blaRI* ve represör olan *blaI* genleri tarafından kontrol edilir. Ortamda bulunan beta-laktam, *blaRI* transmembran proteinine bağlanır. Bunun sonucunda bakteriye dışarıdan içeriye doğru sinyal iletimi gerçekleşir ve beta-laktamaz enzim sentezi aktive olur (Ryffel ve ark., 1992). Özellikle heterojen metisilin direnci gösteren suşlarda aşırı beta-laktamaz üretimine bağlı olarak ortaya çıkan direnç türüne **borderline (sınırdaki) direnç**, bu dirence sahip *S. aureus*'lara ise **BORSA (borderline resistant *S.aureus*)** adı verilmektedir (Montanari ve ark., 1990; Chambers, 1997).

Son yıllarda, β -laktamaz üretmeyip, *mecA* geni taşımadığı halde metisiline düşük düzeyde dirençli olduğu belirlenen *S. aureus* suşları tanımlanmıştır. Normal PBP'lere sahip olduğu halde bu proteinlerden PBP3'ün β -laktam ajanları bağlama kapasitesindeki modifikasyonlar nedeniyle bu suşlar, **MODSA (modified resistant *S. aureus*)** olarak isimlendirilmiştir (Bignardi ve ark., 1996; Chambers, 1997).

S. aureus'larda metisilin direncinin artması ile birlikte dünya genelinde başta hastane kaynaklı infeksiyonlar (HA-MRSA) olmak üzere, toplumsal kaynaklı (TA-MRSA) ve çiftlik hayvanları kaynaklı (LA-MRSA, Livestock-Associated MRSA) infeksiyonların prevalansında artış olduğu bilinmektedir (Morgan, 2008; Gopal ve Divya, 2017).

1.3.4. Vankomisin Etki Mekanizması

Vankomisin, glikopeptid yapıda bir antibiyotik olup, pentapeptit prekürsör ünitenin D-Alanin D-Alanin kısmına yüksek affinite ile bağlanarak bu yapının peptidoglikan yapıya bağlanmasını bloke eder ve böylece kros bağların oluşumunu önler (Courvalin, 2006).

1.3.5. Vankomisine Direnç Mekanizması

Staphylococcus suşlarında vankomisine karşı **homojen** ve **heterojen** olmak üzere iki tip direnç vardır. Ayrıca Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değerlerine göre Stafilokoklar, dirençli ve orta derecede duyarlı suşlar olarak gruplandırılır (CLSI, 2007).

Hetero-VISA (h-VISA) suşları genel olarak vankomisine duyarlı olup (MİK $\leq 4\mu\text{g/ml}$), MİK değeri 8-16 $\mu\text{g/ml}$ arasında değişen 1×10^6 kob (koloni oluşturan birim, colony forming unit, cfu) oranında ara dirençlilik gösteren bakterilerden oluşmaktadır (Hiramatsu ve ark., 1997). Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü'nün (Clinical and Laboratory Standarts Institute, CLSI) 2007 yılında yaptığı revizyon ile MİK değeri 4-8 $\mu\text{g/ml}$ olan *S. aureus* suşları h-VISA olarak kabul edilmiştir (CLSI, 2007, 2012, 2013, 2016, 2017). Hetero-VISA suşlar, Homojen VISA suşlar için prekürsör olarak kabul edilmektedir (Hiramatsu ve ark., 1997).

Vankomisin direnç mekanizması h-VISA suşlarında vankomisine duyarlılığın azalması ile ilişkilidir. Vankomisine duyarlılığın azalması ise bakteri hücre duvarı peptidoglikan biyosentezinde gerçekleşen değişikliklerle açıklanmaktadır. VISA suşlarında Vankomisine duyarlı *S. aureus* (VSSA) suşlarına göre daha fazla miktarda peptidoglikan sentezlenir ve bu sebeple VISA'ların hücre duvarında düzensiz kalınlaşmalar görülür. Ayrıca peptidoglikan zincirlerindeki çapraz bağlanmalarda da azalmalar ile birlikte D-alanin D-alanin rezidülerinin sayısında artışlar olur (Hiramatsu ve ark., 1997; Hanaki ve ark., 1998; Geisela ve ark., 1999). Tüm bu değişiklikler sonucunda vankomisin, fazlaca bulunan D-alanin D-alanin rezidüleri tarafından tutulur ve bakteri yüzeyinde birikir. Böylece diğer vankomisin molekülleri bakteri hücre duvarı sentezinin gerçekleştiği plazmik membrana yakın yerdeki hedef bölgelere ulaşamaz (Hiramatsu, 2001). VISA suşlarında vankomisin duyarlılığının azalması bu mekanizma ile açıklanırken, genellikle bu durumun vankomisin ile muamele sonucunda oluştuğu bildirilmiştir (Hageman ve ark., 2006).

VRSA suşlarında görülen direnç mekanizması ise *vanA* geninin varlığı ile açıklanmaktadır. *Enterococcus faecalis*'ten konjugasyon yolu ile *S. aureus*'a *vanA* geninin geçmesi ile birlikte bu gene sahip VRSA suşlarında, hücre duvarındaki N-Asetil Muramik Asit/N-Asetil Glukozamin (NAMA/NAGA) peptidlerin D-alanin D-alanin terminal kısmının yerini D-alanin D-laktat dizisinin alması sonucunda etkenin vankomisine karşı affinitesi 1000 kat kadar azalır (Tenover, 2006; Gardete ve Tomasz, 2014; McGuinness ve ark., 2017). Vankomisine dirençli Enterokoklardan *S. aureus*'a *vanA* geninin transferi Tn1546 transpozonunu taşıyan konjugatif karakterli plazmid aracılığıyla gerçekleşir (Tenover ve ark., 2004; Hageman ve ark., 2006; McGuinness ve ark., 2017).

S. aureus suşlarında genel direnç genotipinin VanA tipi direnç olduğu belirtilmekle birlikte, son yıllarda suşlarda VanA tipi direnç dışında VanB tipi direnç belirlendiğini bildiren araştırmalar da mevcuttur (Saadat ve ark., 2014). VanA tipi dirençte, indüklenbilir yüksek seviyede vankomisin (MİK \geq 64 μ g/ml) direncinin görüldüğü belirtilmektedir (Courvalin, 2006).

Yapılan bu çalışmada, Afyonkarahisar merkez ilçelerindeki mastitisli ineklerden toplanan meme lobu süt örneklerinden *S. aureus* izolasyonu, izole edilen bu suşlarda *mecA*, *vanA* ve *pvl* genlerinin varlığının araştırılması ve suşların veteriner sahada yaygın olarak kullanılan çeşitli antibiyotiklere direnç fenotiplerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Örneklenen Hayvanlar ve Örneklerin Toplanması

Nisan 2017 ve Ekim 2018 tarihleri arasında Afyonkarahisar ili Merkez ilçe ve köylerinde bulunan 40 farklı aile tipi (küçük ölçekli) işletme örnekleme amacıyla ziyaret edildi. Örnekleme bu işletmelerdeki laktasyonun farklı dönemlerinde bulunan, en az bir doğum yapmış, son üç ayda antibiyotik tedavisi uygulanmamış 170 baş sağmal inek dahil edildi. Materyal olarak, örneklenen hayvanların 78 meme lobunun kör olması nedeniyle, toplam 602 meme lobu süt örneği kullanıldı. Örneklenen hayvanların örnekleme yapıldığı yerlere göre dağılımı Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Örneklenen hayvanların örnekleme yapıldığı yerlere göre dağılımı

Örnekleme Yapılan Yerler	Örneklenen Hayvan Sayısı (n)
Akçın	11
Çavdarlı	20
Çukurköy	9
Değirmendere	21
Düzağaç	35
İscehisar	10
Küçükçobanlar	10
Sinanpaşa	12
Sülün	22
Susuz	20

Örneklemeden önce meme loblarının fiziksel muayenesi yapılarak, loblarda mastitis yönünden makroskobik bulgular ve anormallikler olup olmadığı kayıt altına alındı. Ardından, her bir meme lobuna California Mastitis Testi (CMT) uygulandı ve test skorlamaları (+1, +2, +3, şüpheli ve negatif) Schalm ve ark. (1971) tarafından

önerildiği şekilde yapıldı. Skorlama sonrasında CMT'ye negatif, şüpheli ve pozitif reaksiyon gösteren hayvanların her bir meme başı %70'lik alkolle temizlendi, kurulandı ve ilk sağım sütü uzaklaştırıldı. Sonrasında, her bir memeden steril tüpler içerisine 10 ml süt örneği alınarak, örnekler en kısa sürede soğuk zincirle laboratuvara ulaştırıldı.

2.1.2. Standart Suşlar

Tüm test ve uygulamalarda *S. aureus* ATCC 33591 (MRSA), *S. aureus* ATCC 49775 (PVL pozitif *S. aureus*) ve *E. faecium* ATCC 51559 pozitif kontrol suşları ile *S. aureus* ATCC 25923 (MSSA) negatif kontrol suşu kullanıldı.

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

Columbia Blood Agar Base (Oxoid, İngiltere)

Trypticase Soy Agar (TSA) (Oxoid, İngiltere)

Trypticase Soy Broth (TSB) (Oxoid, İngiltere)

Nutrient Broth (NB) (Oxoid, İngiltere)

Mueller Hinton Agar (MHA) (Oxoid, İngiltere)

Oksidasyon/Fermentasyon (O/F) Basal Medium (Merck, Almanya)

Gram boyama solüsyonları

Fizyolojik tuzlu su (%0,9'luk FTS)

Hidrojen peroksit çözeltisi (%3'lük ve %30'luk H₂O₂)

Taze tavşan plazması

CMT solüsyonu (Eimü, Almanya)

%10'lük glikoz ve mannitol solüsyonları

Steril parafin (Aykim, Bursa, Türkiye)

Steril gliserin (Tekkim, Bursa, Türkiye)

Oksidaz test kiti (Bioanalyse, Ankara, Türkiye)

Gram pozitif ticari identifikasyon kiti (BD BBL Crystal™ Gram-Positive ID Kit)

(Becton, Dickinson and Company, ABD)

Amoksisilin+klavulanik asit (30µg) (Oxoid, İngiltere)
 Enrofloksasin (5µg) (Oxoid, İngiltere)
 Sefoksitin (30µg) (Oxoid, İngiltere)
 Oksasilin (1µg) (Oxoid, İngiltere)
 Sefalothin (30µg) (Oxoid, İngiltere)
 Rifampisin (5µg) (Oxoid, İngiltere)
 Gentamisin (10µg) (Oxoid, İngiltere)
 Eritromisin (15µg) (Oxoid, İngiltere)
 Penisilin G (10U) (Oxoid, İngiltere)
 Tetrasiklin (30µg) (Oxoid, İngiltere)
 Trimetoprim/Sulfametoksazol (25µg) (Oxoid, İngiltere)
 Vankomisin (30µg) (Oxoid, İngiltere)

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

Tris-Borate-EDTA Buffer 10X (10X TBE Buffer) (Fermentas, Litvanya)
 Ethidium bromid solüsyonu (AppliChem, Almanya)
 Agaroz (Basica Le Agarose, Prona, Fransa)
 Primerler (ThermoFisher Scientific, Almanya)
 10X PCR buffer (Fermentas, Litvanya)
 dNTP mix (Fermentas, Litvanya)
 MgCl₂ (Fermentas, Litvanya)
 Taq DNA Polymerase (Fermentas, Litvanya)
 DNA ladder (GeneRuler™ 100 bp DNA ladder, Fermentas, Litvanya)
 6XLoading dye (Fermentas, Litvanya)
 GeneJet Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, Litvanya)
 Vorteks (Ika, Almanya)
 Soğutmalı santrifüj (Sigma, Almanya)
 Hassas terazi (Ohaus-Pioneer, İsviçre)
 Thermal cyclers (Techne-TC-Plus, İngiltere)
 Elektroforez güç kaynağı (Thermo Scientific, ABD)

