



**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI**

**MASTİTİSLİ SIĞIRLARDAN İZOLE EDİLEN
STAPHYLOCOCCUS AUREUS İZOLATLARININ VİRÜLENS
GEN PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Ayşe Rümeysa NALÇA

Danışman

Prof. Dr. Timur GÜLHAN

SAMSUN
2021

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI



**MASTİTİSLİ SIĞIRLARDAN İZOLE EDİLEN
STAPHYLOCOCCUS AUREUS İZOLATLARININ VİRÜLENS
GEN PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Ayşe Rümeysa NALÇA

Danışman

Prof. Dr. Timur GÜLHAN

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından PYO.VET.1904.20.015 nolu proje kapsamında maddi olarak desteklenmiştir.

SAMSUN
2021

Kabul ve Onay

Ayşe Rümeysa NALÇA tarafından, Prof. Dr. Timur GÜLHAN danışmanlığında hazırlanan “**Mastitisli sığırlardan izole edilen *Staphylococcus aureus* izolatlarının virülens gen profillerinin belirlenmesi**” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından **16.06.2021** tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği/oy çokluğu ile başarılı bulunarak **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Unvanı, Adı/Soyadı Üniversitesi Ana		İmza	Sonuç
	Bilim Dalı		
Başkan (Danışman)	Prof. Dr. Timur GÜLHAN/Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veterinerlik Mikrobiyolojisi	☐	Kabul
	Anabilim Dalı	☐	Ret
Üye	Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ/Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veterinerlik Mikrobiyolojisi	☐	Kabul
	Anabilim Dalı	☐	Ret
Üye	Doç. Dr. Elçin GÜNAYDIN/ Kastamonu Üniversitesi, Veterinerlik Mikrobiyolojisi	☐	Kabul
	Anabilim Dalı	☐	Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

ONAY

... / ... / ...

(Prof. Dr. Ali BOLAT)

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım yüksek lisans tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

16.06.2021

Ayşe Rümeysa NALÇA

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı: Mastitisli sığırlardan izole edilen *Staphylococcus aureus* izolatlarının virülens gen profillerinin belirlenmesi

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 25.05.2021 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 5

Tek kaynak oranı : % 1 çıkmıştır.

16.06.2021

Prof. Dr. Timur GÜLHAN

ÖZET

MASTITİSLİ SIĞIRLARDAN İZOLE EDİLEN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* İZOLATLARININ VİRÜLENS GEN PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ

Ayşe Rümeysa NALÇA
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı
Yüksek Lisans, Haziran/2021
Danışman: Prof. Dr. Timur GÜLHAN

Bu çalışmada mastitisli sığır sütlerinden izole edilen stafilocok izolatlarının *Staphylococcus aureus* yönünden moleküler doğrulanması ve izolatlarda bazı önemli virülens genlerin tespiti amaçlandı. Bu amaçla 140 stafilocok izolatının termonükleaz (*nuc*) geni varlığı PCR ile incelendi. 42 izolatta *nuc* geni (279 bp) tespit edildi ve *S. aureus* olarak identifiye edildi. Diğer yandan izolatlar lökotosin geni (*pvl*), stafilokokal klasik enterotoksin genleri (*sea*, *seb*, *sec*), eksofoliyatif toksin genleri (*eta*, *etb*), hemolizin genleri (*hla*, *hly*), adezin faktör genleri (*fnaA*, *fnaB*, *clfa*) ve toksik şok sendrom toksin geni (*tst*) yönünden 3 farklı multiplex PCR ile incelendi. Böylece izolatlarda 12 farklı virülens geninin varlığı ortaya konuldu. İzolatların 30 (%71.4)'ü *clfa*, 24 (%57.1)'ü *hla*, 14 (%33.3)'ü *hly*, 10 (%23.8)'ü *fnaB*, 6 (%14.2)'si *fnaA*, 6 (%14.2)'si *etb*, 5 (%11.9)'i *sec*, 5 (%11.9)'i *tst*, 3 (%7.1)'ü *sea*, 2 (%4.7)'si *pvl* ve 1 (%2.3)'i *eta* geni açısından pozitif bulundu. İzolatların hiçbirinde *seb* geni saptanamadı. 42 izolatın 38'inde bir ya da daha fazla virülens geni belirlenirken, 4 izolatta incelenen virülens genlerin hiçbirisi saptanamadı. İzolatların 29'unda iki ya da daha fazla virülens gen açısından çoğul pozitiflik belirlendi. İncelenen izolatlarda en fazla tespit edilen virülens genlerin *clfa* ve *hla* olduğu görüldü.

Sonuç olarak sınırlı dahi olsa sığır mastitislerinin patogeneğinde rol oynayan virülens gen patternleri ortaya konuldu. Çalışma sonuçlarının sığır mastitislerinin etiyolojisinde önemli rol oynayan *S. aureus*'a ait virülens faktörlerinin karakterizasyon çalışmalarına katkı sağlayacağı kanaatine varıldı.

Anahtar Sözcükler: Mastitis, sığır, *Staphylococcus aureus*, virulens gen profili

ABSTRACT

DETERMINATION OF VIRULENCE GENE PROFILES OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLATED FROM CATTLE WITH MASTITIS

Ayşe Rümeyya NALÇA
Ondokuz Mayıs University
Institute of Graduate Studies
Department of Veterinary Microbiology
Master, June/2021

Supervisor: Prof. Dr. Timur GÜLHAN

In this study, the molecular confirmation of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine milk with mastitis and determination of some important virulent genes in the isolates were aimed. For this purpose, the presence of thermonuclease (*nuc*) gene in 140 *S. aureus* isolates was examined by PCR. The *nuc* gene (279 bp) was detected in 42 isolates. On the other hand, isolates were examined with 3 different multiplex PCRs in terms of leukotoxin gene (*pvl*), staphylococcal classical enterotoxin genes (*sea*, *seb*, *sec*), exfoliative toxin genes (*eta*, *etb*), hemolysin genes (*hla*, *hly*), adhesin factor genes (*fnbA*, *fnbB*, *clfa*) and toxic shock syndrome toxin gene (*tst*). Thus, the presence of 12 different virulence genes may occur in isolates. Of the isolates were found to be positive 30 (71.4%) for *clfa*, 24 (57.1%) *hla*, 14 (33.3%) *hly*, 10 (23.8%) *fnbB*, 6 (14.2%) *fnbA*, 6 (14.2%) *etb*, 5 (11.9%) *sec*, 5 (11.9%) *tst*, 3 (7.1%) *sea*, 2 (4.7%) *pvl* and 1 (2.3%) *eta* genes. *seb* gene was not detected in any of the isolates. While one or more virulence genes were determined in 38 of 42 isolates, none of the virulent genes examined in 4 isolates could be detected. Multiple positivity was determined for two or more virulent genes in 29 of the isolates. It was seen that the most virulent genes in the analyzed isolates were *clfa* and *hla*.

As a result, virulence gene patterns that play a role in the pathogenesis of bovine mastitis, even if limited, were revealed. It was concluded that the results of the study will contribute to the characterization studies of virulent factors belonging to *S. aureus*, which play an important role in the etiology of bovine mastitis.

Keywords: Bovine, mastitis, *Staphylococcus aureus*, virulence gen profile

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezim boyunca değerli bilgi, birikim ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, her zaman destek olan danışman hocam Prof. Dr. Timur GÜLHAN, Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Oktay GENÇ, Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ ve Doç. Dr. Arzu FINDIK, Araş. Gör. Merve Gizem SEZENER, Araş. Gör. Evrim GENÇ ile doktora öğrencileri Veteriner Hekim Volkan Enes ERGÜDEN ve Veteriner Hekim Şeyda YAMAN'a teşekkür ederim.

Ayrıca bu çalışmaya PYO.VET.1904.20.015 nolu proje kapsamında maddi destek sağlayan Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'na teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİL DİZİNİ	ix
TABLO DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Mastitis.....	3
2.1.1. Mastitisin Etiyolojisi	4
2.1.2. Mastitis Teşhisi	5
2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	7
2.2.1. Tarihçe	7
2.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i> 'un Genel Özellikleri	8
2.2.3. <i>S. aureus</i> Kökenli Mastitis Patogenezi	9
2.2.4. <i>S. aureus</i> 'un Patogenezine Katkıda Bulunan Virülens Faktörleri.....	9
2.2.4.1. Stafilokokal Enterotoksinler (SE)	10
2.2.4.2. Stafilokokal Hemolizinler	12
2.2.4.3. Panton-Valentine Lökosidin (PVL)	12
2.2.4.4. Toksik Şok Sendrom Toksin.....	13
2.2.4.5. Adezin Faktörleri	14
2.2.4.6. Eksfoliyatif Toksinler.....	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	16
3.2. Materyal	16
3.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i> İzolatları	16
3.2.2. Kullanılan Besi Yerleri	16

3.3. Yöntem.....	16
3.3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon	16
3.3.2. Moleküler İdentifikasyon.....	17
3.3.2.1. DNA Ekstraksiyonu	17
3.3.3. <i>S. aureus</i> İzolatlarının Tür Düzeyinde İdentifikasyonu	17
3.3.4. <i>Staphylococcus aureus</i> İzolatlarının Virülens Genlerinin Belirlenmesi	18
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	21
4.1. <i>S. aureus</i> İzolatlarında <i>nuc</i> Geni Hedefli PCR Sonuçları.....	21
4.2. <i>S. aureus</i> İzolatlarında Virülens Gen Profili	21
5. SONUÇ	32
KAYNAKLAR	33

SİMGELER VE KISALTMALAR

CMT	: California Mastitis Testi
KNS	:Koagülaz Negatif Stafilokok
KPS	:Koagülaz Pozitif Stafilokok
ET	:Eksfoliyatif Toksin
ECM	:Ekstrasellüler Matrix
MHC	: Majör Histokompatibilite Kompleksi
MLST	: Multilokus Sekans Tiplendirmesi
mPCR	:Multiplex PCR
MRSA	:Metisiline Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	:Metisiline Duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i>
PCR	:Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PCR-RFLP	: PCR-Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
PFGE	: Pulsed-Field Jel Elektroforezi
PVL	: Panton Valentine Lökosidin
RAPD	: Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
SE	:Stafilokokal Enterotoksin
SET	:Stafilokokal Eksfoliyatif Toksinler
SFMT	:Surf Field Mastitis Testi
SHDS	: Stafilokokal Haşlanmış Deri Sendromu
SHS	:Somatik Hücre Sayısı
TSS	:Toksik Şok Sendromu
TSST-1	:Toksik Şok Sendrom Toksini-1

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Sığır mastitisinin teşhisi: genel bir bakış	6
Şekil 3.1. MSA'da mannitol pozitif (sarı) ve mannitol negatif (pembe) <i>S. aureus</i> kolonileri .	16
Şekil 3.2. Gram pozitif kok (<i>S. aureus</i> , 100x)	17
Şekil 4.1. <i>S. aureus</i> izolatlarının <i>nuc</i> geni hedefli PCR analizi	21
Şekil 4.2. <i>pvl</i> , <i>etb</i> , <i>sea</i> ve <i>clfa</i> genlerine ait mPCR 1 sonuçları	22
Şekil 4.3. <i>sec</i> , <i>tst</i> , <i>seb</i> ve <i>eta</i> genleri için mPCR 2 sonuçları	22
Şekil 4.4. <i>fnbB</i> , <i>fnbA</i> , <i>hla</i> ve <i>hly</i> genleri için mPCR 3 sonuçları	23
Şekil 4.5. <i>S. aureus</i> izolatlarında belirlenen virülens genlerin dağılımı	24



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. <i>S. aureus</i> tarafından sentezlenen/üretilen önemli virülens faktörleri ve etkileri	10
Tablo 3.1. <i>pvl</i> , <i>etb</i> , <i>sea</i> ve <i>clfa</i> genleri için mPCR 1	19
Tablo 3.2. <i>sec</i> , <i>tst</i> , <i>seb</i> ve <i>eta</i> genleri için mPCR 2	19
Tablo 3.3. <i>fnbB</i> , <i>fnbA</i> , <i>hla</i> ve <i>hly</i> genleri için mPCR 3	20
Tablo 4.2. <i>S. aureus</i> izolatlarında belirlenen virülens genlerin dağılımı	23
Tablo 4.3. <i>S. aureus</i> izolatlarında belirlenen çoğul virülens gen profili	25

1. GİRİŞ

Mastitis, meme dokusunun ve meme bezinin bakteriyel, viral, fungal ve paraziter etkenler nedeniyle yangılanmasıdır. Enfeksiyon genellikle hijyenik ve yönetimsel uygulamaların yokluğunda, sağım sırasında enfekte ineklerden enfekte olmayan ineklere yayılabilmektedir. Hastalığın klinik ve subklinik olarak iki formu bulunmaktadır. Klinik mastitisli ineklerde genellikle şiddetli semptomlar (ateş, sıcaklık artışı, ağrı ve şişkinlik) ve sütlerinde gözle görülür değişiklikler (renk ve kıvam değişikliği) olurken, subklinik mastitisli ineklerde süt veriminde azalma dışında klinik bir belirti görülmeyebilir. Subklinik mastitis olgularında sütün kimyasal ve fiziksel özelliklerini değiştiren, somatik hücre sayısında artış gibi değişiklikler şekillenebilmektedir. Subklinik mastitislerin teşhisinde California Mastitis Testi (CMT) gibi saha tarama testleri yaygın olarak kullanılmaktadır (Antók et al., 2020).

Sığır mastitislerinden en sık izole edilen etkenlerin başında *Staphylococcus* (S.) *aureus* gelmektedir. *S. aureus* Gram pozitif, fakültatif anaerop, sporsuz, hareketsiz, katalaz pozitif ve oksidaz negatif bir bakteridir (Sutra ve Poutrel, 1994). Etken hem insanların hem de hayvanların derisinde, burnunda ve solunum yollarında bulunan kommensal mikrobiyotanın bir parçasını oluşturmaktadır (Momtaz et al., 2011). *S. aureus*, yüzeysel deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarından yaşamı tehdit eden septisemiye kadar, birçok ciddi hastalık oluşturan bir patojendir. Diğer yandan süt endüstrisi için oldukça maliyetli klinik ve subklinik sığır mastitisinin en yaygın etiyolojik ajanıdır (Fluit, 2012). Mastitis hayvan sağlığı/refahı üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Hastalık sonrası hayvansal üretimde önemli ekonomik kayıplar (Peton ve Loir, 2014), süt veriminde ve kalitesinde azalmalar görülmektedir (Awad et al., 2017).

S. aureus, adezinler, kapsüler bir polisakkarit ve ekzoenzimler gibi çok sayıda virülens faktörü üretme kapasitesine sahiptir (Yang et al., 2012). Etken aynı zamanda hemolizinler, koagülaz, slime ve protein A gibi meme bezine kolonize olma kabiliyetine katkıda bulunan ekzoproteinler de üretebilmektedir. α ve β -hemolizinler, mastitisin patogenezinde önemli virülens faktörlerdir. β -toksin, zarın dış fosfolipid tabakasında sfingomiyelini bozan Mg^{+2} bağımlı bir sfingomiyelinaz C'dir (Coelho et al., 2011). *S. aureus* izolatlarının patojenitesi; adherens özellikleri, çeşitli toksinler, enzimler, yapısal ve ekstraselüler faktörler gibi özelliklerle ilişkilidir (Şahin ve

Kaleli, 2018). Konakçı hücre dışı matriks bileşenlerine yapışmayı sağlamak, konakçı hücrelere zarar vermek ve bağışıklık sistemini güçlendirmek için salgılanan ve hücre yüzeyiyle ilişkili virülens faktörleri enfeksiyonun gelişimine katkı sağlamaktadır. Etkenin dokulara yapışmasını sağlayan en az 25 farklı toksin, adezin matriks molekülleri ile ilişkisi olan 15 mikrobiyal yüzey bileşeni, 20 immunsüpresif molekül ve diğer birçok virülens faktörü bilinmektedir (Fluit, 2012).