Jel elektroforez cihazı (Thermo Scientific, ABD)

UV-transilluminatör (Vilber Lourmat, Avustralya)

2.2. Yöntem

2.2.1. Örneklerden *Staphylococcus aureus*'un İzolasyon ve İdentifikasyonu

Aseptik koşullarda toplanan her bir süt numunesinden 10 µl alınarak %7 oranında koyun kanı içeren Columbia Blood agara (Oxoid, İngiltere) ekim işlemi yapıldı. Ekim yapılan petripler 37 °C'de aerobik koşullarda 24 saat inkube edildi. İnkubasyon sonrasında agarda en az beş koloni oluşturan numuneler değerlendirmeye alınarak, koloniler makroskopik ve mikroskopik yönden incelendi. Kenarları düzgün, yuvarlak, üst kısmı pürüzsüz, parlak, smooth (-S) tipli, sarımsı-krem veya beyaz renkli, 1-2 mm çapındaki kolonilerin Gram boyaması yapıldı. Mikroskopik morfolojisi Gram pozitif kok şeklinde olan ve üzüm salkımı benzeri yığınlar oluşturan kolonilerden birer tane seçilerek pasajları yapıldı ve saf kültürler elde edildi. Şüpheli izolatlar öncelikle standart biyokimyasal testler olan oksidaz, lamda ve tüpte katalaz, lamda ve tüpte koagülaz, mannitolün anaerobik fermantasyonu ve glukoz fermantasyonu testleri uygulandı (Quinn ve ark., 2004; Arda, 2011; Ilgaz ve ark., 2012). Standart biyokimyasal testleri takiben, izolatların kesin identifikasyonları ise, üretici firmanın önerisi doğrultusunda kullanılan Gram pozitif ticari identifikasyon kiti (BD BBL Crystal™ Gram Positive ID kit, Becton Dicksion and Company, USA) ile gerçekleştirildi. İdentifikasyonu tamamlanan suşlar, DNA ekstraksiyonu ve antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanılmak üzere, içerisine %15 oranında gliserin ilave edilen TSB'ler (Oxoid, İngiltere) içerisinde -20 °C'de saklandı.

2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

2.2.2.1. DNA Ekstraksiyonu

Metisiline direnç geni ve *pvl* toksin geni pozitif kontrol suşları, *mecA* geni negatif kontrol suşu ve çalışmada elde edilen *S. aureus* test suşlarından DNA ekstraksiyonu kaynatma yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Kaynatma yöntemi için, kontrol suşları ve test suşlarının TSA'da (Oxoid, İngiltere) üremiş taze ve saf kolonilerinden birer adet seçilerek 500 µl steril distile su içeren ependorflar (DNase-RNase free) içerisinde süspansiyon edildi. Elde edilen süspansiyonlar, 100 °C'lik su banyosunda 10 dakika kaynatıldıktan sonra 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi (Garipcin ve Seker, 2015; Gezgen ve Seker, 2016). Vankomisin direnç geninin belirlenmesinde kullanılacak olan *E. faecium* ATCC 51559 pozitif kontrol suşundan DNA ekstraksiyonu ise ticari genomik DNA purifikasyon kiti (Thermo Scientific, Litvanya) kullanılarak yapıldı. Ekstrakte edilen bakteriyel DNA'lar, PZR karışımında kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edildi.

2.2.2.2. Amplifikasyon Koşulları

Çalışmada kullanılan primerlere ait oligonükleotid sekansları, bant büyüklükleri ve primer tasarımlarının alındığı referanslar Tablo 2.2'de verilmiştir. *Staphylococcus* spesifik 16S rDNA ve *mecA* genlerinin belirlenmesinde ikili PZR protokolü, *pvl* toksin geni ile *vanA* geninin belirlenmesinde ise tekli PZR protokolü kullanıldı.

Tablo 2.2. Kullanılan primerlere ait oligonükleotid sekansları, bant büyüklükleri ve referanslar

Hedef Genler		Oligonükleotid sekansları (5'-3')	Bant büyüklüğü (bç)	Referans
16S rDNA	Forward Reverse	CAGCTCGTGTTCGTGAGATGT AATCATTGTCCCACCTTCG	420	Strommenger ve ark., 2003
<i>mecA</i>	Forward Reverse	CCTAGTAAAGCTCCGGAA CTAGTCCATTCCGGTCCA	314	Choi ve ark., 2003
<i>vanA</i>	Forward Reverse	GGGAAAACGACAATTGC GTACAATGCGGCCGTTA	732	Dutka-Malen ve ark., 1995
<i>pvl</i>	Forward Reverse	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAAGC	433	Lina ve ark., 1999

Final hacmi 25 µl olacak şekilde hazırlanan PZR karışımını oluşturan bileşenler ve miktarları 16S rDNA ve *mecA* genleri için Tablo 2.3'de, *pvl* ve *vanA* genleri için Tablo 2.4'de sunulmuştur. DNase ve RNase içermeyen mini PZR tüplerine 20'şer µl olarak dağıtılan her bir karışımın üzerine 5µl hedef DNA ilave edildi. Tamamlanan reaksiyon karışımları için uygulanan amplifikasyon koşulları Tablo 2.5'de verilmiştir. Ethidium bromid (5µl/ml) ile boyanarak %1,5'luk agaroz jelde sabit akımda 100 voltta 60 dakika elektroforeze tabi tutulan amplifikasyon ürünleri (16S rDNA 420 bç, *mecA* 314 bç ve *pvl* 433 bç) UV-transilluminatörde görüntülendi. *vanA* (732 bç) geni için yapılan işlemde ise örnekler %1,8'lik agaroz jelde sabit akım 150 voltta 60 dakika elektroforez uygulandı.

Tablo 2.3. PZR karışımını oluşturan bileşenler ve miktarları (16S rDNA ve *mecA*)

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

Tablo 2.4. PZR karışımını oluşturan bileşenler ve miktarları (*pvl* ve *vanA*)

PZR Bileşenleri	Miktar (<i>pvl</i>)	Miktar (<i>vanA</i>)
10XPCR buffer	2,5 µl	2,5 µl
dNTP karışımı	0,5 µl	0,5 µl
MgCl ₂	3 µl	1,5 µl
Primer-F	0,1 µl	0,1 µl
Primer-R	0,1 µl	0,1 µl
Taq DNA polimeraz (1U)	0,2 µl	0,5 µl
Distile su	13,6 µl	17,8 µl

Tablo 2.5. 16S rDNA, *mecA*, *pvl* ve *vanA* genleri için uygulanan amplifikasyon koşulları

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık			Süre		
		<i>mecA</i> 16S rDNA	<i>pvl</i>	<i>vanA</i>	<i>mecA</i> 16S rDNA	<i>pvl</i>	<i>vanA</i>
Ön denatürasyon	1	95 °C	95 °C	95 °C	5 dk	5 dk	10 dk
Denatürasyon	30	95 °C	94 °C	94 °C	2 dk	30 sn	30 sn
Primer bağlanması	30	54 °C	62 °C	58 °C	1 dk	30 sn	30 sn
Uzama	30	72 °C	72 °C	72 °C	1 dk	1 dk	30 sn
Son uzama	1	72 °C	72 °C	72 °C	7 dk	5 dk	10 dk

2.2.3 Antibiyotik Duyarlılık Testleri

S. aureus olarak identifiye edilen tüm suşların antibiyotik duyarlılıkları/dirençlilikleri CLSI kriterleri tarafından önerildiği şekilde Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlendi (CLSI, 2007, 2012, 2013, 2016, 2017). Test edilecek antibiyotik disklerini amoksisilin+klavulanik asit (30µg), enrofloksasin (5µg), sefoksitin (30µg), oksasilin (1µg), sefalothin (30µg), rifampisin (5µg), gentamisin (10µg), eritromisin (15µg), penisilin G (10U), tetrasiklin (30µg), trimetoprim/sulfametoksazol (25µg) ve vankomisin (30µg) antibiyotik diskleri (Oxoid, İngiltere) oluşturdu. Tüm uygulamalarda pozitif (MRSA ATCC 33591) ve negatif (MSSA ATCC 25923) kontrol suşları da kullanıldı.

Yoğunluğu McFarland No. 0,5'e göre ayarlanmış her bir taze bakteri buyyon kültüründen 0,1 ml alınarak, buyyon kültürleri steril cam bagetler yardımıyla Mueller Hinton agara (Oxoid, İngiltere) yayıldı. Agar yüzeyine steril antibiyogram pensleri yardımıyla yerleştirilen antibiyotik disklerinden oksasilin (1µg) ve sefoksitin (30µg) disklerini içeren petripler aerobik koşullarda 35 °C'de 24 saat inkübe edilirken, diğer petripler 37 °C'de 24 saat süreyle inkübasyona kaldırıldı. İnkübasyon süresi sonunda oluşan zon çapları mm cinsinden ölçüldü. Elde edilen değerler CLSI kriterleriyle karşılaştırılarak, test edilen suşlar dirençli (R), orta derecede duyarlı (I) ve duyarlı (S) olarak değerlendirildi (CLSI, 2007, 2012, 2013, 2016, 2017).

3. BULGULAR

3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Çalışmada, Afyonkarahisar ili Merkez ilçe ve köylerinde bulunan 40 farklı küçük ölçekli aile tipi işletmeden çalışmaya dahil edilen toplam 170 baş sağmal ineğe ait 602 meme lobu süt örneği kullanıldı. Her bir meme lobuna uygulanan CMT sonuçlarına göre, 355 meme lobundan alınan süt örneklerinin CMT'ye pozitif reaksiyon verdiği, 181 meme lobu süt örneğinin CMT'ye negatif reaksiyon verdiği, 66 meme lobu süt örneğinin ise şüpheli reaksiyon verdiği tespit edildi.

CMT skorlamasına göre, CMT'ye pozitif, negatif ve şüpheli reaksiyon verdiği belirlenen toplam 602 meme lobu örneğinden 23 adet *S. aureus* (%3,8) suşu identifiye edildi.