S. aureus, iki pıhtılaşma faktörü, koagülaz (*coa*) proteini ve von Willebrand faktör bağlayıcı protein salgılar. *coa* proteini *S. aureus*'un önemli bir fenotipik belirleyicisi ve virülens faktörüdür. *coa*'nın plazmayı pıhtılaştırma yeteneği, *S. aureus*'un belirleyici bir özelliğidir ve türleri diğer *coa*-negatif stafilokoklardan ayırır (Effendi et al., 2019).

S. aureus nedenli mastitis oluşumu farklı patogeneiz mekanizmalarına bağlı çeşitli virülens faktörlerin üretimine bağlıdır. *S. aureus* tarafından üretilen virülens faktörleri, yıkıcı enzimler, hücre duvarı ile ilişkili adezinler ve süperantijenik toksinler dahil olmak üzere farklı gruplara ayrılabilir. *S. aureus* suşlarının patojenisitesindeki farklılıklar coğrafi dağılımdan, konakçı ve doku ile ilgili özelliklerden kaynaklanmaktadır. Virülens genlerinin sayısı ve kombinasyonu, *S. aureus* suşlarının patojenik potansiyeline önemli katkılar sağlamaktadır (Kot et al., 2016).

S. aureus izolatlarının moleküler karakterizasyonunda koagülaz geni (*coa*), metisilin direnç geni (*femA*) ve termonükleaz geni (*nuc*) gibi tür spesifik genler kullanılmaktadır. Hem *coa* hem de *femA* yüksek polimorfizm gösterir ve teşhis amaçları için uygun değildir. Aksine *nuc*, hem insan hem de hayvan izolatlarında türe özgü bir markör olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca bu gen *S. aureus* suşları arasında yüksek oranda korunmaktadır. Bununla birlikte, bazı izolatlar *nuc* geninin kısmi silinmesi veya mutasyonu ile *nuc* negatif olabilmektedir. Bu nedenle tür düzeyinde tanımlama yaparken birden çok genin ortaya konulması daha doğru bir yaklaşım olarak düşünülmektedir (Pilla et al., 2013).

Bu çalışmada mastitisli sığır sütlerinden elde edilen *S. aureus* izolatlarının *nuc* geni yönünden tür düzeyinde moleküler tanımlanması ve mastitisin patogeneizinde rol oynayan bazı önemli virülens genlerinin mPCR ile incelenmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mastitis

Mastitis, bazı patojen, alerji veya fiziksel travmanın bir sonucu olarak meme bezinde gelişen yangısal bir reaksiyondur. Sığır mastitisi, süt üretimindeki azalma, tedavi maliyetleri ve üretimden çıkarma gibi büyük ekonomik kayıplar nedeniyle süt endüstrisinin en yaygın hastalıklarından biridir (Ashraf and Imran, 2018). Çevresel faktörler, sağım tekniklerindeki yetersizlikler, laktasyon dönemi yönetim hataları ve farklı enfeksiyonlar mastitis gelişimini tetikleyebilmektedir. Mastitis sonucunda sütün fiziksel, kimyasal, ve biyolojik özellikleri değişebilmektedir. Enfekte hayvanların sütlerindeki patojenik mikroorganizmalar ve bunların toksinleri insan sağlığı açısından risk oluşturabilmektedir (Raza et al., 2013).

Mastitis, klinik görünümüne göre ve enfeksiyonun şiddetine bağlı olarak klinik ve subklinik olarak sınıflandırılmaktadır (Cantekin vd., 2015). Genel olarak, mastitise eşlik eden semptomlar değişkendir ve farklı mastitis türlerini ayırt etmek için kullanılmaktadır. Perakut, akut, subakut ve kronik olarak sınıflandırılan klinik mastit, şişlik, ağrı, kızarıklık ve azalmış süt üretimine yol açan işlev kaybı gibi belirtileri ile karakterize edilmiştir. Şiddetli klinik mastitis durumuna ek olarak ateş, süt görünümünde değişiklik ve azalma, sistemik hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Aksine, subklinik mastitis, belirgin inflamasyon belirtileri olmaksızın, somatik hücre sayısının artmasına veya süt veriminde azalmaya neden olmaktadır (Schabauer et al., 2018). Subklinik mastitisli süt örneklerinde süt yağı, protein, laktoz, potasyum, kalsiyum, magnezyum, fosfor, demir ve çinko azalmasına rağmen pH, elektriksel iletkenlik, malondialdehit, lökositler ve nötrofil sayısında artış görülmektedir. Subklinik mastitisin teşhisi saha tarama testleri veya laboratuvar muayeneleri ile yapılmaktadır (Ashraf and Imran, 2018). Subklinik mastitis çiftliğin her tarafına yayılabilir ve yüksek düzeyde ekonomik kayba neden olabilir. Bu dönemde mastitisin erken teşhisi ve uygun güvenlik önlemlerinin alınması hastalığın yayılmasının önlemesi ve tedavisi için önemlidir (Cruzado-Bravo et al., 2019).

Mastitisin seyri/şiddeti, hayvanlardaki bağışıklık durumu ve etkenin patojenitesine göre değişkenlik gösterebilmektedir. Hastalığın tedavisi, sürü yönetimi ve mastitisin şiddetini değerlendirmek için uygun bir klinik muayene gereklidir. Bu nedenle, süt ineklerinde klinik mastitis şiddetinin belirlenmesinde çeşitli skorlama sistemleri geliştirilmiştir. Bu sınıflandırmalar, meme bezinin fiziksel özelliklerine,

sütün görünümüne, yüksek vücut ısısı, ruminal aktivitede azalma ve dehidrasyon gibi sistemik hastalık belirtilerinin varlığına göre yapılabilmektedir. Daha iyi kontrol ve tedavi stratejileri için, etiyolojinin belirlenmesi kritik öneme sahiptir. Geleneksel yöntemler, mikrobiyal kültürlenme ve biyokimyasal testlere dayanmaktadır. Bu yöntemler zaman alıcıdır ve yalnızca canlı bakterilerin tespitine izin verir. Bu nedenle daha fazla zaman ve üretim kaybına yol açan yanlış negatif sonuçlar elde edilmektedir (Schabauer et al., 2018).

Mastitis ve etiyolojisi hakkında önemli bilgiler olmasına rağmen, hastalık hâlâ yaygın bir şekilde görülmektedir. Eradikasyondaki ve kontrol altına alınmasındaki güçlükler nedeniyle dünya çapında süt endüstrisi üzerine olumsuz finansal etkileri sürmektedir. Bu kayıplar, sütte belirgin bileşim değişiklikleri ile birlikte süt veriminde azalma (kalite ve endüstriyel kullanılabilirlikte azalma), tedavi maliyetleri, işçilik maliyetleri ve sığırların erken ıskartaya çıkartılması gibi birçok faktörden kaynaklanmaktadır. Mastitis, etiyolojisi, kayıp derecesi ve tedavi stratejisi açısından oldukça karmaşıktır (Pichette-Jolette et al., 2019).

2.1.1. Mastitisin Etiyolojisi

Mastitis oluşumuna çok sayıda mikroorganizma katılmakla birlikte, etiyolojinin en önemli kısmını bakteriler oluşturmaktadır. Bakteriyel etkenler arasında sıklıkla izole edilenler *Staphylococcus*, *Streptococcus*, koliform, *Actinomyces*, *Micrococcus*, *Enterobacter*, *Klebsiella* spp. ve *Bacillus* türleridir. Bu etkenlerin pek çoğu fırsatçı enfeksiyonlara neden olsa da mastitis vakalarından izole edilmektedir. Mastitislerin önlenmesi ve tedavisinde kullanılan antibiyotiklere direnç gelişimi yaygındır. Antibiyotiklere dirençli stafilokoklar arasında MRSA'lar güncelliğini korumakla birlikte MSSA enfeksiyonlarında artış yaşandığı bildirilmektedir (Fursova et al., 2020).

Mastitise neden olan bakteriyel patojenler genel olarak çevresel ve bulaşıcı olmak üzere iki epidemiyolojik kategoriye ayrılmaktadır. Çevresel patojenler içerisinde koliform bakteriler, ciddi klinik semptomlarla karakterize bulaşıcı olmayan mastitis etkenleri arasında önemli yer tutmaktadır. Bulaşıcı patojenler arasında *S. aureus*, *S. aureus* harici stafilokoklar, *Streptococcus* türleri, *Mycoplasma* türleri ve *Corynebacterium bovis* bulunmaktadır (Côté-Gravel and Malouin, 2019).

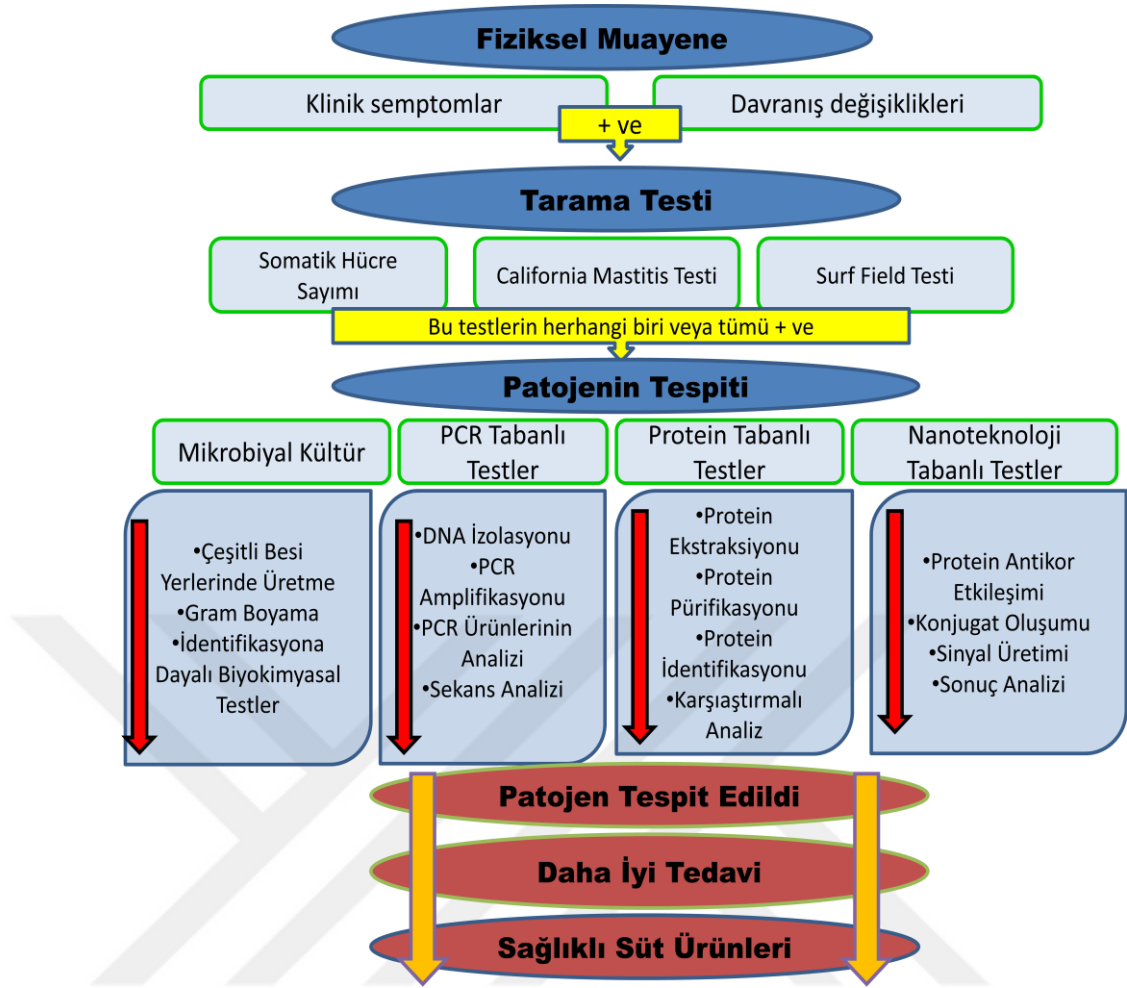
Stafilokoklar, sığır mastitislerinde en sık izole edilen ve kontrol edilmesi zor patojenlerdir. *S. aureus*, genellikle sığırlarda subklinik veya klinik-kronik

mastitislere neden olmaktadır. Enfeksiyonun kalıcılığı veya mastitis semptomlarının şiddeti, ilgili *S. aureus* suşunun genotipi ve fenotipi dahil olmak üzere ortam, konakçı ve patojenden gelen birçok faktör tarafından belirlenmektedir (Monistero et al., 2020).

2.1.2. Mastitis Teşhisi

Mastitis teşhisi, meme bezinde veya sütte belirgin bir değişik ve ardından ateş, halsizlik veya iştahsızlık gibi diğer klinik belirtilerin gözlemlenmesi ile başlar. Sürü yönetimi bu semptomların ilk gözlemlenmesinde önemli bir role sahiptir. İyi eğitilmiş ve dikkatli personel, meme dokusundaki küçük bir değişikliği veya sütteki en küçük pıhtıyı bile göz ardı etmeyerek mastitisin kontrolüne ve yönetimine yardımcı olabilmektedir. Yukarıda belirtilen semptomlar, meme enfeksiyonlarının bir göstergesidir ve dikkate alındığında, erken tedavinin başlatılmasına ve hastalığın yayılmasının önlenmesine katkı sağlayabilecektir.

Hastalığın kontrolünde en önemli nokta, mastitis etiyolojisinin doğru bir şekilde tanımlanmasıdır. Tanımlanması gereken patojenlerin çeşitliliği göz önüne alındığında, mastitisin erken teşhisi, etken izolasyonu, kontrol ve tedavi için hızlı/etkili teşhis yönteminin geliştirilmesi son derece önemlidir. Hayvanın beslenme durumu, etkenin patojenitesi ve diğer birçok faktöre bağlı olarak hastalık semptomları değişkenlik göstermektedir. Mastitis teşhisinde iki aşama vardır: birinci aşama, hastalık durumunun ortaya konulması, ikinci aşama etken tespitinin yapılmasıdır. Şekil 2.1.'de sığır mastitis teşhisinin kısa bir özeti gösterilmektedir. Klinik mastitis vakalarında meme ve sütün görünümü hastalık hakkında ön fikir vermektedir. Subklinik mastitis için, somatik hücre sayımı (SHS), CMT, Surf Field Mastitis Testi (SFMT) ve çiftlikte tarama testleri kullanılmaktadır. Bu testlerin hiçbiri, etkeni belirlememekte ve kantitatif sonuçları göstermemektedir. CMT ve SHS, mastitis tespiti için evrensel olarak kabul edilen ve süt kalitesinin belirlenmesinde saha taramasında yaygın olarak kullanılmaktadır.



Şekil 2.1. Sığır mastitinin teşhisi: genel bir bakış (Ashraf and Imran, 2018'den uyarlanmıştır)

CMT, uygulaması kolay ve ekonomik olmakla birlikte düşük duyarlılığa sahiptir. CMT ve SFMT saha şartlarında kolayca uygulanabilmektedir. Ancak yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuç alma oranı yüksek olduğundan ve SHS'de olduğu gibi sayısal veriler elde edilememesi dezavantaj olarak görülmektedir. Bu testler etkeni tanımlamazken, sadece mastitis pozitif veya negatif sonuç vererek enfeksiyonun şiddeti hakkında kabaca fikir vermektedir (Ashraf and Imran, 2018).