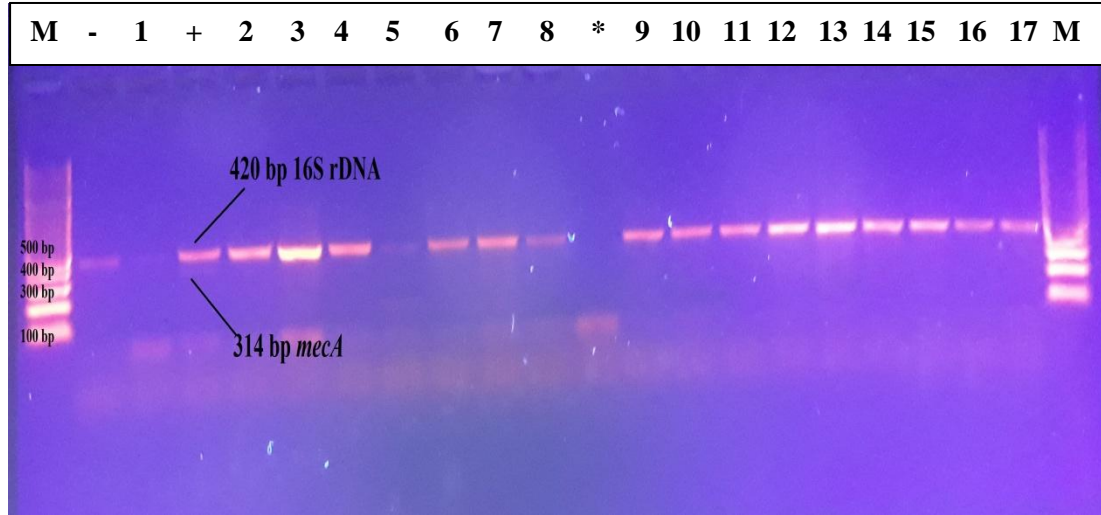
Tablo 3.1. İdentifiye edilen *S. aureus* suşlarının CMT skorlamasına göre dağılımı

CMT Skorlaması (n)	<i>S. aureus</i>	
	n	%
+1 (163)	3	1,8
+2 (146)	13	8,9
+3 (46)	4	8,7
Negatif (181)	3	1,6
Şüpheli (66)	-	-

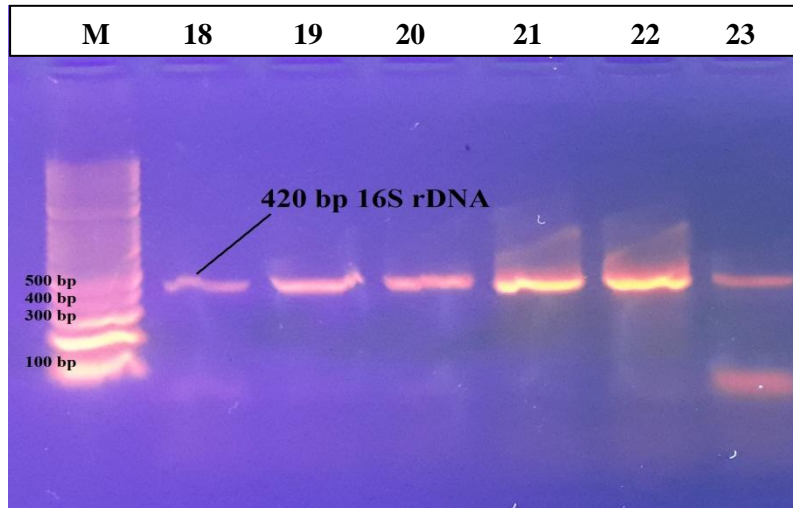
3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları

Toplam 602 meme lobu süt numunesinden kesin identifikasyonu kit ile gerçekleştirilen 23 adet *S. aureus* suşuna uygulanan ikili PZR sonuçlarına göre; suşların tamamının 16S rDNA genine sahip olduğu, ancak hiç birinin *mecA* geni taşımadığı belirlendi. Vankomisin direnci ve PVL toksin varlığının da araştırıldığı

çalışmada, 23 *S. aureus* suşunun hiç birinde *vanA* direnç geni ve *pvl* toksin geni saptanamadı. *Staphylococcus* spesifik 16S rDNA (420 bç) genine ait jel görüntüsü Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. 16S rDNA ve *mecA* genlerine ait PZR bulguları. M: DNA ladder (100 bp); -: *mecA* negatif kontrol (MSSA ATCC 25923); +: *mecA* pozitif kontrol (MRSA ATCC 33591); *: steril distile su; sütun 1,2-8, 10-17: 16S rDNA pozitif, *mecA* negatif *S. aureus* test suşları



Şekil 3.2. 16S rDNA ve *mecA* genlerine ait PZR bulguları. M: DNA ladder (100 bp); sütun 18-23: 16S rDNA pozitif, *mecA* negatif *S. aureus* suşları

3.3. Antibiyotik Duyarlılık Testi Bulguları

S. aureus olarak identifiye edilen tüm suşların veteriner sahada mastitis sağaltımında yaygın olarak kullanılan çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılık/dirençlilik durumlarının belirlenmesinde Kirby-Bauer disk difüzyon testi kullanıldı. Test edilen suşlarda, en yüksek direnç oranının %52,2 (n=12) ile penisilin G'ye karşı olduğu, bu oranı %21,7 (n=5) ile eritromisin ve oksasilin, %17,4 (n=4) ile amoksisilin+klavulanik asidin izlediği belirlendi. Enrofloksasin ve gentamisine karşı ise izolatların %95,7 oranında duyarlılık gösterdiği tespit edildi (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. *S. aureus* suşlarının antibiyotiklere duyarlılık/dirençlilik oranları

Antibiyotikler	<i>S. aureus</i> suşları (n=23)					
	R		I		S	
	n	%	n	%	n	%
Amoksisilin+klavulanik asit (30µg)	4	17,4	-	0	19	82,6
Enrofloksasin (5µg)	1	4,3	-	0	22	95,7
Sefalothin (30µg)	3	13	1	4,3	19	82,7
Rifampisin (5µg)	3	13	-	0	20	87
Gentamisin (10µg)	1	4,3	-	0	22	95,7
Eritromisin (5µg)	5	21,7	12	52,2	6	26,1
Penisilin G (10U)	12	52,2	-	0	11	47,8
Tetrasiklin (30µg)	2	8,7	1	4,3	20	87
Trimetoprim+Sulfametoksazol (25µg)	3	13	-	0	20	87
Vankomisin (30µg)	3	13	-	0	20	87
Oksasilin (1µg)	5	21,7	-	0	18	78,3
Sefoksitin (30µg)	2	8,7	2	8,7	19	82,6

4. TARTIŞMA

Mastitis, hem neden olduğu ekonomik kayıplar hem de hayvan refahı açısından tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de süt yönlü sığır yetiştiriciliğinin en önemli sorunlarından biridir (Bhutto ve ark., 2012; Gezgen ve Seker, 2016; Galfi ve ark., 2017; Benedictus ve ark., 2019). Süt üretimi ve dolayısıyla süt yönlü sığır yetiştiriciliği ülkemiz endüstrisinin ana lokomotiflerinden birisi olup, 2018 verilerine göre toplam sağmal kültür sığırı ile melez ve yerli sığır varlığı 6.337.906 adettir (TÜİK, 2018b). Yine 2018 verilerine göre yıllık toplam 20.036.877 ton sığır sütü üretildiği görülmektedir (TÜİK, 2018a). Yıllık 57,7 milyon Türk Lirası'nın üzerinde olduğu düşünülen mastitis kaynaklı maddi kayıp azımsanmayacak oranda önemli bir sorun teşkil etmektedir (Çokal ve Konuş, 2012). Resmi verilerle de desteklendiği üzere, süt üretimi ve süt yönlü sığır yetiştiriciliği ülke ekonomisi için büyük önem taşımaktadır. Sunulan bu çalışma ile Afyonkarahisar ili merkez ilçe ve köylerinde bulunan sağmal ineklerde *S. aureus*'a bağlı mastitis prevalansının ve izole edilen suşlardaki antibiyotik dirençlilik oranlarının belirlenmesinin, bölge ve dolayısıyla ülke ekonomisi üzerine olumlu bir katkı sağlayacağı düşünülmüştür.

California mastitis testi, subklinik mastitislerin teşhisi amacıyla sütteki somatik hücre sayısının (SHS) yaklaşık olarak tahmin edilebilmesine olanak sağlayan, kompleks ekipmanlara gerek duyulmayan sahada basitçe uygulanabilen, kullanışlı, hızlı sonuç veren, ekonomik bir testtir. CMT, sütteki SHS miktarına yönelik sayısal bir değer vermemekle birlikte, hücre sayılarının yüksek veya düşük olduğuna dair tahmini bir fikir verebilmektedir. CMT'ye pozitif reaksiyon alınan hayvanlara şüphe ile yaklaşılması genel bir kanı olarak kabul görmekle birlikte (Vural ve ark., 2016), CMT negatif olan hayvanların mastitis etkenleri yönünden arı olarak kabul edilmemesi gerektiği vurgulanmaktadır (Bhutto ve ark., 2012; Gezgen ve Seker, 2016). İngiltere'de ineklerde subklinik mastitis teşhisinde CMT skorlaması ile etken izolasyonu arasındaki ilişkinin incelendiği bir araştırmada, 240 meme lobu süt örneğinin toplandığı, CMT ile negatif reaksiyon veren meme loblarının %57,6'sında, CMT şüpheli olarak değerlendirilen meme loblarının %64,9'unda mikrobiyolojik üreme tespit edildiği bildirilmiştir (Bhutto ve ark., 2012). Aynı

çalışmada, bakteri izolasyonunun oranının +1 olarak değerlendirilen meme loblarında %75,7, +2 olarak değerlendirilen meme loblarında ise %87,4 olduğu vurgulanmıştır (Bhutto ve ark., 2012). Gezgen ve Seker (2016) Türkiye'de 972 meme lobu süt örneğinden izole ettikleri 60 *S. aureus* suşunun 9'unun CMT negatif meme loblarından elde edildiğine dikkat çekerken, 15'inin CMT skorunun +1, 27'sinin +2 ve 9'unun +3 olduğunu belirtmiştir. Türkiye'de CMT pozitif ve negatif meme loblarının değerlendirilmeye alındığı bir başka çalışmada da CMT negatif meme loblarında %30,1 oranında bakteri izolasyonu varlığı bildirilmiştir (Alkan ve ark., 2014).

Bu çalışmada, örneklenen meme loblarının 355'i CMT pozitif, 181'i CMT negatif ve 66'sı CMT reaksiyonu için şüpheli olarak değerlendirildi. Çalışmada CMT'ye negatif reaksiyon veren meme loblarından *S. aureus* izolasyon oranı %1,6 olarak belirlenirken, bu oran CMT +1 olarak derecelendirilen meme loblarında %1,8, +2 olarak derecelendirilen meme loblarında %8,9 ve CMT +3 olarak derecelendirilen meme loblarında ise %8,7 olarak tespit edildi. Sunulan çalışmada, hem CMT pozitif, hem de CMT negatif olarak değerlendirilen meme lobu süt örneklerinden *S. aureus* izolasyon oranı, konu ile ilgili benzer araştırmalarda bildirilen izolasyon oranlarından düşük bulundu. Bu farklılığın nedeninin, diğer araştırmacıların çalışmalarına dahil ettiği mastitis patojenlerinin farklı *Staphylococcus* türlerini içerirken, bu çalışmanın sadece *S. aureus* izolasyonuna yönelik olması ile ilişkili olabileceği düşünüldü. Bunun yanı sıra, bu çalışmada izole edilen *S. aureus* izolat sayısı da düşüktü. Ayrıca bazı araştırmacılar (Sargeant ve ark., 2001; Pyörälä ve ark., 2009) tarafından da bildirildiği üzere, CMT'nin spesifitesi ve sensitivitesinin değişken olabilmesinin de bu farklılığın ortaya çıkmasında etkili olabileceği düşünüldü.