Test maliyeti ve eğitimli personel gereksinimi gibi birkaç dezavantajı olmasına rağmen SHS, genellikle sığır mastitinin saptanmasında yaygın kullanılan bir yöntemdir. SHS seviyelerini mastitis ile ilgili olmayan diğer stres faktörleri değiştirebilmektedir. Test için 200.000 hücre/mL'lik hücre sayısı eşik değer olarak kabul edilmekte ve mastitisin tanımlanmasında kullanılmaktadır. SHS'de metilen mavisi boyama yöntemi ile doğrudan mikroskopik sayım, disk veya akış sitometrisi ile floroptik elektronik hücre sayımını içeren çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Doğrudan mikroskopik sayım referans bir yöntemdir, ancak zaman alıcı olması,

emek gerektirmesi ve hücreler ile sitoplazmik parçacıklar arasında ayırım yapılmasının zor olması gibi birçok sınırlayıcı faktör bulunmaktadır. Dijital olarak yapılan somatik hücre sayımında elektronik partikül sayımı, dijital sayaçlarla gerçekleştirilmektedir. Ayrıca SHS’de, disk veya akış sitometrisine dayalı fossomatic, somacount ve somaskop gibi dolaylı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler, taze ve korunmuş süt örnekleri için ön işlem gerektirmeden kullanılabilir. Floresan boyama ile birleştirilen akış sitometrisinin, hızlı, güvenilir ve uygun maliyetli bir test olduğu bildirilmektedir (Ashraf and Imran, 2018).

Süt örneklerinden etken izolasyonu amacıyla gerçekleştirilen kültür tekniği, mastitis teşhisi için altın standart olarak kabul edilmekle birlikte, bu tekniğin birkaç dezavantajı bulunmaktadır. Etken izolasyonunda süte antibiyotik kalıntısı, yangı hücreleri ve mediyatörler bakteriyel üremeyi baskılayabilmektedir. Ayrıca subklinik mastitis vakalarında etken sayısı izolasyon seviyesinin altında olabilmektedir. Bu nedenle, bakteriyel kültür yöntemlerinde karşılaşılan yanlış negatif sonuçların önüne geçmek için moleküler teknikler (PCR gibi) kullanılmaktadır. Mastitis teşhisinde moleküler tekniklerin kullanımı, etkenlerin yüksek duyarlılığa sahip spesifik primerlerle hızlı ve güvenilir bir şekilde tespiti için önerilmektedir. Böylece örneklerdeki düşük seviyedeki etkenlerin PCR ile tespiti mümkün olabilmektedir (Cantekin vd., 2014).

Hastalığın doğru ve erken teşhisi, prognoz ve tedavisi açısından önem arz etmektedir. Meme sağlığı için ekonomik, güvenilir ve hızlı bir teşhis aracının kullanılması çok önemlidir. SHS ve mikrobiyal kültür gibi geleneksel altın standart yöntemler güncel olarak kullanılmaktadır. Yeni geliştirilen nanoteknolojik ve protein temelli testler sığır mastitisinin teşhisinde gelecekte kullanılabilecek potansiyel yöntemlerdir (Ashraf and Imran, 2018).

2.2. *Staphylococcus aureus*

2.2.1. Tarihçe

S. aureus'un tarihi, Sir Alexander Ogston'un *S. aureus*'u cerrahi bir yara enfeksiyonundan izole ettiği 1880 yılına dayanmaktadır. İzole edilen organizma, koyalara ve farelere enjekte edildiğinde oluşturmuştur. Bunu takiben Louis Pasteur, insan stafilokok enfeksiyonlarından irin enjekte ederek hayvanlarda apseler

oluşturmuş ve o zamandan beri sayısız insan ve hayvan hastalığı ile ilişkili bulunmuştur (Lakhundi and Zhang, 2018). 1890'da *S. aureus*'un sığırlarda mastitis oluşturduğu bildirilmiştir. Ogston enfekte dokudaki yuvarlak mikroorganizmaya "Staphylococcus" adını vermiştir (Yunanca stafil üzüm salkımı kokkos ise dut /tane anlamına gelmektedir). Nocard, 1887'de koyunlarda mastitisten stafilokoklar tespit etmiş ve sonraları 1890'da Guillebeau, sığırlarda mastitisten bu organizmaların sorumlu olduğunu belirtmiştir. *S. aureus*, ineklerde meme enfeksiyonunun önemli nedenlerinden biri olarak görülmüştür. Bu patojenle oluşturulan deneysel meme içi enfeksiyonlar, klinik ve subklinik mastitise yol açmış ve mastitis SHS'de görülen artışla ilişkilendirilmiştir. Etkenin sahip olduğu virülens faktörleri ve invazyon yeteneği enfeksiyonun kontrolünü zorlaştırmaktadır (Raza et al., 2013).

2.2.2. *Staphylococcus aureus*'un Genel Özellikleri

Stafilokoklar, çapı 0,5-1,5 µm olan, bir düzlemde birden fazla üzüm benzeri kümeler oluşturan kok morfolojisine sahip bakterilerdir. Stafilokoklar hareketsiz, spor oluşturmayan, aerobik veya fakültatif anaerobik mikroorganizmalardır. Etken izolasyonu için genel ve özel besiyerleri kullanılmaktadır. Besi yerlerinin bileşiminde arginin, valin, tiamin ve nikotinamid gibi esansiyel amino asitleri içeren organik nitrojen kaynakları bulunması bakteriyel üremeye olumlu katkı sağlamaktadır. Stafilokoklar, streptokoklardan katalaz pozitif ve oksidaz negatif olmasıyla ayırt edilir. Stafilokoklar yüksek tuz konsantrasyonlarına tolerans ve ısıya direnç gösterebilirler. Stafilokoklar, tavşan plazmasını koagüle etme yeteneğine bağlı olarak koagülaz pozitif (KPS) ve koagülaz negatif (KNS) olarak ikiye ayrılırlar. Patojenik stafilokoklarda, kan pıhtılaşmasına neden olan koagülaz enzimi, *S. aureus*, *S. intermedius* ve *S. hyicus* gibi türlerin, koagülaz negatif *S.epidermidis* gibi diğer stafilokoklardan ayırt edilmesini sağlar.

S. aureus, kanlı agarda hemoliz özelliği olan gri, grimsi-sarı ila sarımsı turuncu renklerde pürüzsüz, konveks, parlak ve yuvarlak koloniler oluşturmaktadır. *S. aureus*'un tanımlanmasında koagülaz geninin yanı sıra termonükleaz (TNase) geni de kullanılmaktadır. *S. delphini* dışındaki tüm koagülaz pozitif türler TNaz üretmektedir. *S. aureus* mannitolü, aerobik ve anaerobik olarak fermente eder (Baran vd., 2017).

2.2.3. *S. aureus* Kökenli Mastitis Patogenezi

S. aureus insanlarda ve hayvanlarda pek çok önemli hastalığa neden olmaktadır. Bulaşıcı sığır mastitinin de en yaygın etiyolojik ajanıdır. Mastitis oluşması için etkenin meme kanalından meme bezine erişmesi, humoral ve hücrel bağışıklık savunmalarını aşması gerekmektedir. *S. aureus* izolatları, yüzeyle ilişkili salgı ürünleri, hemolizinler, lökotosinler ve enterotoksinler dahil olmak üzere birçok virülens faktörü üretmektedir (Zecconi et al., 2006).

S. aureus genellikle başlangıçta meme ucu kanalında kolonize olur. Kolonizasyondan sonra bakteriler bezdeki kanalların ve alveollerin epiteline yapışır ve toksin üretimine başlar. Bakterilerin yapışması sonrası makrofaj stimülasyonu ve nötrofillerin kandan süte geçişi uyarılarak SHS’de artış ve meme bezinde şişkinlik şekillenir. Bunun sonucunda konakçı savunma sistemi ve epitel hücreler zarar görebilir. Böylece konak hücrelerde yangıyı indükleyerek meme nekrozuna yol açabilir (Jia et al., 2019). Aşılama ve hijyenik şartların iyileştirilmesi gibi etkili mastitis kontrol yöntemleri uygulanmazsa, memede kalıcı hale gelen etkenler kronik mastitis oluşumuna neden olabilir (Raza et al., 2013).

2.2.4. *S. aureus*’un Patogeneze Katkıda Bulunan Virülens Faktörleri

Sığır mastitisindeki patojenik rolleri dışında, bazı toksin üreten *S. aureus* suşları, insanlarda ve hayvanlarda pek çok hastalık açısından risk oluşturmaktadır. Sığır mastitislerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarında hemolizinler (*hla* ve *hly*), eksfoliyatif toksinler (*eta-eto*), lökositin (*pvl*), adezin faktörleri (*fnaA*, *fnaB*, *clfA*), stafilokokal enterotoksinler (SE’ler), toksik şok sendromu toksin-1 (TSST-1) ve biyofilm oluşumu dahil olmak üzere çeşitli virülens faktörleri/genleri tespit edilmiştir. Bu genlerin çoğu hareketli genetik elementlerde bulunur ve stafilokok türleri arasında yayılabilir. Virülens faktörleri; konak dokuya kolonizasyonu artıran yüzey proteinleri, dokularda bakterinin yayılmasını sağlayan invaziner, hücre dışı enzimler, fagositik aktiviteyi inhibe eden yüzey faktörleri, koagülaz ve biyofilm gibi yapılardan oluşmaktadır. *S. aureus*, neredeyse tüm antimikrobiyal ajanlara direnç geliştirme potansiyeline sahiptir (Xu et al., 2015).

S. aureus enfeksiyonlarının şiddeti virülens faktörlerinin çeşitliliğine bağlıdır. Bu virülens faktörleri, ısıya veya proteolitik enzimlere karşı oldukça dirençlidir. Ayrıca bakterilerin meme bezinde canlı kalmasına ve çoğalmasına yardımcı olur (Liu

vd., 2017). *S. aureus*, insanların ve hayvanların florasında olmasına rağmen, virülens faktörlerinin kazanılması yoluyla konakçı hücrelere zarar veren bir patojen haline gelebilmektedir (Said et al., 2016).

S. aureus izolatları, patojenitelerine farklı şekillerde katkıda bulunabilen protein A, kümelenme faktörü, koagülaz, fibrinojen, fibronektin, hemolizinler, nükleazlar, eksfoliyatif toksinler ve enterotoksinler gibi yüzeyle ilişkili faktörler, degradatif enzimler ve süperantijenik toksinler üretebilmektedir (Kumar vd., 2011; Ote et al., 2011). *S. aureus* tarafından sentezlenen/üretilen önemli virülens faktörleri ve etkileri Tablo 2.1.'de gösterildi.

Tablo 2.1. *S. aureus* tarafından sentezlenen/üretilen önemli virülens faktörleri ve etkileri

Virülens Faktörü	Etki
Enterotoksinler	Gıda zehirlenmesi
Hemolizinler	Sitotoksik etki, lizis
Koagülaz	Plazma koagülasyonu/kümeleşme
Stafilokinaz	Fibrinolizis
Protein A	Lipolizis, opsonizasyonu önleme
Lesitinaz	Lesitin hidrolizi
Lökositidin	Sitoliz, nekrotik etki
Kapsül	Antifagositik
Toksik Şok Sendrom Toksin	Hücre proliferasyonu, şok
Eksfoliyatif Toksin	Kohezyon kaybı, invazyon
Hyaluronidaz	İnvazyon
DNAaz	DNA hidrolizi
Adezin Faktörleri	Adezyon, kolonizasyon, antifagositik

S. aureus tarafından üretilen virülens faktörlerinin ortaya konulması, hem beşeri hem de veteriner hekimlikte önem arz etmektedir. Farklı *S. aureus* izolatları arasındaki genetik çeşitliliğin ortaya konulması etkili tedavi yöntemlerinin gelişmesine katkı sağlamaktadır (Ote et al., 2011).

2.2.4.1. Stafilokokal Enterotoksinler (SE)

Enterotoksijenik *S. aureus* suşları tarafından oluşturulan enterotoksinler gıda zehirlenmesinin en yaygın nedenidir. Pek çok hayvansal gıdada enterotoksijenik *S. aureus* varlığı insan sağlığı açısından önemli riskler oluşturmaktadır (Said et al., 2016). Süt, *S. aureus*'un biyolojik aktivitesini koruyan enterotoksin üretimi için iyi bir substrattır (Ahmady and Kazemi, 2013). SE'ler, insan T hücrelerine bağlanma ve hiperstimülasyonu indüklemeye yeteneklerinden dolayı "süperantijenler" olarak da adlandırılmaktadır. Bu antijenler spesifik olarak MHC (majör histokompatibilite kompleksi) sınıf II T hücre reseptörlerine bağlanan, ısıya ve proteolize karşı dirençli

karaktere sahiptirler (Kane et al., 2018). Stafilokok genomu, çeşitli mobil genetik elementlerde bulunan birden fazla enterotoksini kodlayabilme yeteneği sayesinde çok çeşitli enterotoksinler üretebilmektedir (Bystron et al., 2009). SE genleri kromozom, plazmid ve fajlarda bulunabilmektedir (Seyoum et al., 2016).

SE'ler, antijenik özelliklerine göre beş ana serolojik türe (A-E) ayrılmış ve genetik (*sea-see*) olarak doğrulanmıştır (Boynukara vd., 2008). Bununla birlikte, yeni SE türlerinin de (G,H,I,J,K,L,M,N,O,P,Q,R) varlığı bildirilmiş ve genleri (*seg, seh, sei, sej, sek, sel, sem, sen, seo, sep, seq* ve *ser*) tanımlanmıştır (Ahmady and Kazemi, 2013). Bugüne kadar antijenitelerine göre yaklaşık 30 farklı SE tanımlanmıştır (Kotzamanidis et al., 2021). SE'ler, 26.000 ila 29.600 Da arasında değişen düşük moleküler ağırlıklı, tek zincirli bir ekzoprotein ailesidir. SE'ler, ısıya (121°C'de 3-8 dakika), pepsin veya tripsin gibi çoğu proteolitik enzime oldukça dirençli karakterde, kısa, suda çözünür, hücre dışı proteinlerdir (Peles et al., 2007). SE'lerin sadece bir alt kümesi emetik aktiviteye sahiptir (Grispoldi et al., 2019). Pek çok SE'nin gıda zehirlenmelerinden sorumlu olduğu bilinmekle birlikte, en yaygın stafilokok kaynaklı gıda zehirlenmesi oluşturan enterotoksin tipinin A olduğu ortaya konulmuştur (Yang et al., 2012; Guimarães et al., 2013).

Enterotoksinlerin ve ilgili genlerin tespiti için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Klasik SE'lerin (A-E) teşhisi amacıyla ELISA, immünodifüzyon, radioimmunoassay ve lateks aglütinasyon teknikleri kullanılmaktadır (Ahmady and Kazemi, 2012). Hem klasik hem de güncel stafilokokal enterotoksin genlerinin PCR metodu ile hızlı ve güvenilir bir şekilde tespit edilebildiği bildirilmektedir (Kotzamanidis et al., 2021). Enterotoksin genleri, *S. aureus* suşları arasında eşit olarak dağılmamıştır. Bu suşlar arasındaki genetik varyasyon hem enterotoksin hem de diğer genlerde meydana gelmektedir. Bu nedenle, bu genlerin dağılımı ile *S. aureus* genetiği arasındaki ilişki, farklı genotipleme yöntemleri kullanılarak ortaya konulabilmektedir. Bu genotipleme yöntemleri arasında Pulsed-Field Jel Elektforezi (PFGE), Multilocus Sekans Tiplendirmesi (MLST), Rastgele Artırılmış Polimorfik DNA (RAPD) ve protein A (*spa*), koagülaz (*coa*) ve *aroA* geninin PCR-Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (PCR-RFLP) analizi yer almaktadır (El-Huneidi et al., 2006).