Sığırlarda mastitise neden olan birçok etken bulunmasına rağmen, *S. aureus* mastitis etiyolojisinde ilk sıralarda yer almaktadır (Macun ve ark., 2011; Wang ve ark., 2015; Birhanu ve ark., 2017). Bu nedenle, mastitis vakalarında *S. aureus* prevalansının araştırılması ülkemiz dahil neredeyse tüm dünyada bilimsel çalışmalara sıkça konu olmuştur (Coelho ve ark., 2009; Macun ve ark., 2011; Tel ve Keskin, 2011; Yeşilmen ve ark., 2012; Wang ve ark., 2015; Birhanu ve ark., 2017;

Kenar ve ark., 2017). *S. aureus* mastitislerine yönelik yapılan bu çalışmalarda elde edilen veriler değişiklik göstermektedir. Etiyopya’da yapılan bir çalışmada çeşitli yaş gruplarındaki subklinik mastitisli ineklerden oluşan 170 CMT pozitif süt örneğinden %44,95 oranında *S. aureus* izole edildiği bildirilmiştir (Birhanu ve ark., 2017). Hoque ve ark.’nın (2018) Bangladeş’te *S. aureus* mastitislerinin moleküler karakterizasyonu ile ilgili yaptıkları bir çalışmada, laktasyon döneminde bulunan toplam 175 adet ineğin mastitis yönünden rastgele seçim yöntemiyle tarandığı ve mastitisli olduğu belirlenen 50 ineğin *S. aureus* nedeni mastitis sürü prevalansının %72,7 olduğu rapor edilmiştir (Hoque ve ark., 2018). Hosseinzadeh ve Saei (2014) tarafından İran’da yapılan bir çalışmada mastitisli hayvanlara ait 158 süt örneğinden sadece 5’i *S. aureus* olarak tiplendirilmiştir. Ülkemizde de mastitisli hayvanlardan *S. aureus* izolasyonuna yönelik yapılan çalışmalarda farklı izolasyon oranları bildirilmiştir (Macun ve ark., 2011; Pehlivanoğlu ve Yardımcı, 2012; Yeşilmen ve ark., 2012; Gezgen ve Seker, 2016). Burdur ilinde yapılan bir çalışmada CMT pozitif numunelerden elde edilen 100 izolattan 65’i (%65) *S. aureus* olarak tanımlanmıştır (Pehlivanoğlu ve Yardımcı, 2012). Diyarbakır’da yapılan bir başka çalışmada ise CMT pozitif subklinik mastitisli ineklerden elde edilen izolatlardan %24,63’ünün *S. aureus* olduğu tespit edilmiştir (Yeşilmen ve ark., 2012). Benzer şekilde Macun ve ark. (2011) tarafından Kırıkkale’de yapılan bir çalışmada CMT pozitif olan 836 meme lobu süt örneğinden %28,17 oranında *S. aureus* tanımlanmıştır (Macun ve ark., 2011). Gezgen ve Seker (2016) İzmir’in Ödemiş ilçesinde mastitisli ineklerde *Staphylococcus* türlerinin prevalansını araştırdıkları çalışmalarında, 972 meme lobu süt örneğinden *S. aureus* izolasyon oranını %32,97 olarak rapor etmiştir.

Afyonkarahisar merkez ilçe ve köylerinde gerçekleştirilen bu çalışmada 170 baş sağmal ineğe ait toplam 602 meme lobu süt örneğinden *S. aureus* izolasyon oranı %3,8 (n=23 suş) olarak belirlendi. Konu ile ilgili yapılan diğer araştırmaların (Macun ve ark., 2011; Pehlivanoğlu ve Yardımcı, 2012; Yeşilmen ve ark., 2012; Gezgen ve Seker, 2016; Birhanu ve ark., 2017; Hoque ve ark., 2018) sonuçları ile karşılaştırıldığında, bu çalışmada izole edilen *S. aureus* izolasyon oranının düşük olduğu dikkat çekti. Ortaya çıkan bu farklılıkta, örneklenen hayvan sayısının farklı

olmasının yanı sıra, örnekleme yapıldığı coğrafik bölge ve mevsimsel farklılıkların da etkili olabileceği düşünüldü. Ayrıca, saha veteriner hekimlerinden çalışmanın yürütüldüğü Afyonkarahisar'da saha uygulamaları arasında uzun süredir *S. aureus*'a yönelik mastitis aşılara da yer verildiği bilgisi edinildi. Bu uygulamanın da, bu çalışmada elde edilen düşük izolasyon oranını açıklayabilir nitelikte olabileceği kanısına varıldı.

Süt yönlü yetiştiriciliğinin en önemli ve maliyetli hastalıklarından birisi olan mastitislerde antibiyotik kullanımı tedavi seçenekleri arasında ilk sırada yer almaktadır. Fakat günümüzde antibiyotiklerin fazla ve hatalı kullanımının yaygınlaşması, mastitis patojenlerinin kullanılan ilaca karşı direnç geliştirmesine neden olmaktadır. Bu direnç mekanizmalarından birisi son yıllarda önemle üzerinde durulan ve *mecA* geni tarafından kodlanan PBP2 sentezi ile ilişkilendirilen metisilin direncidir (Wielders ve ark., 2002; Saldago, 2010). Metisilin direncinin PZR ile tespitine yönelik gerek Türkiye’de, gerekse yurtdışında yapılan çalışmalarda, izolatlarda farklı *mecA* geni pozitiflik oranları bildirilmiştir (Moon ve ark., 2007; Tel ve ark., 2012; Erdem ve Türkyılmaz, 2013; Ünal, 2012; Chandrasekaran ve ark., 2014; Havaei ve ark., 2015; Luini ve ark., 2015). Kore’de yapılan bir çalışmada 3407 mastitisli süt örneğinden izole edilen 835 *S. aureus* suşundan 13’ünde *mecA* geni varlığı bildirilmiştir (Moon ve ark., 2007). Hindistan’da 2014 yılında yapılan bir çalışmada toplam 235 klinik mastitis süt örneğinden izole edilen 116 *S. aureus* suşunun 12’sinin MRSA suşu olduğu bildirilmiştir (Chandrasekaran ve ark., 2014). Havaei ve ark. (2015) İran’da yaptıkları bir çalışmada, 450 süt örneğinden 54 *S. aureus* izolasyonu yaptıklarını, bu suşların da 10’unu (%18,51) MRSA suşu olarak tiplendirdiklerini rapor etmişlerdir. İtalya’nın farklı bölgelerinden örneklenecek yapılan bir çalışmada ise 1025 hayvana ait mastitisli süt örneklerinden izole edilen 163 *S. aureus* suşunun 15’inin (%9,2) *mecA* genine sahip olduğu belirtilmiştir (Luini ve ark., 2015). Türkiye’de Erdem ve Türkyılmaz (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, 145 mastitisli süt örneğinden izole edilen *S. aureus* suşlarının sadece 2’sinde *mecA* pozitifliği belirlenmiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise subklinik mastitisli olarak belirlenen süt ineklerinden izole edilen 60 adet *S. aureus* suşunda *mecA* genine rastlanılan suş sayısı 2 olarak bildirilmiştir (Ünal, 2012). Tel ve ark.

(2012) Şanlıurfa'da sığır mastitis orijinli 64 *S. aureus* izolatının hiçbirinde *mecA* geni tespit edemediklerini belirtmişlerdir. Benzer şekilde Gezgen ve Seker (2016) de, Ödemiş'te mastitisli 972 meme lobu süt örneğinden izole ettikleri 60 *S. aureus* suşunun hiçbirinin *mecA* geni taşımadığını bildirmiştir.

Sunulan çalışmada, süt örneklerinden ticari identifikasyon kiti kullanılarak tiplendirilen 23 *S. aureus* suşunun tamamının *Staphylococcus* spesifik 16S rDNA geni taşıdığı, ancak suşlardan hiçbirinin *mecA* genine sahip olmadığı belirlendi. Genel olarak bu sonuç, Türkiye'de konu ile ilgili yapılmış araştırma sonuçlarına benzerlik göstermekle birlikte, suşlarda *mecA* genine rastlanmamasının çalışmada izole edilen *S. aureus* suşlarının azlığı ile ilişkili olabileceği düşünüldü. Bu çalışmada ayrıca, metisiline karşı fenotipik direnç varlığı oksasilin ve sefoksitin antibiyotik disklerinin kullanıldığı Kirby-Bauer disk difüzyon testi ile de araştırıldı. Suşların 5'inde (%21,7) oksasiline, 2'sinde (%8,7) ise sefoksitine karşı direnç tespit edildi. Ancak bu fenotipik olarak dirençli suşların hiç birisinde *mecA* genine rastlanmaması dikkat çekiciydi. Bu bulgu, fenotipik olarak dirençli olduğu belirlenen suşların, metisiline dirençli olup olmadığının kesin olarak belirlenmesinde suşlarda *mecA* geni varlığının araştırılmasının önemli bir kriter olarak değerlendirilmesi gerektiği görüşünü destekledi. Benzer şekilde Wang ve ark. (2015), sığır mastitislerinden izole ettikleri 219 *S. aureus* suşunun 34'ünü oksasilin ve sefoksitin diskleri kullanılarak yaptıkları disk difüzyon testinde MRSA olarak tespit ettiklerini, ancak suşlardan sadece 6'sının *mecA* geni taşıdığını ve fenotipik direncin tek başına değerlendirilmemesi gerektiğini vurgulamışlardır.

Vankomisin, penisiline dirençli Stafilokok infeksiyonlarının tedavisindeki başarısı sonrasında kullanımının arttığı bilinirken (Levine, 2006), araştırmacılar tarafından yıllar içerisinde *S. aureus* suşlarının vankomisine duyarlılığının azaldığına dikkat çekilmektedir (Hiramatsu ve ark., 1997; Sievert ve ark., 2008; Peng ve ark., 2018). İnsanlarda VRSA prevalansına ilişkin araştırmalar yaygın olmakla birlikte, hayvanlardan, özellikle mastitisli hayvanlardan, VRSA izolasyonuna yönelik çalışmalar sınırlı sayıdadır (Pehlivanoğlu ve Yardımcı, 2012; Umaru ve ark., 2014; Bhattacharyya ve ark., 2016). Bhattacharyya ve ark.'nın (2016) Hindistan'ın Batı

Bengal bölgesinde mastitisli koyun ve inek sütlerinden izole edilen 274 *S. aureus* izolatında vankomisin direncini broth ve agar difüzyon yöntemleri kullanarak araştırdıkları bir çalışmada, 7 suşun VRSA, diğer suşların ise VISA olarak belirlendiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada, fenotipik olarak dirençli tespit edilen VISA ve VRSA suşlarına yapılan PZR'da suşların *mecA* genini taşıdıkları, fakat *vanA* genine sahip olmadıkları belirtilmiştir. Aynı araştırmacılar, bakteri hücre duvarında peptidoglikanlar ve murein monomerlerinin daha fazla katman oluşturarak bakteri hücre duvarını kalınlaştırabileceğini ve bu nedenle suşlarda vankomisin direnci için *van* geninin bulunmasının şart olmadığını ileri sürmüştür (Bhattacharyya ve ark., 2016). Nijerya'da çiğ ve fermente sütler ile yapılan başka bir çalışmada ise 372 süt numunesinin 47'sinin *S. aureus* suşu olduğu ve bu suşların 20'sinin Kirby-Bauer disk difüzyon testi ile vankomisine karşı fenotipik direnç gösterdiği bildirilmiştir (Umaru ve ark., 2014). Türkiye'de ise Pehlivanoglu ve Yardımcı (2012) mastitisli ineklerden izole ettikleri 65 *S. aureus* suşunun hiçbirinde *vanA* genine rastlamadıklarını rapor etmişlerdir.