2.2.4.2. Stafilokokal Hemoliziner

Stafilokoklar α , β , γ , δ ve ϵ olmak üzere beş farklı hemolizin oluşturabilirler. Bunlar arasında α , β ve γ hemolizin tipleri en sık tespit edilen hemolizindir. *S. aureus* α (*hla*) ve β hemolizin (*hly*) başta olmak üzere sentezlediği farklı tipteki hemolizinerle eritrositleri hemolize edebilmektedir. Ayrıca bu hemolizinerin lökosit, hepatosit, trombosit, epitel hücreleri ve lenfositler dahil olmak üzere birçok memeli hücresi için sitotoksik olduğu gösterilmiştir (Pumipuntu et al., 2019).

α -hemolizin, en çok incelenen ve karakterize edilen *S. aureus* sitotoksindir ve hemolitik, dermonekrotik ve nörotoksik etkileri nedeniyle ana patojenite faktörü olarak kabul edilmektedir. Diğer yandan α -hemolizin bakterinin konakçı bağışıklık sistemi hücrelerinden kaçmasını (antifagositik etki) ve antibiyotiklerin etkisinden kurtulmasını kolaylaştırmaktadır. α -hemolizin, mastitis, pnömoni, deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarının oluşmasında önemli katkılar sağlamaktadır. α -hemolizin, sığır meme epitel hücrelerinde DNA parçalanmasına, reaktif oksijen türlerinin oluşumuna ve mitokondriyal transmembran potansiyelinde değişikliklere neden olmaktadır (Jia vd., 2019). *hla* geninin genetik polimorfizmini karakterize etmek önemlidir. *S. aureus*'un *hla* geninin insan kaynaklı çeşitliliği bilinmekle birlikte, sığır mastitis izolatlarında bu genin sekans değişkenliği ile ilgili bilgiler kısıtlıdır (Zhang et al., 2018).

β -hemolizin (fosfolipaz C), bakteri üremesinin logaritmik üreme safhası boyunca üretilen, sfingomiyelinaz olarak da bilinen eritrosit, lokosit ve makrofaj gibi hücreler üzerine toksik etkili termolabil (ısıya duyarlı) bir proteindir. Stafilokokal β hemolizin, α hemolizinden farklı olarak koyun ve sığır eritrositlerinde kısmi ya da tam olmayan hemoliz yapmaktadır. Hemoliz kanlı agarın soğukta tutulması ile belirgin hale geldiği için durum sıcak-soğuk lizis olarak tanımlanmaktadır (Yang et al., 2012).

2.2.4.3. Panton-Valentine Lökositidin (PVL)

PVL, lökosit yıkımına ve doku nekrozuna neden olan bir sitotoksindir. *S. aureus* tarafından üretilen ekzotoksin PVL, insanlarda nekrotizan hastalıklarda önemli bir virülens faktörüdür (Ünal ve Çınar, 2012). Diğer yandan sığır mastitislerinin oluşumunda rol oynadığı *in vivo* ve *in vitro* olarak gösterilmiştir (Jia et al., 2019).

PVL, ilk kez 1894 yılında Van de Velde tarafından lökosit parçalama yeteneğini fark ettiğinde tanımlanmıştır. Toksinin, deri ve doku enfeksiyonlarıyla ilişkili ve hemolitik yeteneğinin klasik stafilokokal lökositinden farklı olduğu Pantone ve Valentine tarafından ortaya konulmuştur. Araştırmacılar, saflaştırılmış toksinin tavşan ve insan lökositlerine etkisinin bilinen fenotiplerden farklı olduğunu göstermişlerdir. Toksin, sırasıyla 38 ve 32 kDa boyutlarında *LukS-PV* ve *LukF-PV* adlı iki farklı protein alt birimden oluşmaktadır. *LukS-PV*, konakçı hücre membranında yüksek afiniteye sahip bir reseptörü bağlar, ardından *LukF-PV* bağlanarak hücre membranına yapışan bir dimer oluşturur. Bu dimerler daha sonra bir oktametik halka yapısına dönüşür ve hücreye zarar veren konakçı hücre üzerinde gözenekler oluşturur (Kane et al., 2018).

Sığır mastitislerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarında *pvl* geninin varlığı ve yaygınlığı giderek artmaktadır. Diğer yandan MRSA ve MSSA kökenli enfeksiyonlar ile *pvl* geni arasında ilişki olduğu ortaya konulmuştur (Kotzamanidis et al., 2021).

2.2.4.4. Toksik Şok Sendrom Toksin

Toksik şok sendromu (TSS) ilk kez 1978 yılında küçük çocuklarda şiddetli akut bir hastalıkta (yüksek ateş, eritemli döküntü, hipotansiyon veya şok, çoklu organ tutulumu ve deride deskuamasyon ile karakterize) tanımlanmıştır. Hastalığın etkeninin *S. aureus* olduğu belirlenmiştir (Musser et al., 1990).

S. aureus tarafından üretilen toksik şok sendromu toksin-1 (TSST-1), insanlarda TSS'nin başlıca nedeni olarak kabul edilmektedir. Bu toksinin insanlardaki hastalıklarda patogenezi bilinmekle birlikte hayvanlardaki etkileri çok net değildir (Yang et al., 2020). TSST-1, insanlarda "toksik şok sendromunun" gelişiminde önemlidir. Diğer stafilokok toksinleri gibi TSST-1, interleukin-1 salınımını ve monositlerden tümör nekroz faktörünü indüklemek gibi çok sayıda immüno-uyarıcı etkiye sahiptir. T lenfositler üzerindeki mitojen etkisi, lenfokinlerin salınımına neden olmaktadır. Sığır T lenfositlerinin bu toksin ile deneysel olarak karşı karşıya getirilmesi sonucu, TSST-1'in sığır bağışıklık hücreleri için bir süperantijen olduğu belirlenmiştir. Böylece bu toksinin sığır mastitislerinin patogeneğinde potansiyel etkiye sahip olduğu ortaya konulmuştur (Zschöck et al., 2004).

2.2.4.5. Adezin Faktörleri

Direnç faktörlerinin yanı sıra, pek çok *S. aureus* izolatında polisakkarit yapılı kapsül ile meme dokularına yapışmayı, doku kolonizasyonunu ve fagositoza dirençliliği belirleyen protein karakterinde çok çeşitli yüzeyle ilişkili virülens faktörleri belirlenmiştir. Bu proteinlerin *S. aureus* enfeksiyonlarının patogeneziindeki önemi Höök ve Foster tarafından açıklanmıştır (Scarpa et al., 2010).

S. aureus konak hücrenin hücre yüzeyine yapışabilir. *S. aureus*'un hücre yüzeyindeki adezin molekülleri, kollajen adezinini (Cna), fibronektin bağlayıcı protein A ve B'yi (FnbpA ve FnbpB), fibrinojen bağlayan kümeleme faktörü A ve B'yi (ClfA ve ClfB), elastin bağlayıcı proteini (EbpS) ve geniş bir bağlanma aktivitesine sahip proteinleri içermektedir. Bu ekstraselüler matriks bağlayıcı stafilokok proteinleri, stafilokokların patojenitesine katkı sağlamaktadır. Stafilokokların kıkırdağa yapışmasına Cna aracılık eder. Stafilokokların operasyon malzemeleri ve laboratuvar ekipmanları gibi yabancı materyallere yapışmasında ClfA, ClfB, FnbpA ve FnbpB kümelenme faktörleri önemli rol oynamaktadır (Tung vd., 2000). *fnbA* ve *fnbB* genleri tarafından kodlanan FnbpA ve FnbpB proteinler, sığır meme bezi hücrelerine yapışma ve invazyon için önemlidir (Rocha vd., 2019). Ayrıca bu proteinler, *S. aureus*'un epitelyal ve endotelyal hücre hatları ile fibroblastlar tarafından endositik alımını kolaylaştırmaktadır (Yang et al., 2012).

S. aureus, temel olarak *clfa* ve *clfb* genleri tarafından kodlanan ClfA ve ClfB kümeleşme faktörleri ile plazmayı pıhtılaştırabilmektedir. *clfa* geni, 130 kDa moleküler kütleyle sahip olan bir fibrinojen bağlayıcı proteini kodlamaktadır. ClfA ve ClfB, aynı zamanda stafilokok hücrelerinin substratlara bağlanmasına aracılık eder, ancak bu yapışma mekanizmalarının patofizyolojik önemi tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Ayrıca adezinleri kodlayan genler arasında laminin, fibrinojen ve fibronektin bağlayıcı genler en yaygın olarak tanımlanan genlerdir (Kot et al., 2016).

2.2.4.6. Eksfoliyatif Toksinler (ET)

ET'ler, bir dezmozomal hücre içi adhezyon molekülü olan dezmozoglein 1'i (Dsg1) spesifik olarak parçalayan glutamata özgü serin proteazlardır. Stafilokokal eksfoliyatif toksinler (SET), yüzeyel epidermiste bitişik keratinositler arasında ve mukoza zarlarında kohezyon kaybına neden olmaktadır. Bu toksinler, epidermise

zarar vererek, etkenin daha derin dokulara yayılmasını (invazyon) kolaylaştırmaktadır. Bu tür hasarlar, küçük lokalize kabarcıklardan, koruyucu antitoksinlerin varlığına veya yokluğuna bağlı olarak vücut yüzeyinde pul pul dökülmeye kadar geniş etkili olabilmektedir (Mohseni et al., 2018). ET üreten *S. aureus* suşları insanlarda Ritter hastalığı ve büllöz impetigo gibi hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Endo et al., 2003).

ET'ler, insanlardan izole edilmiş *S. aureus* tarafından üretilen üç izoforma (ETA, ETB ve ETD) sahiptir. ETA ve ETB aynı biyolojik aktiviteye ve bir dereceye kadar genetik benzerliğe sahip olmasına rağmen, ETA'yı kodlayan gen (*eta*) kromozomal iken, ETB'yi kodlayan gen (*etb*) 42 kb'lik bir plazmid ile ilişkilidir (Karahan vd., 2009).

ET'lerin üç izoformundan ETA ve ETB, stafilokokal haşlanmış deri sendromunun (SHDS) başlıca nedenidir. Bununla birlikte, *S. aureus*'un ETD üreten suşları, çoğunlukla *eta* veya *etb* genlerini barındıran *S. aureus* suşlarının neden olduğu diğer deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarından izole edilmiştir. ET'lerin SHDS dışında çok çeşitli deri enfeksiyonların patogenezisindeki rolleri gösterilmiştir. Bu sendromun sınırlı ve yaygın olarak adlandırılan iki formu bulunmaktadır. Sınırlı formda toksin lokal olarak üretilirken, yaygın formda, genellikle etkenin kolonize olduğu bölgeden uzak bölgelere toksin iletimi söz konusudur. Kan dolaşımına giren toksinler, antikor eksikliği ve renal klirensteki yetersizlik nedeniyle epidermise kadar ulaşabilir.

S. aureus izolatlarının yaklaşık %5'inin ET ürettiği bilinmektedir. İzolatlardaki *eta*, *etb* ve *etd* genlerini hızlı ve spesifik bir şekilde tanımlamak amacıyla pek çok PCR tekniği kullanılmaktadır (Mohseni et al., 2018).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.2. Materyal

3.2.1. *Staphylococcus aureus* İzolatları

Çalışmanın materyalini Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında mastitisli sığırlardan izole edilen ve Anabilim Dalı kültür koleksiyonunda bulunan 140 stafilokok izolatu oluşturdu.

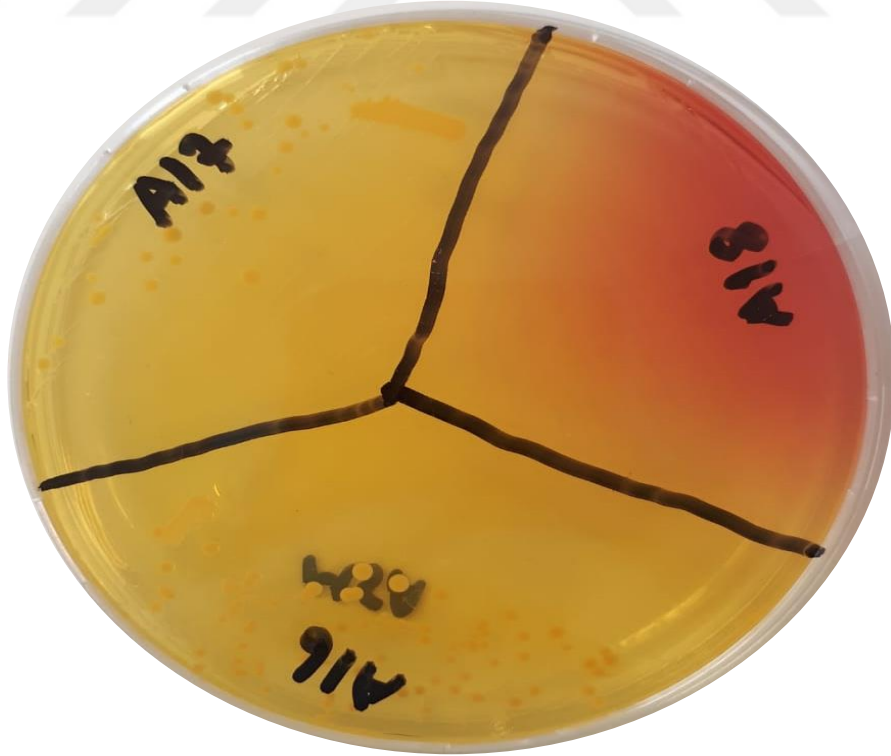
3.2.2. Kullanılan Besi Yerleri

Çalışmada izolatların izolasyon ve identifikasyonu için Mannitol Salt Agar (MSA), Tryptic Soy Agar (TSA) ve kanlı agar kullanıldı.

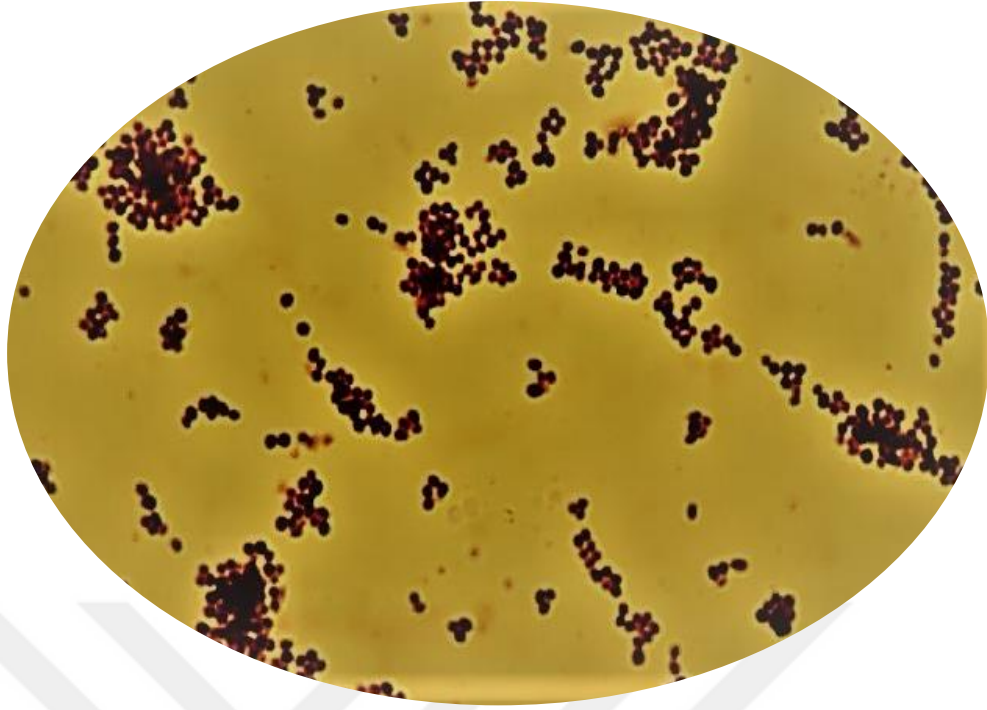
3.3. Yöntem

3.3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon

S. aureus şüpheli izolatların fenotipik identifikasyonu amacıyla MSA besiyerine ekimler yapıldı. Besi yerleri 37 °C’de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda sarı renkli koloniler mannitol pozitif, pembe koloniler mannitol negatif olarak değerlendirildi (Şekil 3.1.). Mannitol pozitif koloniler TSA’ya ekilerek saflaştırıldı. Gram boyama (Şekil 3.2.), katalaz, koagülaz testleri ile fenotipik identifikasyon gerçekleştirildi.