Sunulan bu çalışmada identifiye edilen 23 *S. aureus* suşunun 3'ü Kirby-Bauer disk difüzyon testi ile vankomisine karşı fenotipik olarak dirençli bulunurken, bu bulgu *vanA* genine spesifik yapılan PZR ile desteklenmedi. Bir başka deyişle, suşların hiçbirisi *vanA* genine sahip değildi. Elde edilen bu sonuç, diğer araştırmacılar (Pehlivanoglu ve Yardımcı, 2012; Bhattacharyya ve ark., 2016) tarafından bildirilen sonuçlarla uyumlu bulundu. CLSI'nın (2017) güncel dirençlilik kriterlerinde de önerildiği gibi, suşlarda belirlenebilecek fenotipik direncin, her zaman suşta vankomisin direncinin varlığı yönünden bir kanıt olamayabileceği, belirlenen fenotipik direncin *vanA* geni tespiti ile desteklenmesinin daha yararlı olabileceği düşünüldü.

Panton-Valentine Lökosidin (PVL) toksini, Stafilokok infeksiyonlarının patogenezinde etkili bir virulens faktörü olarak düşünülmektedir (Rainard ve ark., 2003; Lo ve Wang, 2011). Bu toksini kodladığı bilinen *pvl* geni, mastitisli ineklerden izole edilen *S. aureus* izolatlarında değişik oranlarda belirlenmiştir (Fueyo ve ark., 2005; Fessler ve ark., 2010; Ikawaty ve ark., 2010; Türkyılmaz ve ark., 2010; Erdem

ve Türkyılmaz, 2013). Fueyo ve ark. (2005) subklinik mastitisli inek sütlerinden izole edilen *S. aureus* suşlarının hiçbirinin *pvl* geni taşımadığını belirtmişlerdir. Hollanda'da yapılan bir çalışmada mastitisli sığır sütlerinden izole edilen 76 *S. aureus* suşunun hiçbirinde *pvl* genine rastlanılmamıştır (Ikawaty ve ark., 2010). Benzer şekilde, Almanya'da yapılan bir başka çalışmada klinik mastitisli ineklerden izole edilen 25 MRSA suşunda *pvl* geni tespit edilememiştir (Fessler ve ark., 2010). Türkiye'de de konu ile ilgili araştırmalarda benzer sonuçlar elde edilmiştir. Aydın ilinde yapılan bir çalışmada MRSA olarak belirlenen 16 izolatin hiçbirinde *pvl* genine rastlanmamıştır (Türkyılmaz ve ark., 2010). Bir başka çalışmada, 145 mastitisli süt örneğinden izole edilen 2 MRSA suşunun *pvl* toksin genine sahip olmadıkları bildirilmiştir (Erdem ve Türkyılmaz, 2013). Benzer şekilde, Gezgen ve Seker (2016), mastitisli ineklerden izole ettikleri 60 *S. aureus* suşunun hiçbirinin *pvl* geni taşımadığını rapor etmişlerdir.

Sunulan çalışmada, konu ile ilgili diğer araştırma bulgularına benzer şekilde, mastitisli süt örneklerinden izole edilen 23 *S. aureus* suşunun hiç birinde *pvl* geni belirlenemedi. Bu sonuçta çalışmada izole edilen suş sayısının azlığının etkili olabileceği düşünüldü. Ayrıca, PVL'nin bu çalışmada örnekleme yapılan bölge ve örneklenen hayvanlar açısından mastitislerin patogenezinde etkin bir rol oynamayabileceği kanısına varıldı.

Bakteriyel mastitisler, veteriner sahada antibiyotiklerin en yaygın kullanıldığı hastalık grupları içerisinde ilk sırada gelmektedir. Bu nedenle de, mastitisli hayvanların sütlerinden ilk sıralarda izole edilen *S. aureus*'ların antibiyotik direnç profillerinin araştırıldığı çalışmalar oldukça yaygındır. Bu araştırmalarda, suşların farklı antibiyotiklere farklı direnç oranları göstermelerinin yanı sıra, son yıllarda suşlarda çoklu antibiyotik dirençlerinin yaygın olduğu da dikkati çekmektedir (Kuyucuoğlu ve ark., 2003; Macun ve ark., 2011; Tel ve Keskin, 2012; Szweda ve ark., 2014; Wang ve ark., 2015; Dorneles ve ark., 2018). Szweda ve ark.'nın (2014) mastitisli ineklerden izole ettikleri 123 *S. aureus* suşunun antibiyotiklere dirençliliklerini araştırdıkları bir çalışmada, suşlarda en yüksek direnç oranlarının amoksisilin (n=22, %17,9), ampisilin (n=28, %22,8), penisilin (n=29, %23,6) ve

streptomisine (n=13; %10,6) karşı olduğu bildirilmiştir. Çin'de mastitisli ineklerden izole edilen 219 *S. aureus* suşunda penisilin (%90,4), trimetoprim+sulfametaksazol (%91,8), eritromisin (%79,9), klindamisin (%77,2), oksitetrasiklin (%74,4), doksisilin (%70,3), gentamisin (%54,8), kloramfenikol (%52,1) ve siprofloksasine (%45,2) karşı yüksek direnç oranları tespit edildiği vurgulanmıştır (Wang ve ark., 2015). Türkiye'de Kırıkkale'de Macun ve ark. (2011) tarafından subklinik mastitisli ineklerde yapılan bir çalışmada, 60 *S. aureus* suşunun kloksasiline %91,66 (n=55), penisiline %48,33 (n=29), amoksisiline %36,66 (n=22) ve sefoksitine %15 (n=9) oranlarında fenotipik direnç gösterdikleri bildirilmiştir. Tel ve ark.'nın (2012) subklinik mastitisli ineklerden izole ettikleri 64 *S. aureus* suşunun 13'ünün (%20) gentamisin, 6'sının (%9,3) eritromisin, 5'inin (%7,8) klindamisin, 4'ünün (%6,2) tetrasiklin, 1'inin (%1,5) amoksisilin-klavulanik aside ve tamamının ise penisilin ve ampisiline dirençli bulunduğu belirtilmiştir.

Sunulan bu çalışmada, 23 *S. aureus* suşunun Türkiye'de veteriner sahada yaygın olarak kullanıldığı bilinen antibiyotiklere karşı dirençlilikleri Kirby-Bauer disk difüzyon testi kullanılarak araştırıldı. Test edilen suşlarda, en yüksek direnç oranının %52,2 (n=12) ile penisilin G'ye karşı olduğu, bu oranı %21,7 (n=5) ile eritromisin ve oksasilin, %17,4 (n=4) ile amoksisilin+klavulanik asidin izlediği belirlendi (Tablo 3.2). Diğer araştırmacıların verileri ile karşılaştırıldığında elde edilen direnç oranlarındaki farklılıkların, test edilen suş sayısı, suşların orijinindeki farklılıklar ve mastitis tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin tercihinde bölgesel farklılıklar ile ilişkili olabileceği düşünüldü.

Sonuç olarak, örneklemin yapıldığı Afyonkarahisar ilçelerinde sığır mastitislerinin etiolojisinde *S. aureus*'un sanıldığı kadar dominant bir patojen olmadığı dikkat çekti. Bu sonucun ortaya çıkmasında ise, son yıllarda ruminant aşılama araştırmaları arasında *S. aureus*'a yönelik mastitis aşılarının da dahil edimesinin etkili olabileceği düşünüldü. Günümüzde metisilin ve vankomisin direncinin fenotipik olarak belirlenmesinde Kirby-Bauer disk difüzyon yönteminin yeterli olmadığı kabul edilmektedir (CLSI, 2013, 2016, 2017). Vankomisin ve oksasilin için son CLSI standartlarında geçerli bir zon çapı verilmemesine rağmen, sunulan çalışmada hiç

zon oluşturmayan suşlar değerlendirmeye alındı. Fenotipik olarak direnç gösteren suşların hiçbirinde genotipik direncin görülmemesi, vankomisin ve metisilin için sadece fenotipik direnç analizleri ile kesin bir sonuca varılamayabileceğini düşündürdü.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Afyonkarahisar'da *S. aureus* etiyolojili mastitis vakalarında metisilin ve vankomisin direnç genleri ile *S. aureus* infeksiyonlarının patogeneğinde önemli virulens faktörlerinden birisi olan PVL toksin geni varlığının araştırılması amacıyla yapılan bu çalışmada, 170 baş sağmal inekten alınan 602 adet meme lobu süt örneğinden 23 adet (%3,8) *S. aureus* suşu identifiye edildi. Çalışmada izole edilen *S. aureus* izolasyon oranının düşük olduğu dikkat çekti. Saha veteriner hekimlerinden alınan bilgiler ışığında, çalışmanın yürütüldüğü Afyonkarahisar'da uzun süredir *S. aureus*'a yönelik mastitis aşılara da yer verilmesinin bu sonucu etkilemiş olabileceği düşünüldü.

Sunulan çalışmada sadece CMT pozitif meme loblarından değil CMT negatif meme loblarından da *S. aureus* izolasyonu gerçekleştirildi. Bu bağlamda hayvanlarda özellikle subklinik mastitis vakalarının teşhisinde CMT uygulamalarının yanı sıra, mutlaka mikrobiyolojik identifikasyonun da yapılmasının daha doğru sonuçlar verebileceği ve böylece tedavi uygulamalarının da daha etkili olabileceği kanısına varıldı.

İdentifiye edilen 23 *S. aureus* suşunun hiçbirinin *mecA*, *vanA* ve *pvl* genlerine sahip olmadıkları tespit edildi. Araştırılan genlerin yokluğunun elde edilen suş sayısının azlığına bağlı olabileceği düşünüldü. Çalışmada, metisilin direncinin fenotipik olarak Kirby-Bauer disk difüzyon testi ile belirlenmesi durumunda kullanılması önerilen sefoksitine dirençli olduğu belirlenen 2 suşta *mecA* varlığının tespit edilememesi, sefoksitin diskinin tek başına kullanılmasının güvenilir sonuçlar vermeyebileceğini düşündürdü. Bu çalışmada ayrıca, *S. aureus* olarak tiplendirilen suşlarda veteriner sahada kullanımı yaygın olan penisilin G (%52,2), eritromisin (%21,7) ve amoksisilin+klavulanik aside (%17,4) karşı yüksek oranda fenotipik direnç tespit edildi.

Spesifik olmayan antibiyotiklerin kullanımı ve bakterilerde direnç artışı arasında pozitif bir ilişki olduğu göz önüne alındığında, infeksiyon durumlarında

doğru vakaya doğru dozda doğru sürede etkili antibiyotiğin kullanılması çok önem taşımaktadır. Bu doğrultuda tür bazında yapılacak etken izolasyonu ve identifikasyonu ile yapılan antibiyogram sonuçlarına göre bakterinin duyarlı olduğu antibiyotiklerin kullanılmasının, tedavi süreci ve tedavi masrafları açısından önemli ve anlamlı olabileceği açıktır. Türkiye'de özellikle mastitisli hayvanlardan izole edilen *S. aureus* suşlarında vankomisine genotipik direncin belirlenmesine yönelik çok az sayıda araştırma olması nedeniyle, sunulan bu çalışmanın hem yapıldığı bölge hem de Türkiye'de konu ile ilgili yapılacak olan araştırmalar için önemli bir veri kaynağı olacağı da düşünölmektedir.

ÖZET

Sığır Mastitislerinden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarında Metisilin, Vankomisin Direnci ve Panton-Valentine Lökosidin Varlığının Araştırılması

Bu çalışmada, mastitisli ineklerden *Staphylococcus aureus* izolasyonu, izole edilen suşlarda *mecA*, *vanA* ve *pvl* genlerinin PZR ile araştırılması ve suşların veteriner sahada yaygın olarak kullanılan çeşitli antibiyotiklere karşı dirençliliğin belirlenmesi amaçlandı. Sunulan çalışmada, Afyonkarahisar ili merkez ve köylerindeki 40 farklı küçük (aile tipi) ölçekli işletmede 170 baş sağmal ineğe ait 602 meme lobu süt örneği kullanıldı. Her bir meme lobuna CMT uygulandı. CMT skorlaması sonrasında her bir meme lobundan aseptik koşullarda süt örnekleri toplandı. Çalışmada 602 meme lobu süt örneğinden toplam 23 (%3,8) *S. aureus* suşu ticari identifikasyon kiti kullanılarak identifiye edildi. Suşların hiçbirisinde *mecA*, *vanA* ve *pvl* genlerinin varlığına rastlanmadı. Tüm *S. aureus* suşlarının, veteriner sahada yaygın olarak kullanılan çeşitli antibiyotiklere fenotipik dirençlilikleri Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak araştırıldı. Suşlarda en yüksek direnç oranının penisilin G'ye (%52,2) karşı olduğu, bu oranı oksasilin (%21,7) eritromisin (%21,7) ve amoksisilin+klavulanik aside (%17,4) karşı direnç oranlarının izlediği belirlendi.

Anahtar Sözcükler: antibiyotik direnci, inek, mastitis, metisilin direnci, Panton-Valentine lökosidin, *S. aureus*, vankomisin direnci

SUMMARY

Investigation of methicillin, vancomycin resistance and Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis

This study aimed to isolate the *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis, investigate the *mecA*, *vanA* and *pvl* genes in isolated species by PCR and determine the antibiotic resistance of *S. aureus* strains to some antibiotics commonly used in veterinary field. In the present study, 602 mammary quarter milk samples belong to 170 lactating cows from 40 different small (family type) enterprises located center town and villages of Afyonkarahisar were used. CMT was applied to each mammary quarter. After the CMT scoring, the milk samples were aseptically collected from each mammary quarter. In this study, a total of 23 (%3,8) *S. aureus* strains were isolated from 602 mammary quarter milk samples by using a commercial identification kit. The presence of *mecA*, *vanA* and *pvl* genes was found in none of the strains. Phenotypic antibiotic resistances of all *S. aureus* strains to various antibiotics commonly used in veterinary field were investigated by using Kirby-Bauer disk diffusion method. The highest resistance rate in strains was against penicillin G (52.2%), followed by oxacillin (21.7%), erythromycin (21.7%) and amoxicillin+clavulanic acid (17.4%).

Key words: antibiotic resistance, cow, mastitis, methicillin resistance, Panton-Valentine leukocidin, *S. aureus*, vancomycin resistance

KAYNAKLAR

- ACAR, D.B., CENGİZ, M., BAŞTAN, A. (2012). Dövelerde mastitis: prevalansı, risk faktörleri ve patogenezini. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, **7(2)**: 137-146.
- AKAN, M. (2006). *Staphylococcus* İnfeksiyonları, In: Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). Ed.: AYDIN, N., PARACIKOĞLU J. İlke-Emek Yayınları, Ankara, sy. 6-12.
- ALEN, S., KONEMAN, E., JANDA, W., SCHRECKENBERGER, P., WINN, W., WOODS, G., PROCOP, G. (2006). The Gram positive cocci, Part 1, Staphylococci and related organism. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5. Baskı, Philadelphia, sy. 539-576.
- ALKAN, H., BAŞTAN, A., SALAR, S., ÖZDAL, M., KAYMAZ, M. (2014). Kuru döneme çıkarken enfekte ve sağlıklı meme loblarında California Mastitis Test ve somatik hücre sayısı ile bakteriyolojik muayene sonuçlarının karşılaştırılması. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **61**: 179-183.
- APPELBAUM, P.C. (2007). Microbiology of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases*, **45**: 165-170.
- ARDA, M. (2011). Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayınları, Ankara, sy. 235-254
- ARIZA, J., PUJOL, M., CABO, J., PENA, C., FERNANDEZ, N., LINARES, J., AYATS, J., GUDIOL, F. (1999). Vancomycin in surgical infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin. *Lancet*, **353**: 1587-1588.
- ARSLAN, E., UÇAN, U.S. (2005). Mastitisli ineklerden izole edilen *S. aureus* ve *S. intermedius* suşlarının slime üretiminin araştırılması. *Veteriner Bilimleri Dergisi*, **21(1-2)**: 61-63.
- BALABAN, N., RASOOLY, A. (2000). Review: Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, **61(1)**: 1-10.
- BARRIO, M.B., RAINARD, P., PRÉVOST, G. (2006). LukM/LukF'-PV is the most active *Staphylococcus aureus* leukotoxin on bovine neutrophils. *Microbes and Infection*, **8**: 2068-2074.
- BASELGA, R., ALBIZU, I., DE LA CRUZ, M., DEL CACHO, E., BARBERAN, M., AMORENA, B. (1993). Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus* implications in colonization and virulence. *Infection and Immunity*, **61**: 4857-4862.
- BAŞTAN, A. (2007). İneklerde Meme Hastalıkları, 2. Baskı. Hatipoğlu Yayınevi, Ankara.
- BENEDICTUS, L., RAVESLOOT, L., POPPE, K., DAEMEN, I., BOERHOUT, E., STRIJP, J.V., BROERE, F., RUTTEN, V., KOETS, A., EISENBERG, S. (2019). Immunization of young heifers with staphylococcal immune evasion proteins before natural exposure to *Staphylococcus aureus* induces a humoral immune response in serum and milk. *BMC Veterinary Research*, **15(1)**: 15.
- BHATTACHAYYA, D., BANERJEE, J., BANDYOPADHYAY, S., MONDAL, B., NANDA, P.K., SAMANTA, I., MAHANTI, A., DAS, A.K., DAS, G., DANDAPAT, P., BANDYOPADHYAY, S. (2016). First report vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* in bovine and caprine milk. *Microbial Drug Resistance*, **22(8)**: 675-681.

- BHUTTO, A.L., MURRAY, R.D., WOLDEHIWET, Z. (2012). California mastitis test scores as indicators of subclinical intra-mammary infections at the end of lactation in dairy cows. *Research in Veterinary Science*, **92**: 13–17.
- BIGNARDI, G.E., WOODFORD, N., CHAPMAN, A., JOHNSON, A.P., SPELLER, D.C. (1996). Detection of the *mec-A* gene and phenotypic detection of resistance in *Staphylococcus aureus* isolates with borderline or low-level methicillin resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **37**: 53-63.
- BIRHANU, M., LETA, S., MAMO, G., TESFAYE, S. (2017). Prevalence of bovine subclinical mastitis and isolation of its major causes in Bishoftu Town, Ethiopia. *BMC Research Notes*, **10(1)**: 767.
- BOYNUKARA, B., GULHAN, T., ALISARLI, M., GURTURK, K., SOLMAZ, H. (2008). Classical enterotoxigenic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Van, Turkey. *International Journal of Food Microbiology*, **125**: 209-211.
- BRADLEY, A.J. (2002). Bovine mastitis: An evolving disease. *Veterinary Journal*, **164**: 116–128.
- CHAMBERS, H.F., (1997). Methicillin resistance in Staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clinical Microbiology Reviews*, **10**: 781-791.
- CHANDRASEKARAN, D., VENKATESAN, P., TIRUMURUGAAN, K.G., NAMBI A.P., THIRUNAVUKKARASU, P.S., KUMANAN, K., VAIRAMUTHU, S. (2014). A study on Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows. *Journal of Applied and Natural Science*, **6(2)**: 356-361.
- CHANG, S., SIEVERT, D.M., HAGEMAN, J.C., BOULTON, M.L., TENOVER, F.C., DOWNES, F.P., SHAH, S., RUDRIK, J.T., PUPP, G.R., BROWN, W.J., CARDO, D., FRIDKIN, S.K. (2003). Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *New England Journal of Medicine*, **348**: 1342-1347.
- CHOI, S.M., KIM, S.H., KIM, H.J., LEE, D.G., CHOI, J.H., YOO, J.H., KANG, J.H., SHIN, W.S., KANG, M.W. (2003). Multiplex PCR for detection of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes and methicillin resistance among *Staphylococcus* species. *Journal of Korean Medical Science*, **18**: 631-636.
- CIFRIAN, E., GUIDRY, A.J., BRAMLEY, A.J., NORCROSS, N.L., BASTIDA CORCUERA, F.D., MARQUARDT, W.W. (1996). Effect of staphylococcal β toxin on the cytotoxicity, proliferation and adherence of *Staphylococcus aureus* to bovine mammary epithelial cells. *Veterinary Microbiology*, **48**: 187-198.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2007). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 17th informational supplement*. CLSI Document M100-S17. Wayne, PA.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2012). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement*. CLSI Document M100-S22. Wayne, PA.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2013). *Performance standard for antimicrobial susceptibility testing; twenty-third informational supplement*. CLSI Document M100-S23. Wayne, PA.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2016). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty*. CLSI Document M100-S26. Wayne, PA.

- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2017). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty*. CLSI Document M100-S27. Wayne, PA.
- COELHO, S.M.O., REINOSO, E., PEREIRA, I.A., SOARES, L.C., DEMO, M., BOGNI, C., SOUZA, M.M.S. (2009). Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **29(5)**: 369-374.
- COURVALIN, P. (2006). Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clinical Infectious Diseases*, **42**: 25-34.
- ÇOKAL, Y., KONUS, R. (2012). Subklinik mastitisli ineklerin sütlerinden aerobik bakterilerin izolasyonu. *Balikesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, **1(2)**: 65-69.
- DEGO, O.K., DIJK, J.E., NEDERBRAGT, H. (2002). Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion: A review. *Veterinary Quarterly*, **24(4)**: 181-198.
- DEVRIESE, L.A., VANDAMME, L.R., FAMEREE, L. (1972). Methicillin (cloxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*, **19**: 598-605.
- DINGES, M.M., ORVIN, P.M., SCLIEVERT, P.M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*, **13**: 16-34.
- DOĞAN, B., PALAZ, M., İZGÜR, M. (2018). Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* ve önemi. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, **29(2)**: 157-161.
- DORNELES, E.M.S., FONSECA, M.D.A.M., ABREU, J.A.P., LAGE, A.P., BRITO, M.A.V.P., PEREIRA, C.R., BRANDÃO, H.M., GUIMARÃES, A.S., HEINEMANN, M.B. (2018). Genetic diversity and antimicrobial in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* isolates from bovine mastitis in Minas Gerais, Brazil. *Microbiology Open*, doi:10.1002/mbo3.736.
- DUTKA-MALEN, S., EVERS, S., COURVALIN, P. (1995). Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant Enterococci by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, **33**: 24-27 (Erratum 33:1434).
- ENRIGHT, M.C., ROBINSON, D.A., RANDLE, G., FEIL, E.J., GRUNDMANN, H., SPRATT, B.G. (2002). The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, **(99)**: 7687-7692.
- ERDEM, Z., TÜRKYILMAZ, S. (2013). Molecular typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows and farm workers. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **19 (6)**: 963-968.
- FESSLER, A., SCOTT, C., KADLEC, K., EHRLICH, R., MONECKE, S., SCHWARZ, S. (2010). Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **65**: 619-625.
- FITZGERALD, J.R., HARTIGAN, P.J., MEANEY, W.J., SMYTH, C.J. (2000). Molecular population and virulence factor analysis of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infection. *Journal of Applied Microbiology*, **88**: 1028-1037.
- FUDA, C.C.S., FISHER, J.F., MOBASHERY, S. (2005). β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: The adaptive resistance of a plastic genome. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **62**: 2617-2633.