Şekil 3.1. MSA’da mannitol pozitif (sarı) ve mannitol negatif (pembe) *S. aureus* kolonileri



Şekil 3.2. Gram pozitif kok (*S. aureus*, 100x)

3.3.2. Moleküler İdentifikasyon

3.3.2.1. DNA Ekstraksiyonu

İzolatlardan bakteriyel DNA eldesi için kaynatma yöntemi kullanıldı. Bu amaçla, saf kültürden 4 koloni seçilerek 200 µl steril su içerisinde süspanse edildi. Örnekleri içeren süspansiyonlar 100°C’de 15 dakika kaynatıldı, 10.000 g’de 10 dakika santrifüj sonrası elde edilen süpernatant kalıp DNA olarak kullanılmak üzere -20°C’de saklandı (Ren et al., 2020).

3.3.3. *S.aureus* İzolatlarının Tür Düzeyinde İdentifikasyonu

İzolatların *S. aureus* olarak identifikasyonlarının doğrulanması amacıyla *S. aureus* spesifik *nuc* geni için PCR yapıldı (Sezener vd., 2019). Bu amaçla 25 µl’lik bir PCR karışımı, DEPC-treated water, 1X PCR solüsyonu, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM her bir dNTP, 1.0 U Taq DNA polimeraz, 0.04 µM primer (nuc 1, GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT; nuc 2, AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC) ve 5 µl template DNA kullanıldı. PCR karışımları 94°C’de 5 dk ön denatürasyonu takiben 94°C’de 1 dk denatürasyon, 58°C’de 30 saniye primer bağlanma, 72°C’de 90 dk uzama olmak üzere 35 siklus ve 72°C’de 10 dk son uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu. Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2µg/ml) içeren %1,5’lik agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör

(Vilber Lourmat) ile görüntüledi. Görüntüleme sonrasında *nuc* geni için 279 bp'lik bir bantın görülmesi *S. aureus*'un göstergesi olarak kabul edildi.

3.3.4. *Staphylococcus aureus* İzolatlarının Virülens Genlerinin Belirlenmesi

İzolatlarda, mastitisin patogeneziinde rol oynayan bazı önemli virülens genlerinin belirlenmesi amacıyla multiplex PCR (mPCR) çalışmaları yapıldı. Lökotoksin geni (*pvl*), stafilokokal klasik enterotoksin genleri (*sea*, *seb*, *sec*), eksfoliyatif toksin genleri (*eta*, *etb*), hemolizin genleri (*hla*, *hly*), adezin faktör genleri (*fnaA*, *fnaB*, *clfA*) ve toksik şok sendrom toksin geni (*tst*) Tablo 3.1., Tablo 3.2. ve Tablo 3.3.'de belirtilen spesifik primerler ve PCR koşulları kullanılarak incelendi. On iki farklı virülens genin tespiti amacıyla her biri 4 gen içeren 3 mPCR kullanıldı. *pvl*, *etb*, *sea* ve *clfA* genleri için mPCR 1, *sec*, *tst*, *seb* ve *eta* genleri için mPCR 2 ve *fnaB*, *fnaA*, *hla* ve *hly* genleri için mPCR 3 protokolü oluşturuldu. mPCR çalışmaları Li vd., (2018)'nin bildirdiği metodun modifikasyonu ile gerçekleştirildi. PCR koşulları: 94°C'de 5 dakika ilk denatürasyon, 94°C'de 30 saniye denatürasyon, her gen için spesifik primer bağlanma (annealing) ısısında (55-56°C) 45 saniye, 72 °C'de benzer şekilde spesifik uzama zamanında 30 siklus, son uzama 72°C'de 10 dakika olacak şekilde gerçekleştirildi. Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2µg/ml) içeren %1.5'lik agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntüledi.

Tablo 3.1. *pvl*, *etb*, *sea* ve *clfa* genleri için mPCR 1

Gen	Primer	Nükleotid sekans (5'–3')	Ürün (bp)	Annealing ısısı	Miktar(μl)	
pvl	PVL-F	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA	433	55°C	0.2	
	PVL-R	GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC				
etb	ETB-F	CAGATAAAGAGCTTTATACACACATTAC	612		55°C	0.2
	ETB-R	AGTGAACCTTATCTTTCTATTGAAAAACACTC				
sea	SEA-F	GAAAAAAGTCTGAATTGCAGGGAACA	560			55°C
	SEA-R	CAAATAAATCGTAATTAACCGAAGGTTC				
clfa	CLFA-F	ATTGGCGTGGCTTCAGTGCT	292	55°C	0.1	
	CLFA-R	CGTTTCTTCCGTAGTTGCATTTG				
Master mix					12.5	
Steril distile su					8.7	
Template DNA					2	
Toplam hacim					25	

Tablo 3.2. *sec*, *tst*, *seb* ve *eta* genleri için mPCR 2

Gen	Primer	Nükleotid sekans (5'–3')	Ürün (bp)	Annealing ısısı	Miktar(μl)
sec	SEC-F	GTAAAGTTACAGGTGGCAAAACTTG	297	56°C	1
	SEC-R	CATATCATACCAAAAAGTATTGCCGT			
tst	TST-F	TTCACTATTTGTAAAAGTGTGACACCCACT	180		1
	TST-R	TACTAATGAATTTTTTTTATCGTAAGCCCTT			
seb	SEB-F	ATTCTATTAAGGACACTAAGTTAGGGA	404	0.2	
	SEB-R	ATCCCGTTTCATAAGGCGAGT			
eta	ETA-F	CGCTGCGGACATTCTACATGG	676	0.4	
	ETA-R	TACATGCCCGCCACTTGCTTGT			
Master mix					25
Steril distile su					17.8
Template DNA					2
Toplam hacim					50

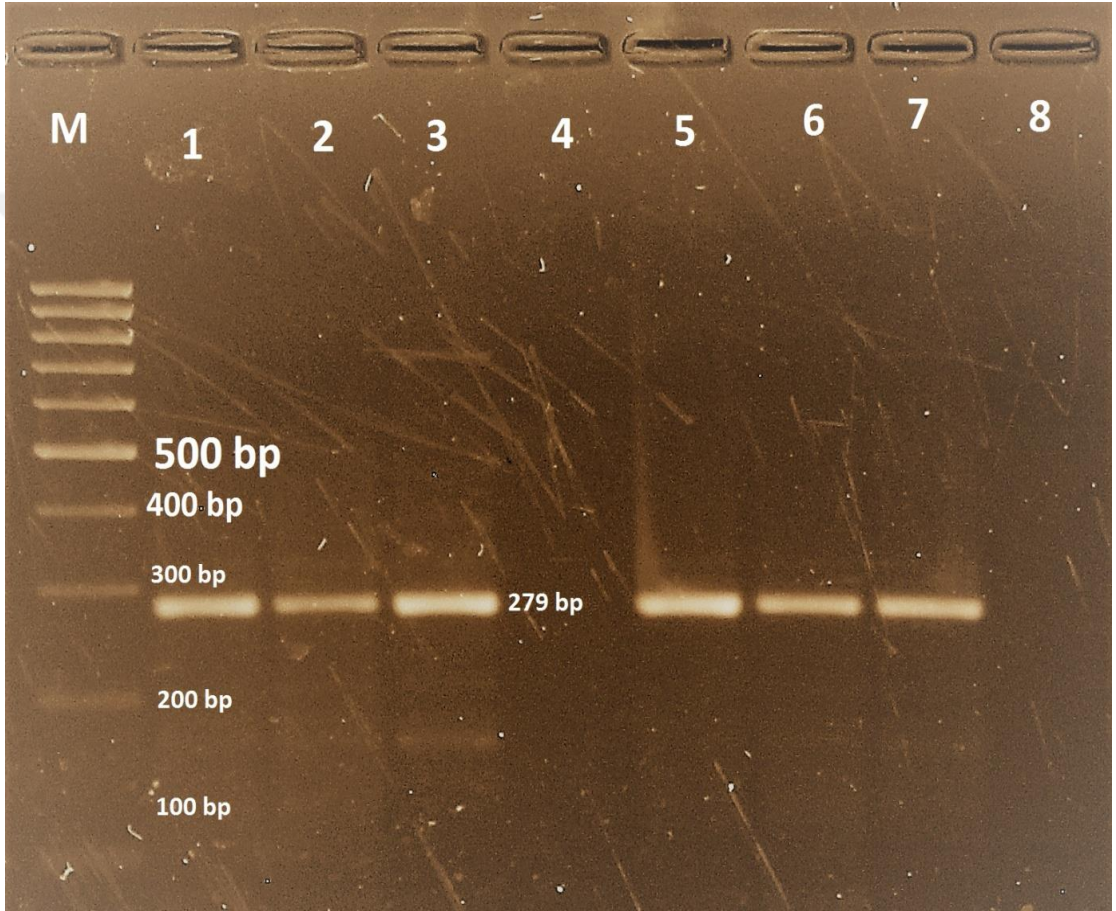
Tablo 3.3. *fnbB*, *fnbA*, *hla* ve *hly* genleri için mPCR 3

Gen	Primer	Nükleotid sekans (5'–3')	Ürün (bp)	Annealing ısısı	Miktar(μl)
<i>fnbA</i>	FNBA-F FNBA-R	GTGAAGTTTTAGAAGGTGGAAAGATTAG GCTCTTGTAAGACCATTTTTCTTCAC	643	56°C	0.4
<i>fnbB</i>	FNBB-F FNBB-R	GTAACAGCTAATGGTCGAATTGATACT CAAGTTCGATAGGAGTACTATGTTC	524		0.4
<i>hla</i>	HLA-F HLA-R	CTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTG CTTCCAGCCTACTTTTTTATCAGT	209		0.4
<i>hly</i>	HLB-F HLB-R	GTGCACTTACTGACAATAGTGC GTTGATGAGTAGCTACCTTCAGT	309		0.4
Master mix					12.5
Steril distile su					7.3
Template DNA					2
Toplam hacim					25

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. *S. aureus* İzolatlarında *nuc* Geni Hedefli PCR Sonuçları

Mevcut *S. aureus* izolatlarının genotipik identifikasyonunun belirlenmesi için toplam 140 stafilokok izolatının termonükleaz (*nuc*) geni varlığı PCR ile incelendi. *nuc* genine spesifik primerle yapılan PCR sonrasında, 42 izolatta 279 bp'lik PCR ürünü elde edilip izolatların *S. aureus* oldukları belirlendi (Şekil 4.1.).



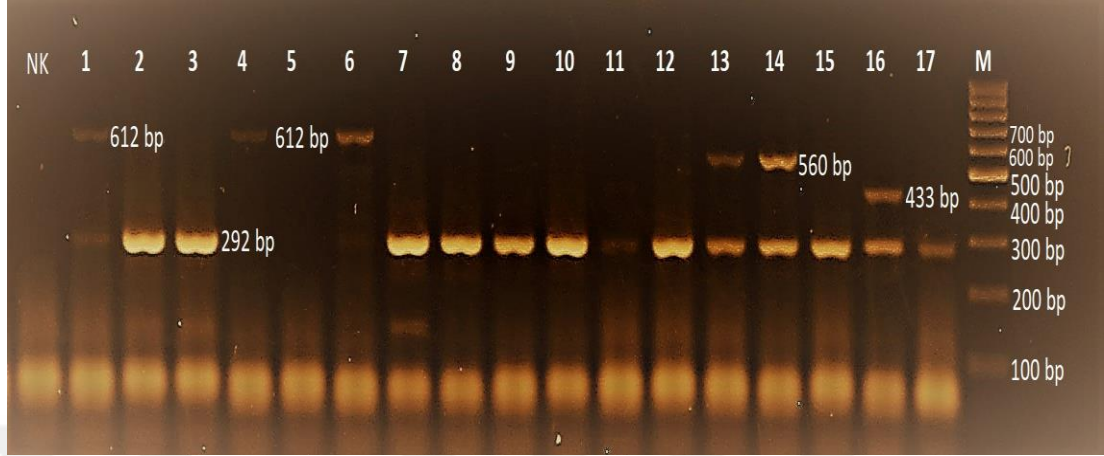
Şekil 4.1. *S. aureus* izolatlarının *nuc* geni sonuçları

M: Marker (100 bp Fermentas); 1,2,3,5,6,7: *nuc* geni pozitif (279 bp) örnekler; 4: Negatif örnek; 8: Negatif kontrol (DNase-RNase free PCR suyu)

4.2. *S. aureus* İzolatlarında Virülens Gen Profili

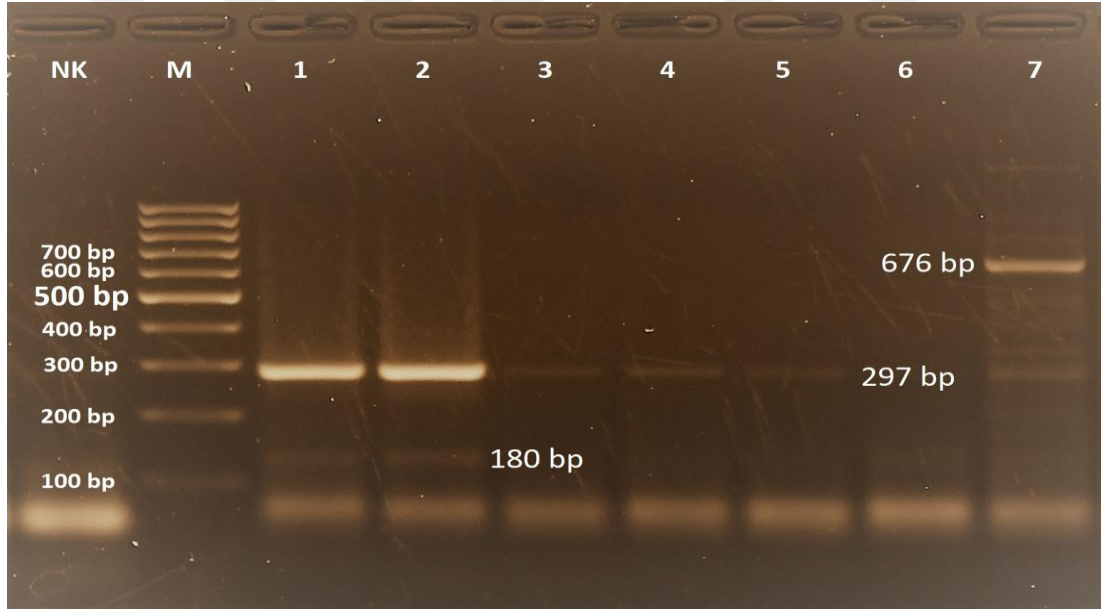
Bu çalışmada *nuc* geni ile *S. aureus* oldukları doğrulanmış 42 izolatın lökotoxin geni (*pvl*), stafilokokal klasik enterotoksin genleri (*sea*, *seb*, *sec*), eksfoliyatif toksin genleri (*eta*, *etb*), hemolizin genleri (*hla*, *hly*), adezin faktör genleri (*fnaA*, *fnaB*, *clfa*) ve toksik şok sendrom toksin geni (*tst*) varlığı 3 farklı mPCR ile incelendi. *pvl*, *etb*, *sea* ve *clfa* genlerine ait mPCR 1 sonuçları Şekil 4.2., *sec*, *tst*, *seb*

ve *eta* genleri için mPCR 2 sonuçları Şekil 4.3. ve *fnbB*, *fnbA*, *hla* ve *hly* genleri için mPCR 3 sonuçları Şekil 4.4.'de gösterildi.



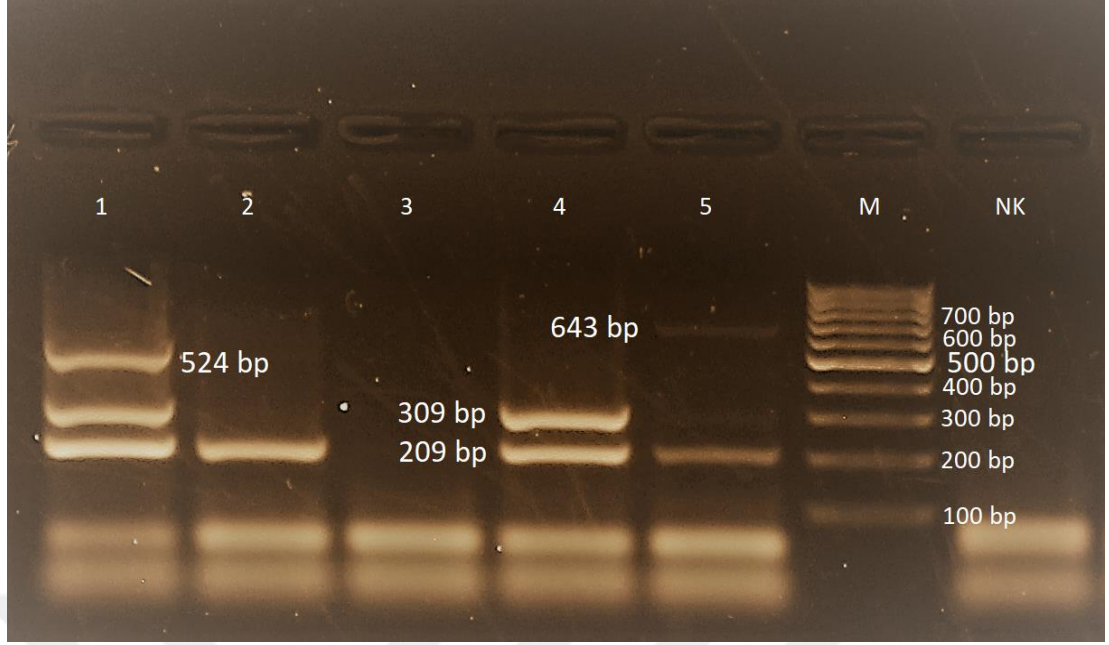
Şekil 4.2. *pvl*, *etb*, *sea* ve *clfa* genlerine ait mPCR 1 sonuçları

M: Marker (100 bp Fermentas); NK: Negatif kontrol (DNase-RNase free PCR suyu); 1: *clfa* ve *etb* genleri (292 bp ve 612 bp) pozitif örnekler; 2,3,7,8,9,10,11,12,15,17: *clfa* geni (292 bp) pozitif örnekler; 4 ve 6: *etb* geni (612 bp) pozitif örnekler; 5: tüm genler (*pvl*, *etb*, *sea* ve *clfa*) açısından negatif örnek; 13 ve 14: *clfa* ve *sea* genleri (292 bp ve 560 bp) pozitif örnekler; 16: *clfa* ve *pvl* genleri (292 bp ve 433 bp) pozitif örnek



Şekil 4.3. *sec*, *tst*, *seb* ve *eta* genleri için mPCR 2 sonuçları

M: Marker (100 bp Fermentas); NK: Negatif kontrol (DNase-RNase free PCR suyu); 1,2: *sec* ve *tst* genleri (297 bp ve 180 bp) pozitif örnekler; 3,4,5: *sec* geni (297 bp) pozitif örnek; 6: *eta* geni (676 bp) pozitif örnek; 7: tüm genler (*sec*, *tst*, *seb* ve *eta*) açısından negatif örnek



Şekil 4.4. *fnbB*, *fnbA*, *hla* ve *hla* genleri için mPCR 3 sonuçları

M: Marker (100 bp Fermentas); NK: Negatif kontrol (DNase-RNase free PCR suyu); 1: *hla* (209 bp), *hla* (309 bp) ve *fnbB* (524 bp) genleri pozitif örnek; 2: *hla* (209 bp) pozitif örnek; 3: tüm genler (*fnbB*, *fnbA*, *hla* ve *hla*) açısından negatif örnek; 4: *hla* (209 bp) ve *hla* (309 bp) genleri pozitif örnek; 5: *hla* (209 bp) ve *fnbA* (643 bp) genleri pozitif örnek

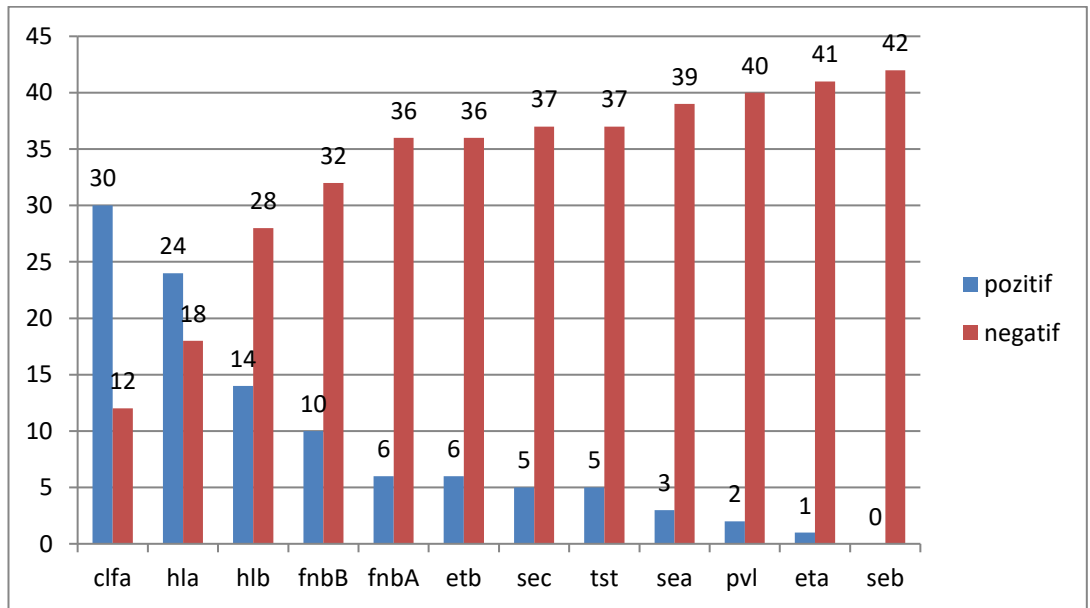
İzolatların 30 (%71,4)'unda *clfa*, 24 (%57,1)'ünde *hla*, 14 (%33,3)'ünde *hla*, 10 (%23,8)'unda *fnbB*, 6 (%14,2)'sında *fnbA*, 6 (%14,2)'sında *etb*, 5 (%11,9)'inde *sec*, 5 (%11,9)'inde *tst*, 3 (%7,1)'ünde *sea*, 2 (%4,7)'sinde *pvl* ve 1 (%2,3)'inde *eta* geni tespit edildi. İzolatların hiçbirinde *seb* geni saptanamadı (Tablo 4.2., Şekil 4.5.). İzolatların 29'unda, 17 farklı virülens gen profilinden oluşan, iki ya da daha fazla virülens gene çoğul pozitiflik belirlendi (Tablo 4.3.).

Tablo 4.2. *S. aureus* izolatlarında belirlenen virülens genlerin dağılımı

İzolat no	Virülens Genleri											
	<i>clfa</i>	<i>hla</i>	<i>hla</i>	<i>fnbB</i>	<i>fnbA</i>	<i>etb</i>	<i>sec</i>	<i>tst</i>	<i>sea</i>	<i>pvl</i>	<i>eta</i>	<i>seb</i>
1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
6	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
7	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
8	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
11	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
12	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
13	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
14	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tablo 4.2. (devam)

İzolot no	Virülens Genleri											
	<i>clfa</i>	<i>hla</i>	<i>hly</i>	<i>fnbB</i>	<i>fnbA</i>	<i>etb</i>	<i>sec</i>	<i>tst</i>	<i>sea</i>	<i>pvl</i>	<i>eta</i>	<i>seb</i>
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
18	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
20	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
22	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
27	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
28	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
32	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
33	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
34	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
37	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
39	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
40	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
42	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Toplam	30	24	14	10	6	6	5	5	3	2	1	0
%	71.4	57.1	33.3	23.8	14.2	14.2	11.9	11.9	7.1	4.7	2.3	0

Şekil 4.5. *S. aureus* izolatlarında belirlenen virülens genlerin dağılımı

Tablo 4.3. *S. aureus* izolatlarında belirlenen çoğul virülens gen profili

Çoğul Virülens Genler	İzolat sayısı
<i>clfa+hla+hlb+fnbB+etb+tst</i>	1
<i>clfa+hla+hlb+fnbB+fnbA</i>	1
<i>clfa+hla+hlb+fnbA+sea</i>	1
<i>clfa+hla+hlb+fnbB</i>	6
<i>clfa+hla+hlb+pvl</i>	1
<i>clfa+hla+hlb+sea</i>	2
<i>clfa+fnbA+etb</i>	1
<i>clfa+hla+fnbB</i>	2
<i>clfa+hla+tst</i>	2
<i>clfa+hla+fnbA</i>	2
<i>clfa+etb+sec</i>	1
<i>clfa+hla+hlb</i>	2
<i>clfa+hla+pvl</i>	1
<i>clfa+eta</i>	1
<i>clfa+hla</i>	3
<i>fnbA+etb</i>	1
<i>etb+sec</i>	1
Toplam	29

Sığır mastitislerinin etiyolojisinde önemli yer tutan *S. aureus*'un virülens genlerinin ortaya konulması ve patogeneizde önemli rol oynayan faktörlerin karakterizasyonu amacıyla çok sayıda araştırma yapılmıştır.

Fitzgerald et al., (2000) sığır mastitislerinden izole ettikleri 144 *S. aureus* izolatının 107'sinde (%74,3) *clfa* geni tespit etmişlerdir.

Klinik olarak mastitisli sığırlardan farklı ülkelerden izole edilen 462 *S. aureus* izolatında süperantijenik enterotoksinlerin tespiti amacıyla yapılan bir araştırmada (Larsen et al., 2002), izolatların 123'ünde (%26,6) *sec*, 114'ünde (%24,7) *tst*, 12'sinde (%2,6) *sea* ve 4'ünde (%0,9) *seb* geni belirlenmiştir.

Almanya'da mastitisli sığırlarda gerçekleştirilen bir çalışmada (Zschöck and Sommerhauser, 2004) izole edilen 573 *S. aureus* izolatının 53'ünde (%9,3) *sec* ve *tst* geni pozitif bulunmuştur.

Symyt et al. (2005), sığır orijinli 99 *S. aureus* izolatının 19'unda (%19,2) *tst*, 19'unda (%19,2) *sec* ve 6'sında (%6,1) *sed* geni saptamışlardır.

Benzer bir çalışmada (Srinivasan et al., 2006) mastitisli sığır sütlerinden izole edilen 78 *S. aureus* izolatının 20'sinde (%25,6) *tst* geni tespit edilmiştir.

Çek Cumhuriyeti'nde sığır çiğ sütlerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının enterotoksijenik karakterlerini ortaya koymak için yapılan bir araştırmada (Zouharova and Rysanek, 2008) izole edilen 70 izolatın %27,1'inde *sea*, %10'unda

seb ve %1,4'ünde *sec* geni saptanmıştır.

Sığır orijinli *S. aureus* izolatlarında virülens genlerin tespitine yönelik gerçekleştirilen bir çalışmada (Monecke et al., 2007), incelenen 20 izolattan 20'si (%100) α -hemolizin (*hla*), 3'ü (%15) *tst*, *sea*, *sec*, *sed*, 1'i (%5) *seb* genleri açısından pozitif bulunurken, izolatların tamamı *pvl*, *eta* ve *etb* genleri yönünden negatif bulunmuştur.

Başka bir çalışmada (Rall et al., 2008), işlenmemiş ve pastörize süt örneklerinden izole edilen 57 *S. aureus* izolatının 16'sında (%41) *sea*, 8'inde (%20,5) *sec* ve 3'ünde (%7,7) *seb* geni saptanmıştır.

Diğer yandan, Bystron et al., (2009), işlenmemiş sığır sütlerinden izole ettikleri 68 *S. aureus* izolatının 24'ünün (%35) enterotoksijenik olduğunu ve bunların sadece 1'inde *seb* geni saptadıklarını bildirmişlerdir. Ayrıca izolatların tamamının *tst* geni açısından negatif olduğu rapor edilmiştir.

Farklı sığır çiftliklerinde mastitisli hayvanlardan izole edilen toplam 303 *S. aureus* izolatın virülens gen profillerinin belirlenmesine yönelik yapılan bir araştırmada (Graber et al., 2009), izolatların 152'sinde (%50,2) *sea*, 21'inde (%6,9) *sec*, 19'unda (%6,3) *tst* geni açısından pozitiflik saptanmıştır.

Karahan vd., (2009) mastitisli sığır sütlerinden izole ettikleri 27 *S. aureus* izolatının sadece 3'ünde *sec* geni belirlediklerini, izolatların tamamının *sea* geni açısından negatif olduğunu rapor etmişlerdir.

Benzer bir araştırmada (Ikawaty et al., 2010), sığırlardan izole edilen 76 *S. aureus* izolatından 73'ünde (%96) *fnbA*, 33'ünde (%43) *fnbB*, 21'inde (%28) *tst*, 19'unda (%25) *sec*, 16'sında (%21) *clfA* geni belirlenirken, izolatların hiçbirinde *eta*, *etb* ve *pvl* genleri saptanamamıştır.

Piccinini et al., (2010), mastitisli sığırlardan izole ettikleri 33 *S. aureus* izolatının hiçbirinde *pvl*, *tst*, *sea*, *seb*, *sec* genlerini saptayamadıklarını bildirmişlerdir.

Diğer bir çalışmada (Huber et al., 2011), sığır orijinli 10 *S. aureus* izolatının tamamı *hla* geni açısından pozitif, *sea*, *seb*, *sec* ve *pvl* genleri yönünden negatif bulunmuştur.

Brezilya'da yapılan bir çalışmada (Coelho et al., 2011), subklinik mastitisli

sığır sütlerinden izole edilen 50 *S. aureus* izolatının 12'sinde (%24) *hla*, 8'inde (%16) *hnb* geni belirlenmiştir.

Sığır mastitislerinden izole edilen 229 *S. aureus* izolatında 39 farklı virülens geninin araştırıldığı bir çalışmada (Ote et al., 2011), *hnb* (%99,1), *hla* (%98,7), *clfa* (%96,9), *clfb* (%96,9), *fnbA* (%83,8), *tst* (%27,5), *sec* (%19,7), *eta* (%18,3), *sea* (%5,2), *seb* (%0,4), *pvl* (%0,4) gibi bazı genlerde yüksek oranlarda pozitiflik tespit edilmiştir.

Başka bir çalışmada sığır sütlerinden izole edilen 50 *S. aureus* izolatların hepsinin *tst1*, *pvl* ve *hnb* genleri açısından negatif, *hla* geni yönünden ise pozitif olduğu bildirilmiştir (Kreusikon et al., 2012).