- FUEYO, J.M., MENDOZA, M.C., RODICIO, M.R., MUÑIZ, J., ALVAREZ, M.A., MARTÍN, M.C. (2005). Cytotoxin and pyrogenic toxin superantigen gene profiles of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical mastitis in dairy cows and relationships with macrorestriction genomic profiles. *Journal of Clinical Microbiology*, **43(3)**: 1278-1284.
- GALFI, A.L., RADINOVIĆ, M.Ž, DAVIDOV, I.N., ERDELJAN, M., KOVAČEVIĆ, Z.R. (2017). Detection of subclinical mastitis in dairy cows using California and Draminski. *Biotechnology in Animal Husbandry*, **33(4)**: 465-473.
- GARIPCIN, M., SEKER, E. (2015). Nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in cattle and farm workers in Turkey. *Veterinarski Arhiv*, **85**: 117-129.
- GARTEDE, S., TOMASZ, A. (2014). Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Clinical Investigation*, **124(7)**: 2836-2840.
- GEISELA, R., SCHMITZA, F.J., THOMASA, B.L., BERNSA, G., ZETSCHEC, O., ULRICH, B., FLUITB, A.C., LABISCHINSKYD, H., WITTEE, W. (1999). Emergence of heterogeneous intermediate vancomycin in *Staphylococcus aureus* isolates in the Düsseldorf area. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **43**: 846-848.
- GEZGEN, C., SEKER, E. (2016). Investigation of methicillin resistance and panton-valentine leukocidin in staphylococci isolated from bovine mastitis. *Acta Scientiae Veterinariae*, **44**: 1373, 1-9.
- GLENNY, A.T., STEVENS, N.F. (1935). Staphylococcal toxins and antitoxins. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, **40**: 201-210.
- GOPAL, S., DIVYA, K.C. (2017). Can methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prevalence from dairy cows in India act as potential risk for community-associated infections?: A review. *Veterinary World*, **10(3)**: 311-318.
- GORDON, R.J., LOWY, F.D. (2008). Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clinical Infectious Disease*, **46**: 350-359.
- HAGEMAN, J.C., PATEL, J.B., CAREY, R.C., TENOVER, F.C., MCDONALD, L.C., (2006). Investigation and control of vancomycin-intermediate and resistant *Staphylococcus aureus*: A Guide for Health Departments and Infection Control Personnel. Atlanta, Georgia, USA. Erişim : [http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/ar/visa_vrsa_guide.pdf].
- HALASA, T., HUIJPS, K., ØSTRERÅS, O., HOGEVEEN, H. (2007). Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Veterinary Quarterly*, **29**: 18-31.
- HANAKI, H., KUWARA-ARAI, K., BOYLE-VAVRA, S., DAUM, R.S., LABISCHINSKI, H., HIRAMATSU, K. (1998). Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **42(2)**: 199-209.
- HAVAEI, S.A., ASSADBEIGL, B., ESFAHANI, B.N., HOSEINI, N.S., REZAEI, N., HAVAEI, S.R. (2015). Detection of *mecA* and enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis and characterization of Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) in MRSA strains. *Iranian Journal of Microbiology*, **7(3)**: 161-167.
- HENZE, U SIDOW, T., WECKE, J, LABISCHINSKI, H., BERGER-BACHI, B. (1993). Influence of *femB* on methicillin resistance and peptidoglycan metabolism in *S.aureus*. *Journal of Bacteriology*, **(175)**: 1612-1620.
- HIRAMATSU, K. (2001). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, **1(3)**: 147-155.

- HIRAMATSU, K., KATAYAMA, Y., YUZAWA, H., ITO, T. (2002). Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, **(292)**: 67-74.
- HIRAMATSU, K., ARITAKA, N., HANAKI, H., KAWASAKI, S., HOSODA, Y., HORI, S., FUKUCHI, Y., KOBAYASHI, I. (1997). Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *The Lancet*, **350**: 1670-1673.
- HIRAMATSU, K., KATAYAMA, Y., MATSUO, M., SASAKI, Y., MORIMOTO, Y., SEKIGUCHI, A., BABA, T. (2014). Multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy. *Journal of Infection and Chemotherapy*, **20**: 593-601.
- HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T., WILLIAMS, S.T. (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- HOSSEINZADEH, S., SAEI, H.D. (2014). Staphylococcal species associated with bovine mastitis in North West of Iran: emerging of coagulase-negative staphylococci. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, **2**: 27-34.
- HOQUE, M.N., DAS, ZC., RAHMAN, A.N.M.A., HAIDER, M.G., ISLAM, M.A. (2018). Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains in bovine mastitis milk in Bangladesh. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, **6**: 53-60.
- HOWE, R.A., BOWKER, K.E., WALSH, T.R., FEEST, T.G., MACGOWAN, A.P. (1998). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, **351**: 602.
- IKAWATY, R., BROUWER, E.C., WAN DUIRSKEREN, E., MEVIUS, D., VERHOEF, J. (2010). Virulence factors of genotyped bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates in the Netherlands. *International Journal of Dairy Science*, **5(2)**: 60-70.
- ILGAZ, A., AK, S., ÖZGÜR, Y., İKİZ, S. (2012). Veteriner Hekimlik Mikrobiyolojisi, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, sy. 35-42.
- JACOBY, G.A., ARCHER, G.L. (1991). New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents, *New England Journal of Medicine*. **324**: 601-612.
- JEVONS, M.P. (1961). Celbenin-resistant Staphylococci. *British Medical Journal*, **124**: 124-126.
- JONGE, B.L.M., TOMASZ, A. (1993). Abnormal peptidoglycan produced in a methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus* grown in the presence of methicillin: functional role for penicillin binding protein 2A in cell Wall synthesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **37(2)**: 342-346.
- KALIWAL, B.B., SADASHIV, S.O., KURJOGI, M.M., SANAKAL, R.D. (2011). Prevalance and antimicrobial susceptibility of coagulase-negative Staphylococci isolated from bovine mastitis. *Veterinary World*, **4(4)**: 158-161.
- KARAHAN, M., ACIK, M.N., CETINKAYA, B. (2009). Investigation of toxin genes by polymerase chain reaction in *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Turkey. *Foodborne Pathogens Disease*. **6**: 1029-1035.
- KENAR, B., BAGCIGIL, A.F., KUYUCUOGLU, Y., KAHRAMAN, B.B., KONAK, S. (2017). Antimicrobial susceptibility profiles and coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **23(4)**: 535-540.

- KIRBY, W.M.M. (1944). Extraction of a highly potent penicilin inactivator from penicilin resistant Staphylococci. *Science*, **99**: 452-453.
- KLOOS, W.E., BANNERMAN, T.L. (1994). Update on clinical significance of coagulase-negative Staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*, **7**: 117-140.
- KUYUCUOĞLU, Y., HADİMLİ, H.H., KENAR, B., ŞEKER, E. (2003). Mastitisli ineklerden izole edilen Stafilokok suşlarının beta laktamaz aktiviteleri ve bazı antibiyotiklere duyarlılıkları. *Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Derneği*, **3(1-2)**: 15-19.
- LEVINE, D.P. Vancomycin: a history. (2006). *Clinical Infectious Diseases*, **42 (Suppl-1)**: 5-12.
- LINA, G., PIEMONT, Y., GODAIL-GAMOT, F., BES, M., PETER, M., GAUDUCHON, V., VANDENESCH, F., ETIENNE, J. (1999). Involvement of Pantone-Valentine Leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **29**: 1128-1132.
- LO, W., WANG, C. (2011). Pantone-Valentine leukocidin in the pathogenesis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Pediatrics and Neonatology*, **52**: 59-65.
- LOWY, F.D. (2003). Antimicrobial resistance: The example of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*, **111**: 1265-1273.
- LUINI, M., CREMONESI, P., MAGRO, G., BIANCHINI, V., MINOZZI, G., CASTIGLIONI, B., PICCININI, R. (2015). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is associated with low within-herd prevalence of intra-mammary infections in dairy cows: genotyping of isolates *Veterinary Microbiology*, **178**: 270-274.
- MACUN, H.C., YAĞCI, İ.P., ÜNAL, N., KALENDER, H., SAKARYA, F., YILDIRIM, M. (2011). Kırıkkale’de belirlenen subklinik mastitisli ineklerde etken izolasyonu ve antibiyotik direnç durumu. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **8(2)**: 83-89.
- MCCORMICK, M.H., MCGUIRE, J.M., PITTENGER, G.E., PITTENGER, R.C., STARK, W.N. (1955-1956). Vancomycin a new antibiotic I. Chemical and biologic properties. *Antibiotics Annual*, **3**: 606-611.
- MCGUINNESS, W.A., MALACHOWA, N., DELEO, F.R. (2017). Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Yale Journal of Biology and Medicine*, **90(2)**: 269-281.
- MONCKE, S., SLICKERS, P., ELLINGTON, M.J., KEARNS, A.M., EHRICHT, R. (2007). High diversity of Pantone-Valentine leukocidin-positive, methicillin-susceptible isolates of *Staphylococcus aureus* and implications for the evolution of community-associated methicillin-resistant *S. aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*, **13(12)**: 1157-1164.
- MONTANARI, M.P., TONIN, E., BIAVASCO, F., VARALDO, P.E. (1990). Further characterization of borderline methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and analysis of penicillin-binding proteins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **34**: 911-913.
- MOON, J.S., LEE, A.R., KANG, H.M., LEE, E.S., KIM, M.N., PAIK, Y.H., PARK, Y.H., JOO, Y.S., KOO, H.C. (2007). Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant Staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea. *Journal of Dairy Science*, **90**: 1176-1185.
- MOREILLON, P., QUE, Y., GLAUSER, M.P. (2005). *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock) In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. (Eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th Ed. Philadelphia: Churchill, Livingstone, pp. 2321-2351.