Yang et al., (2012) sığır klinik mastitislerinden izole ettikleri 39 *S. aureus* izolatında *clfA*, *fnbA*, *fnbB*, *cap5*, *cap8*, *hla*, *hnb*, *nuc*, *sea* ve *tst* genlerinin varlığını araştırmışlardır. Araştırmada 3 (%7,7) izolatta tek toksin geni, 3 (%7,7) izolatta iki toksin geni, 2 (%5,1) izolatta dört toksin geni, 8 (%20,5) izolatta beş toksin geni ve 23 (%59) izolatta altı farklı toksin geni tespit edilmiştir. Hedef genler arasında en yaygın genlerin *fnbA* (%97), *hla* (%85) ve *hnb* (%82) olduğu tespit edilmiştir. Diğer yandan izolatların hiçbirinde *fnbB* ve *sea* geni saptanamadığı bildirilmiştir. Araştırmacılar *S. aureus* kökenli sığır mastitislerinin patogeneğinde bu genlerin önemli rol oynadığını ifade etmişlerdir.

Brezilya'da gerçekleştirilen bir çalışmada (Silva et al., 2013), sığır mastitisi orijinli metisiline duyarlı *S. aureus* izolatlarının tamamı *pvl*, *tst*, *eta*, *etb*, *hnb* ve *sea* genleri açısından negatif bulunmuştur.

Mastitisli sığır sütlerinden izole edilen *S. aureus* izolatının enterotoksijenik özelliklerinin tespiti amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada (Guimarães et al., 2013) 90 izolatın 10'u (%11,1) *sea*, 6'sı (%6,7) *seb*, 5'i (%5,6) *sec* ve 2'si (%2,2) de *sed* geni açısından pozitif bulunmuştur.

Wang et al., (2014) mastitisli sığırlardan izole ettikleri 53 *S. aureus* izolatının 40'ında (%75,5) *pvl* geni saptamıştır. Araştırılan izolatların hiçbirinde *tst* geni bulunamamıştır.

Cremonesi et al., (2015), mastitisli sığırlardan izole ettikleri 54 *S. aureus* izolatının 21'inde (%38,9) *sea* geni belirlediklerini, izolatların tamamının *tsst*, *eta*, *etb*, *seb* genleri açısından negatif olduğunu rapor etmişlerdir.

Benzer bir araştırmada (Rola et al., 2015), çiğ sığır sütünlerinden izole edilen 71 *S. aureus* izolatının hiçbirinde *seb* ve *sec* geni saptanamadığı bildirilmiştir.

Sığır sütünlerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarında klasik enterotoksin ve toksik şok sendromu toksin genlerinin tespiti amacıyla iki farklı mPCR protokolü kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada (Seyoum et al., 2016), 109 izolatın 73'ünün (%66,9) en az bir tip *S. aureus* enterotoksin geni (SE) taşıdığı tespit edilmiştir. Araştırmada, SE genlerinden en az birini barındıran 73 *S. aureus* izolatının 26'sında (%35,6) birden fazla enterotoksin geni saptanmıştır. Belirlenen genlerin *sea* (40; %36,7), *seb* (19; %17,4), *see* (18; %16,5), *tst* (16; %14,7), *sec* (12; %11,1) ve *sed* (7; %6,4) olduğu bildirilmiştir.

Xu et al., (2015) subklinik mastitisli sığır sütünlerinden izole ettikleri 28 *S. aureus* izolatının %89,3'ünün *clfa*, %75'inin *fnbB*, %7,1'inin *sea* ve %2,6'sının *seb* geni açısından pozitif olduğunu rapor etmişlerdir.

Cosandey et al., (2016) mastitisli sığır sütünlerinden izole ettikleri 216 *S. aureus* izolatının 42'sinde (%19,4) *sea*, 36'sında (%16,7) *sec*, 39'unda (%18,1), *tst* geni yönünden pozitiflik tespit etmişlerdir.

Sığır mastitislerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının genotiplendirilmesi amacıyla gerçekleştirilen bir araştırmada (Artursson et al., 2016) çok yüksek oranlarda *hla*, *hly*, *clfa*, *clfb*, *fnbA* ve *fnbB* gibi virölens genleri belirlenmiştir.

Wang et al., (2017), sığır mastitislerinden izole ettikleri *S. aureus* izolatlarında süperantijenik toksin genlerinin belirlenmesine yönelik gerçekleştirdikleri araştırmada, inceledikleri 25 izolatın 7'sinde (%28) *tst*, *etb*, 6'sında (%24) *eta*, 3'ünde (%12) *seb*, *sec*, *sed*, 2'sinde (%8) *sea* geni saptamışlardır. Araştırmacılar izolatların tamamının *pvl* geni açısından negatif olduğunu bildirmişlerdir.

Çin'de çiğ sütünlerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının karakterizasyonu amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada (Liu et al., 2017), 54 izolatın 12'si (%22,2) *sec*, 8'i (%14,8) *sea*, *pvl*, *tst*, 3'ü (%5,6) *seb*, 1'i *eta* genleri açısından pozitif bulunmuştur. Diğer yandan test edilen izolatların hiçbirinde *etb* genine rastlanılamamıştır.

Zhang et al., (2018), Çin'de sığır mastitislerinden izole ettikleri 103 *S. aureus* izolatının 99 'unda (%96) *clfa*, 97'sinde (%94) *fnbA*, 93'ünde (%90) *hla*, 88'inde (%85) *fnbB*, 82'sinde (%80) *hly*, 31'inde (%30) *tst*, 22'sinde (%21) *sec* ve 5'inde

(%5) *seb* geni belirlemişlerdir. Araştırmacılar izolatların hiçbirinde *sea* geni saptayamadıklarını bildirmişlerdir.

Farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda (Piccinini et al., 2010; Ote vd., 2011; Xu et al., 2015) mastitisli sığırlardan izole edilen *S. aureus* izolatlarında *eta* ve *etb* genlerinin belirlenemediği rapor edilmiştir.

Rusya’da gerçekleştirilen bir araştırmada (Fursova et al., 2018) 60 sığır mastitisi *S. aureus* izolatının 42’si (%70) *hla*, 32’si (%53,3) *sea*, 30’u (%50) *sec*, 28’i (%46,6) *pvl-lucS*, 2’si (%3,3) *seb*, 1’i (%1,6) *tst* geni bakımından pozitif bulunmuştur.

Costa et al., (2018) mastitisli sığırlardan izole ettikleri 38 *S. aureus* izolatının %7,89’unda *seb*, %5,26’sında *sec* ve %26,31’inde *tst* geni tespit etmişlerdir.

Çin’de yapılan bir araştırmada (Wang et al., 2009), subklinik mastitisli sığırlardan izole edilen 283 *S. aureus* izolatının 102’sinde (%36) *sea*, 53’ünde (%18,7) *sec*, 34’ünde (%12) *tst-1* ve 6’sında *seb* geni saptanmıştır.

Rall et al., (2014), *sea* tespit oranının sığır mastitis orijinli *S. aureus* izolatlarında %23,6 olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar izolatların 2’sinde *sec* geni belirlemişlerdir.

Polonya’da gerçekleştirilen bir çalışmada (Kot et al., 2016), subklinik mastitisli sığırlardan izole edilen 124 *S. aureus* izolatında adezin, proteaz ve süperantijenik toksinleri kodlayan 30 virülens geni PCR ile araştırılmıştır. İzolatların %50,3’ü *fnbB*, %14,5’i *fnbA*, %6,5’i *sec*, %5,6’sı *eta*, %4,5’i *sea*, %2,4’ü *seb* ve %2,4’ü *tst* genleri yönünden pozitif bulunmuştur. Diğer yandan izolatların hiçbirinde *etb* geni saptanamamıştır.

Benzer bir araştırmada (Grispoldi et al., 2019) sığır mastitis izolatı 17 *S. aureus*’un 6’sı (%35,3) *sea*, 1’i (%5,9) *seb*, *sec* geni açısından pozitif bulunmuştur.

Diğer yandan enterotoksinler ve hemolizinlerin mastitislerin patogeneğinde önemli roller üstlendikleri bilinmektedir. Wang et al., (2016), sığır mastitislerinden izole ettikleri *S. aureus* izolatlarında çok yüksek oranda (%94) *hla* geni pozitifliği belirlemişlerdir.

Mastitis oluşumunda patogeneşte önemli rol oynayan diğer genler arasında clumping faktör (*clfA*, *clfB*), fibrinolektin bağlayan proteinler (*fnbA*, *fnbB*) yer

almaktadır.

Klein et al., (2012) sığır mastitisi orijinli *S. aureus* izolatlarında *clfB* (%98), *fnBP* (%63,5), *clfA* (%50,6), genleri açısından değişken oranlarda pozitiflik bildirmiştir.

Başka bir araştırmada (Bar-Gal et al., 2015), 54 *S. aureus* izolatının 44'ünde (%81,5) *fnbB*, 6'sında (%11,1) *tst1*, 5'unda (%9,2) *entC* geni tespit edilmiştir.

Benzer bir çalışmada (Pereyra et al., 2016), tüm izolatlarda (%100) adhezyon genleri *clfA*, *clfB*, *fnbA* belirlenmiş ve *S. aureus*'un sığırlarda mastitis oluşturmada bu faktörlerin önemli olduğu kanısına varılmıştır.

Ronco et al., (2018), klinik mastitisli sığırlardan izole ettikleri 63 *S. aureus* izolatının tamamının (%100) *hla*, *hly*, 3'ünün (%4,8) *sea*, 2'sinin (%3,2) *sec*, *tst* genleri açısından pozitif olduğunu rapor etmişlerdir.

Fibronektin, yüksek moleküler ağırlıklı bir glikoproteindir ve integrinler olarak adlandırılan hücre zarı proteinlerine bağlanan, aynı zamanda fibrin ve kollajene bağlanabilen hücre dışı matrisin bir bileşenidir. Fibronektin bağlayıcı protein (*fnbA* ve *fnbB* genleri) meme bezindeki bakterilerin invazyonuna ve adezine katkıda bulunur, ayrıca fagositozu inhibe eder (Ikawaty et al., 2010). Bu protein genleri mastitisli sığırlardan izole edilen *S. aureus* izolatlarında çok yüksek seviyelerde belirlenmiştir (Kumar vd., 2011).

Brezilya'da yapılan bir araştırmada (Zuniga et al., 2015) subklinik mastitisli sığırlardan izole edilen 19 *S. aureus* izolatından 16'sı (%84,2) *fnbA* ve 3'ü (%15,8) *fnbB* pozitif bulunmuştur.

Rusya'da gerçekleştirilen bir araştırmada (Fursova et al., 2020) sığır çiğ süt örneklerinden izole edilen 21 *S. aureus* izolatının tamamı *sea* ve *see* enterotoksin geni ve *lukS/F* geni açısından negatif bulunmuştur. Diğer yandan tüm izolatlarda hemolizin (*hla*, *hly*, *hlg* ve *hld*) ve *eta* genleri saptanmıştır. Ayrıca, izolatların 17'sinde (%80,9) *lukE/D*, 9'unda (%42,8) *fnbA* ve *fnbB*, 1'inde (%4,7) *lukM/F* geni tespit edilmiştir.

Son yıllarda yapılan bir araştırmada (Yang et al., 2020) subklinik mastitisli sığır sütlerinden izole edilen 73 MRSA izolatının tamamında *fnbpA*, *clfA*, *clfB* ve *hla* genleri saptanmıştır. Ayrıca izolatların %97,3'ünde *lukE-lukD* ve %71,2'sinde *sea*

genleri tespit edilmiştir.

Güncel bir çalışmada (Kotzamanidis et al., 2021) klinik mastitisli sığırlardan izole edilen 36 *S. aureus* izolatından 16 (%44,4)'sı *sec*, 12 (%33,3)'si *seb* ve 1 (%2,8)'i *tst* geni açısından pozitif bulunmuştur. Diğer yandan izolatların hiçbirinde *pvl* geni saptanamamıştır.

Konuyla ilgili farklı ülkelerde sığır mastitis vakalarından izole edilen *S.aureus* izolatlarında virülens genlerin tespitine yönelik yapılan çalışmalarda patogeneizde rol oynayan faktörlerin çok değişken olduğu ortaya konulmuştur. Bazı çalışmalarda primer olarak belirlenen genlerin *clfa* ve *hla* olduğu görülmektedir. Bu çalışmada incelenen *S. aureus* izolatlarında belirlenen en önemli virülens genlerinin *clfa* ve *hla* olması literatür verileriyle paralellik göstermektedir. Araştırma verileri arasındaki farklılıklar bölgesel, metodik, izolat sayısı ve çeşitliliği, popülasyon yapısı gibi bir çok faktöre bağlı şekillenebilmektedir. Diğer yandan pek çok araştırma verilerinde sunulduğu gibi, sığır mastitislerinin oluşumuna katılan *S. aureus* izolatlarının farklı virotiplere sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle sığır mastitislerinin etiyolojisini detaylı bir şekilde ortaya koymak için, daha kapsamlı epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Böylece sığır mastitislerin önlenmesinde koruyucu aşılama programları ve daha kapsamlı aşı içeriklerinin hazırlanması mümkün olabilecektir.

5. SONUÇ

Bu çalışmada sığır mastitislerinden izole edilen stafilocok izolatlarında *S. aureus* yönünden *nuc* geninin varlığı incelendi. Araştırılan 140 izolatın 42'sinde *nuc* geni tespit edildi. İzolatlar 12 farklı virülens geni açısından mPCR ile incelendi. 42 *S. aureus* izolatının 38'inde bir ya da daha fazla virülens geni belirlenirken, 4 izolatta incelenen virülens genlerin hiçbirisi saptanamadı. İncelenen izolatlarda en fazla tespit edilen virülens genlerin *clfa* ve *hla* olduğu görüldü. İzolatların 29'unda iki ya da daha fazla virülens gen açısından çoğul pozitiflik belirlendi. Çoğul pozitiflik belirlenen izolatların 6'sının 4 gen (*clfa+hla+hlb+fnbB*) açısından birlikte pozitif olduğu görüldü. Diğer yandan bir izolatta 6 (*clfa+hla+hlb+fnbB+etb+tst*), birer izolatta 5 (*clfa+hla+hlb+fnbB+fnbA* ve *clfa+hla+hlb+fnbA+sea*) farklı virülens genin birlikte var olduğu tespit edildi. Araştırılan virülens genleri açısından negatif bulunan izolatlarda mastitis oluşumundan sorumlu başka virülens faktörlerinin var olabileceği düşünüldü.