- MORGAN, M. (2008). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and animals: Zoonosis or humanosis? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **62(6)**: 1181-1187.
- MÜŞTAK, H.K., ESENDAL, Ö.M. (2008). *Staphylococcus aureus* ekzotoksinleri. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, **19**: 69-74.
- OKOLIE, C.E., ESSIEN, U.C., IDOKO, J. (2015). Genetic and phenotypic identification of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from retail poultry carcasses in Omu-Aran, North-Central Nigeria. *British Biotechnology Journal*, **6(2)**: 87-92.
- OLIVEIRA, G.A., DELL'AQUILA, A.M., MASIERO, R.L., LEVY, C.E., GOMES, M.S., CUI, L., HIRAMATSU, K., MAMIZUKA, E.M. (2001). Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, **22**: 443-448.
- OTALU, O.JR., JUNALDU, K., CHUKWUDI, O.E., JARLATH, U.V. (2011). Multi-drug resistant coagulase positive *Staphylococcus aureus* from live and slaughtered chickens in Zaria, Nigeria. *International Journal of Poultry Science*, **10(11)**: 871-875.
- PEACOCK, S. (2006). *Staphylococcus aureus*. In: *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*. Ed.: GILLESPIE, S.H., HAWKEY, P.M., JOHN WILEY & SONS Ltd., England, pp. 73-98.
- PEHLİVANOĞLU, F., YARDIMCI, H. (2012). Detection of methicillin and vancomycin resistance in *Staphylococcus* strains isolated from bovine milk samples with mastitis. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **18(5)**: 849-855.
- PENG, H., RAO, Y., YUAN, W., ZHENG, Y., SHANG, W., HU, Z., YANG, Y., TAN, L., XIONG, K., LI, S., ZHU, J., HU, X., HU, Q., RAO, X. (2018). Reconstruction of the vancomycin-susceptible *Staphylococcus aureus* phenotype from a vancomycin-intermediate *S. aureus* XN108. *Frontiers in Microbiology*, doi: **10.3389/fmicb.2018.02955**.
- PLOY, M.C., GRELAUD, C., MARTIN, C., DE LUMLEY, L., DENIS, F. (1998). First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital. *Lancet*, **351**: 1212.
- PYÖRÄLÄ, S., TAPONEN, S. (2009). Coagulase-negative Staphylococci-emerging mastitis pathogens. *Veterinary Microbiology*, **134**: 3-8.
- QUINN, P.J., CARTER, M.E., MARKEY, B.K., CARTER, G.R. (1999). *Clinical Veterinary Microbiology*. Harcourt Publishers Limited, London, pp. 118-126.
- QUINN, P.J., MARKEY, B.K., CARTER, M.E., DONNELLY, W.J.C., LEONARD, F.C. (2004). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Blackwell Publishing Professional, Iowa, pp. 43-48.
- RAINARD, P., CORRALES, J.C., BARRIO, M.B., COCHARD, T., POUTREL, B. (2003). Leucotoxic activities of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows, ewes and goats with mastitis: Importance of LukM/LukF-PV leucotoxin. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **10(2)**: 272-277.
- RYFFEL, C., KAYSER, F.H., BERGER-BACHI, B. (1992). Correlation between regulation of *mecA* transcription and expression of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **36**: 25-31.
- SAADAT, S., SOLHJOO, K., NOROOZ-NEJAD, M.J., KAZEMI, A. (2014). *VanA* and *VanB* positive vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* among clinical isolates in Shiraz, South of Iran. *Oman Medical Journal*, **29(5)**: 335-339.

- SALDAGO, C.D. (2010). Antimicrobial resistance among epidemiologically important Gram positive bacteria. In: *Management of Antimicrobials in Infections Diseases Impact of Antibiotic Resistance*, Ed.: MAINOUS III, A.G, POMEROY, C. Humana Pres, New York, USA, pp. 33-40.
- SARGEANT, J.M., LESLIE, K.E., SHIRLEY, J.E., PULKRABEK, B.J., LIM, G.H. (2001). Sensitivity and specificity of somatic cell count and California mastitis test for identifying intramammary infection in early lactation. *Journal of Dairy Science*, **84**: 2018-2024.
- SAWANT, A.A., SORDILLO, L.M., JAYARAO, B.M. (2005). A survey on antibiotic usage in dairy herds in Pennsylvania. *Journal of Dairy Science*, **88**: 2991-2999.
- SCHALM, O.W., CARROLL, E.J., JAIN, N.C. (1971). Bovine mastitis. Lea&Febiger, Philadelphia. Pp: 136-157.
- SCHWALBE, R.S., STAPLETON, J.T., GILLIGAN, P.H. (1987). Emergence of vancomycin resistance in Coagulase-Negative Staphylococci. *New Engand Journal of Medicine*, **316**: 927-931.
- SIEVERT, D.M., RUDRIK, J.T., PATEL, J.B., MCDONALD, L.C., WILKINS, M.J., HAGEMAN, J.C. (2008). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002-2006. *Clinical Infectious Diseases*, **46**: 668-674.
- STAPLETON, P.D., TAYLOR, P.W. (2002). Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. *Science Progress*, **85**: 57-72.
- STROMMENGER, B., KETTLITZ, C., WERNER, G., WITTE, W. (2003). Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *S. aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, **41**: 4089-4094.
- SUTRA, L., POUTREL, B. (1994). Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, **40**: 79-89.
- SUTRA, L., RAINARD, P., POUTREL, B. (1990). Phagocytosis of mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* and expression of type 5 capsular polysaccharide are influenced by growth in the presence of milk. *Journal of Clinical Microbiology*, **28**: 2253-2258.
- SZWEDA, P., SCHIELMANN, Marta., FRANKOWSKA, A., KOT, B., ZALEWSKA, M. (2014). Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in eastern poland and analysis of susceptibility of resistant strains to alternative nonantibiotic agents: lysostaphin, nisin and polymyxin B. *The Journal of Veterinary Medicine Science*, **76(3)**: 355-362.
- ŞEKER, E., ÖZENÇ, E. (2010). Mastitisli inek sütlerinden izole edilen koagulaz negatif Stafilokokların antibiyotik dirençlilikleri. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **21**: 107-111.
- TEL, O.Y., KESKİN, O. (2011). Sublinik mastitisli ineklerden izole edilen stafilokok suşlarının bazı virulens faktörleri ve antibiyotik direnci. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **22(1)**: 17-21.
- TEL, O.Y., BAYRAKTAR, M., KESKİN, O. (2012). Investigation of antibiotic resistance among *Staphylococcus aureus* strains of human and bovine origin. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **59**: 191-196.
- TENOVER, F.C. (2006). Mechanisms of antibacterial resistance in bacteria. *American Journal of Infection Control*. **34**: 3-10.

- TENOVER, F.C., WEIGEL, L.M., APPELBAUM, P.C., MCDUGAL, L.K., CHAITRAM, J., MCALLISTER, S., CLARK, N., KILLGORE, G., O'HARA, C.M., JEVITT, L., PATEL, J.B., BOZDOĞAN, B. (2004). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. *Antimicrobiol Agents and Chemotherapy*, **48**: 275-280.
- TÜİK (Türkiye İstatistik Kurumu) (2018a). Hayvansal üretim istatistikleri. Erişim adresi: [<http://www.tuik.gov.tr>]. Erişim tarihi: 26.05.2019
- TÜİK (Türkiye İstatistik Kurumu) (2018b). TÜİK Hayvancılık istatistik veri tabanı. Yıllık hayvan sayısı ve hayvansal üretim. Erişim Adresi: [<https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=101&locale=tr>] Erişim tarihi: 26.05.2019
- TÜRKYILMAZ, S., TEKBIYIK, S., ORYASİN, E., BOZDOĞAN, B. (2010). Molecular epidemiology and antimicrobial resistance mechanisms of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. *Zoonoses and Public Health*, **57**: 197-203.
- UMARU, G.A., KABİR, J., UMOH, V.J., BELLO, M., KWAGA, J.K.P. (2014). Occurrence of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) in fresh and fermented milk in Nigeria: A preliminary report. *International Journal of Public Health and Epidemiology*, **8(3)**: 54-58.
- ÜNAL, S. (2009). MRSA problemi. *ANKEM Dergisi*, **23**: 1-12.
- ÜNAL, N. (2012). Mastitisli hayvanlardan izole edilen stafilocokların antibiyotik direnç ve hayvanlarda metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **9(3)**: 221-231.
- VURAL, R., ERGÜN, Y., ÖZENÇ, E. (2016). Evcil Hayvanlarda Meme Hastalıkları. Ed.: KAYMAZ, M., FINDIK, M., RIŞVANLI, A., KÖKER, A. Medipres Yayınları, Malatya, sy. 149-243.
- WANESS, A. (2010). Revisiting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Journal of Global Infectious Diseases*, **28**: 49-56.
- WANG, D., WANG, Z., YAN, Z., WUB, J., ALI, T., LI, J., LV, Y., HAN, B. (2015). Bovine mastitis *Staphylococcus aureus*: Antibiotic susceptibility profile, resistance genes and molecular typing of methicillin-resistant and methicillin-sensitive strains in China. *Infection, Genetics and Evolution*, **31**: 9-16.
- WARD, P.B., JOHNSON, P.D., GRABSCH, E.A., MAYALL, B.C., GRAYSON, M.L. (2001). Treatment failure due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with reduced susceptibility to vancomycin. *The Medical Journal of Australia*, **175**: 480-483.
- WIELDERS, C.L.C., FLUIT, A.C., BRISSE, S., VERHOEF, J., SCHMITZ, F.J. (2002). *mecA* gene is widely disseminated in *Staphylococcus aureus* population. *Journal of Clinical Microbiology*, **40(11)**: 3970-3975.
- WINN, W. Jr., ALLEN, S., JANDA, W., KONEMAN, E., PROCOP, G., SCHRECKENBERGER, P., WOODS, G. (2006). *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th Ed. Lippincott Williams and Wilkins. Baltimore, MD, USA.
- WONG, S.S., HO, P.L., WOO, P.C., YUEN, K.Y. (1999). Bacteremia caused by Staphylococci with inducible vancomycin hetero resistance. *Clinical Infectious Diseases*, **29**: 760-767.
- YAŞAR, K.K., BİLİR, Y.A., PEHLİVANOĞLU, F., ŞENGÖZ, G. (2011). Stafilocok suşlarında slaym faktör pozitifliği, metisilin ve antibiyotik direnci. *Ankem*, **25(2)**: 89-93.

YEŞİLMEN, S., ÖZYURLU, N., BADEMKIRAN, S. (2012). Diyarbakır yöresinde subklinik mastitislerde etken izolasyonu ve duyarlı antibiyotiklerin belirlenmesi. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **1(4)**: 24-29.

ÖZGEÇMİŞ

ADI: MÜESSER

SOYADI: YILMAZ

DOĞUM TARİHİ, YERİ: 26.03.1992, Erzurum

MEDENİ HALİ: Bekar

HAYVAN SAHİPLİK DURUMU: 2 Sarman Tekir Sahibi

ÜNVANI: Veteriner Hekim

EĞİTİM:

İlköğretim: 1999-2006 Zaferler İlköğretim Okulu, İstanbul

Ortaöğretim: 2006-2010 Dr. Mete Ersoy Anadolu Lisesi, Muğla/Milas

Üniversite: 2010-2015 Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Afyonkarahisar

Yüksek Lisans: 2016-... (Tez Aşamasında) Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar

E-MAIL: dr.muesser@hotmail.com / dr.muesser@gmail.com

ADRES: Dumlupınar Mah. Menderes Cad. No 37 Merkez/Afyonkarahisar

YABANCI DİL: İngilizce

YÜKSEK LİSANS TEZİ: Sığır Mastitislerinden İzole Edilen *Staphylococcus Aureus* Suşlarında Metisilin, Vankomisin Direnci ve Panton-Valentine Lökosidin Varlığının Araştırılması

YAYINLAR

1. Şeker E., E. Özenç, D. Baki Acar, **M. Yılmaz**, "Prevalence of methicillin-resistant and Panton-Valentine leukocidin genes in Staphylococci isolated from Pirlak sheep with subclinical mastitis in Turkey", 2nd International Congress of Veterinary Microbiology (XIII. National Congress of Veterinary Microbiology), 231, Lara-Antalya, Turkey, 16-19 October 2018 (poster).
2. Özenç E., E. Şeker, **M. Yılmaz**, "Identification of intramammary infections in animals removed from the herd due to various reasons", 2nd International Congress of Veterinary Microbiology (XIII. National Congress of Veterinary Microbiology), 230, Lara-Antalya, Turkey, 16-19 October 2018 (poster).