Sonuç olarak bu çalışma ile, sınırlı dahi olsa sığır mastitislerinin patogenezesinde rol oynayan virülens gen paternleri ortaya konuldu. Çalışma sonuçlarının sığır mastitislerinin etiyolojisinde önemli rol oynayan *S. aureus*'a ait virülens faktörlerinin karakterizasyonu çalışmalarına katkı sağlayacağı kanaatine varıldı. Sığır mastitislerinin önlenmesine yönelik hazırlanacak aşı kompozisyonunun şekillendirilmesinde *S. aureus* virülens gen çeşitliliğinin bilinmesi önem arz etmektedir. Bu nedenle kullanılacak aşının çok sayıda virülens faktörüne sahip suşlardan oluşturulması gerekmektedir. Bu çalışmada incelenen *S. aureus* izolatlarının çoğunun farklı virülens gen profiline sahip olması, izolatların aşı suşu olarak kullanılabilir potansiyelde olduğunu göstermektedir. Ancak izolatların aşı suşu potansiyelinin tam olarak ortaya konulması için ileri seviyede karakterizasyon çalışmaları yapılmalıdır. Sığır mastitislerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının mastitis patogenezesinde rol oynayan virülens gen çeşitliliğinin ortaya konulması amacıyla daha fazla izolat içeren epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- Ahmady, M., Kazemi, S. (2013). Detection of the enterotoxigenic genes (*sei*, *sej*) in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis milk in the West Azerbaijan of Iran. *Comparative Clinical Pathology*. 22. 649-654.
- Antók, F.R., Mayrhofer, R., Marbach, H., Masengesho, J.C., Keinprecht, H., Nyirimbuga, V., Fischer, O., Lepuschitz, S., Ruppitsch, W., Ehling-Schulz, M., Feßler, A.T., Schwarz, S., Monecke, S., Ehricht, R., Grunert, T., Joachim Spargser, J., Loncaric, I. (2020). Characterization of antibiotic and biocide resistance genes and virulence factors of *Staphylococcus* species associated with bovine mastitis in Rwanda. *Antibiotics*. 9(1). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9010001>.
- Artursson, K., Söderlund, R., Liu, L., Monecke, S., Schelin, J. (2016). Genotyping of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis and correlation to phenotypic characteristics. *Veterinary Microbiology*. 193. 156-161.
- Ashraf, A., Imran, M. (2018). Diagnosis of bovine mastitis: from laboratory to farm. *Tropical Animal Health and Production*. 50. 1193-1202.
- Awad, A., Ramadan, H., Nasr, S., Ateya, A., Atwa, S. (2017). Genetic characterization, antimicrobial resistance patterns and virulence determinants of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Pakistan Journal of Biological Science*. 20(6). 298-305.
- Bar-Gal, G.K., Blum, S.E., Hadas, L., Ehricht, R., Monecke, S., Leitner, G. (2015). Host-specificity of *Staphylococcus aureus* causing intramammary infections in dairy animals assessed by genotyping and virulence genes. *Veterinary Microbiology*. 176. 143-154.
- Baran, B., Erdoğan, A., Turgut, T., Adıgüzel, M.C. (2017). A review on the presence of *Staphylococcus aureus* in cheese. *Turkish Journal of Nature and Science*. 6(2). 100-105.
- 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(2). 209-211.
- Bystron, J., Bania, J., Lis, E., Molenda, J., Bednarski, M. (2009). Characterisation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows' milk. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*. 53. 59-63.
- Cantekin, Z., Ergün, Y., Doğruer, G., Sarıbay, M.K., Solmaz, H. (2015). Comparison of PCR and culture methods for diagnosis of subclinical mastitis in dairy cattle. *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*. 21(2). 277-282.
- Coelho, S.M.O., Pereira, I.A., Soares, L.C., Pribul, B.R., Souza, M.M.S. (2011). Short communication: Profile of virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Dairy Science*. 94. 3305-3310.
- Cosandey, A., Boss, R., Luini, M., Artursson, K., Bardiau, M., Breitenwieser, F., Hehenberger, E., Lam, T., Mansfeld, M., Michel, A., Mösslacher, G., Naskova, J., Nelson, S., Podpečan, O., Raemy, A., Ryan, E., Salat, O., Zangerl, P., Steiner, A., Graber, H.U. (2016). *Staphylococcus aureus* genotype B and other genotypes isolated from cow milk in European countries. *Journal of Dairy Science*. 99. 529-540.
- Côté-Gravel, J., Malouin, F. (2019). Symposium review: Features of *Staphylococcus aureus* mastitis pathogenesis that guides vaccine development strategies. *Journal of Dairy Science*. 102(5). 4727-4740.
- Costa, F.N., Belo, N.O., Costa, E.A., Andrade, G.I., Pereira, L.S., Carvalho, I.A. Santos, R.L. (2018). Frequency of enterotoxins, toxic shock syndrome toxin-1, and biofilm

formation genes in *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis in the Northeast of Brazil. *Tropical Animal Health and Production*. 50. 1089-1097.

Cremonesi, P., Pozzi, F., Raschetti, M., Bignol, I.G., Capra, E., Graber, H.U., Vezzoli, F., Piccinini, R., Bertasi, B., Biffani, S., Castiglioni, B., Luini, M. (2015). Genomic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains associated with high within-herd prevalence of intramammary infections in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 98. 6828-6838.

Cruzado-Bravo, M.L.M., Silva, N.C.C., Rodrigues, M.X., Silva, G.O.E., Porto, E., Sturion, G.L. (2019). Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus* spp. isolated from mastitis milk and cheese processing: Study of adherence and biofilm formation. *Food Research International*. 122. 450-460.

Effendi, M.H., Hisyam, M.A.M., Hastutiek, P., Tyasningsih, W. (2019). Detection of coagulase gene in *Staphylococcus aureus* from several dairy farms in East Java, Indonesia, by polymerase chain reaction. *Veterinary World*. 12(1). 68-71.

El-Huneidi, W., Bdour, S., Mahasneh, A. (2006). Detection of enterotoxin genes *seg*, *seh*, *sei*, and *sej* and of a novel *aroA* genotype in Jordanian clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 56. 127-132.

Endo, Y., Yamada, T., Matsunaga, K., Hayakawa, Y., Kaidoh, T., Takeuchi, S. (2003). Phage conversion of exfoliative toxin A in *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis. *Veterinary Microbiology*. 96. 81-90.

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.

Fluit, A.C. (2012). Livestock-associated *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*. 18. 735-744.

Fursova, K.K., Shchannikova, M.P., Loskutova, I.V., Shepelyakovskaya, A.O., Laman, A.G., Boutanaev, A.M., Sokolov, S.L., Artem'eva, O.A., Nikanova, D.A., Zinovieva, N.A., Brovko, F.A. (2018). Exotoxin diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows with subclinical mastitis in Central Russia. *Journal of Dairy Science*. 101. 4325-4331.

Fursova, K., Sorokin, A., Sokolov, S., Dzhelyadin, T., Shulcheva, I., Shchannikova, M., Nikanova, D., Artem'eva, O., Zinovieva, N., Brovko F. (2020). Virulence Factors and Phylogeny of *Staphylococcus aureus* Associated With Bovine Mastitis in Russia Based on Genome Sequences. *Frontiers in Veterinary Science*. 7(135). doi: 10.3389/fvets.2020.00135

Graber, H.U., Naskova, J., Studer, E., Kaufmann, T., Kirchhofer, M., Brechbühl, M., Schaeren, W., Steiner, A., Fournier, C. (2009). Mastitis-related subtypes of bovine *Staphylococcus aureus* are characterized by different clinical properties. *Journal of Dairy Science*. 92. 1442-1451.

Grispoldi, L., Massetti, L., Sechi, P., Iulietto, M.F., Ceccarelli, M., Karama, M., Popescu, P.A., Pandolfi, F., Cenci-Goga, B.T. (2019). Short communication: Characterization of enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. *Journal of Dairy Science*. 102. 1059-1065.

Guimarães, F.F., Nóbrega, D.B., Richini-Pereira, V.B., Marson, P.M., Pantoja, J.C.F., Langoni, H. (2013). Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *Journal of Dairy Science*. 96. 2866-2872.

Huber, H., Giezendanner, N., Stephan, R., Zweifel, C. (2011). Genotypes, antibiotic resistance profiles and microarray-based characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from livestock and veterinarians in Switzerland. *Zoonoses and Public Health*. 58. 343-349.

Ikawaty, R., Brouwer, E.C., van Duijkeren, E., Mevius, D., Verhoef, J., Fluit, A.C. (2010). Virulence factors of genotyped bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates in The Netherlands. *International Journal of Dairy Science*. 5. 60-70.

Jia, F., Ma, W., Zhang, X., Wang, D., Zhou, X. (2019). Matrine and baicalin inhibit apoptosis induced by Panton-Valentine leukocidin of *Staphylococcus aureus* in bovine mammary epithelial cells. *Journal of Dairy Science*. 103(3). <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17619>.

Kane, T.L., Carothers, K.E., Lee, S.W. (2018). Virulence factor targeting of the bacterial pathogen *Staphylococcus aureus* for vaccine and therapeutics. *Current Drug Targets*. 19(2). 111-127.

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 and Disease*. 6. 1029-1035.

Klein, R.C., Klein, M.H.F., Brito, M.A.V.P., Fietto, L.G., Ribon, A.O.B. (2012). *Staphylococcus aureus* of bovine origin: genetic diversity, prevalence and the expression of adhesin-encoding genes. *Veterinary Microbiology*. 160. 183-188.

Kot, B., Szveda, P., Frankowska-Maciejewska, A., Piechota, M., Wolska, K. (2016). Virulence gene profiles in *Staphylococcus aureus* isolated from cows with subclinical mastitis in eastern Poland. *Journal of Dairy Research*. 83. 228-235.

Kotzamanidis, C., Vafeas, G., Giantzi, V., Anastasiadou, S., Mygdalias, S., Malousi, A., Loukia, E., Daniel, S., Zdragas, A. (2021). *Staphylococcus aureus* isolated from ruminants with mastitis in Northern Greece dairy herds: genetic relatedness and phenotypic and genotypic characterization. *Toxins*. 13(176). <https://doi.org/10.3390/toxins13030176>.

Kreusikon, K., Fetsch, A., Kraushaar, B., Alt, K., Müller, K., Krömker, V., Zessin, K.H., Käsbohrer, A., Tenhagen, B.A. (2012). Prevalence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from bulk tank milk of dairy herds. *Journal of Dairy Science*. 95. 4382-4388.

Kumar, R., Yadav, B.R., Anand, S.K., Singh, R.S. (2011). Prevalence of adhesin and toxin genes among isolates of *Staphylococcus aureus* obtained from mastitis cattle. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 27. 513-521.

Lakhundi, S., Zhang, K. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology. *American Society for Microbiology*. 31(4). doi: 10.1128 / CMR.00020-18.

Larsen, H.D., Aarestrup, F.M., Jensen, N.E. (2002). Geographical variation in the presence of genes encoding exotoxins and beta-hemolysin among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and USA. *Veterinary Microbiology*. 85(1). 61-67.

Li, X., Fang, F., Zhao, J., Lou, N., Li, C., Huang, T., Li, Y. (2018). Molecular characteristics and virulence gene profiles of *Staphylococcus aureus* causing bloodstream infection. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 22. 487-494.

Liu, H., Li, S., Meng, L., Dong, L., Zhao, S., Lan, X., Wang, J., Zheng, N. (2017). Prevalence, antimicrobial susceptibility, and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy herds in northern China. *Journal of Dairy Science*. 100. 8796-8803.

Mohseni, M., Rafiei, F., Ghaemi, E.A. (2018). High frequency of exfoliative toxin genes among *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens in the north of Iran: alarm for the health of individuals under risk. *Iranian Journal of Microbiology*. 10(3). 158-165.

Momtaz, H., Tajbakhsh, E., Rahimi, E., Momeni, M. (2011). Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical bovine mastitis in Isfahan and Chaharmahalva Bakhtiari provinces of Iran. *Comparative Clinical Pathology*. 20. 519-522.

Monecke, S., Kuhnert, P., Hotzel, H., Slickers, P., Ehricht, R. (2007). Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle. *Veterinary Microbiology*. 125. 128-140.

Monistero, V., Barberio, A., Biscarini, F., Cremonesi, P., Castiglioni, B., Graber, H.U., Bottini, E., Ceballos-Marquez, A., Kroemker, V., Petzer, I.M., Pollera, C., Santisteban, C., Dos Santos, M.V., Bronzo, V., Piccinini, R., Re, G., Cocchi, M., Moroni, P. (2020). Different distribution of antimicrobial resistance genes and virulence profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical mastitis in six countries. *Journal of Dairy Science*. 103(4). <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17141>.

Musser, J.M., Schlievert, P.M., Chow, A.W., Ewan, P., Kreiswirth, B.N., Rosdahl, V.T., Naidu, A.S., Witte, W., Selander, R.K. (1990). A single clone of *Staphylococcus aureus* causes the majority of cases of toxic shock syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 87. 225-229.

Ote, I., Taminiau, B., Duprez, J.N., Dizier, I., Mainil, J.G. (2011). Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*. 153. 285-292.

Peles, F., Wagner, M., Varga, L., Hein, I., Rieck, P., Gutser, K., Keresztúri, P., Kardos, G., Turcsányi, I., Béri, B., Szabó, A. (2007). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. *International Journal of Food Microbiology*. 118. 186-193.

Pereyra, E.A.L., Picech, F., Renna, M.S., Baravalle, C., Andreotti, C.S., Russi, R., Calvino, L.F., Diez, C., Dallard, B.E. (2016). Detection of *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm-producing genes and their expression during internalization in bovine mammary epithelial cells. *Veterinary Microbiology*. 183. 69-77.

Peton, V., Le Loir, Y. (2014). *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. *Infection, Genetics and Evolution*. 21. 602-615.

Piccinini, R., Borromeo, V., Zecconi, A. (2010). Relationship between *S. aureus* gene pattern and dairy herd mastitis prevalence. *Veterinary Microbiology*. 145. 100-105.

Pichette-Jollette, S., Millette, G., Demontier, E., Bran-Barrera, D., Cyrenne, M., Ster, C., Haine, D., Keefe, G., Malouin, F., Roy, J.P. (2019). Partial prediction of the duration and the clinical status of *Staphylococcus aureus* bovine intramammary infections based on the phenotypic and genotypic analysis of isolates. *Veterinary Microbiology*. 228. 188-195.

Pilla, R., Snel, G.G.M., Malvisi, M., Piccinini, R. (2013). Duplex real-time PCR assay for rapid identification of *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cow milk. *Journal of Dairy Research*. 80. 223-226.

Pumipuntu, N., Tunyong, W., Chantratita, N., Diraphat, P., Pumirat, P., Sookrung, N., Chaicumpa, W., Indrawattana, N. (2019). *Staphylococcus* spp. associated with subclinical bovine mastitis in central and northeast provinces of Thailand. *Peer Journal*. 7. e6587, doi 10.7717/peerj.6587.

Rall, V. L., Vieira, F. P., Rall, R., Vieitis, R. L., Fernandes, A., Candeias, J.M., Cardoso, K.F., Araújo, J.P.J.R. (2008). PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. *Veterinary Microbiology*. 132. 408-413.

Rall, V.L.M., Miranda, E.S., Castilho, I.G., Camargo, C.H., Langoni, H., Guimarães, F.F., Araújo Júnior, J.P., Fernandes Júnior, A. (2014). Diversity of *Staphylococcus* species

and prevalence of enterotoxin genes isolated from milk of healthy cows and cows with subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*. 97. 829-837.

Raza, A., Muhammad, G., Sharif, S., Atta, A. (2013). Biofilm producing *Staphylococcus aureus* and bovine mastitis: A review. *Molecular Microbiology Research*. 3(1). 1-8.

Ren, Q., Liao, G., Wu, Z., Lv, J., Chen, W. (2020). Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from subclinical bovine mastitis in southern Xinjiang, China. *Journal of Dairy Science*. 103(4). 3368-3380.

Rocha, L.S., Silva, D.M., Silva, M.P., Vidigal, P.M.P., Silva, J.C.F., Guerra, S.T., Ribeiro, M.G., Mendes, T.A.O., Ribon, A.O.B. (2019). Comparative genomics of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical and clinical bovine mastitis. *PLoS ONE*, 14(8). e0220804. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220804>.

Rola, J.G., Korpysa-Dzirba, W., Czubkowska, A., Osek, J. (2015). Prevalence of enterotoxin genes and antimicrobial resistance of coagulase-positive staphylococci recovered from raw cow milk. *Journal of Dairy Science*. 98. 4273-4278.

Ronco, T., Klaas, I.C., Stegger, M., Svennesen, L., Astrup, L.B., Farre, M., Pedersen, K. (2018). Genomic investigation of *Staphylococcus aureus* isolates from bulk tank milk and dairy cows with clinical mastitis. *Veterinary Microbiology*. 215. 35-42.

Said, M.B., Abbassi, M.S., Bianchini, V., Sghaier, S., Cremonesi, P., Romanò, A., Gualdi, V., Hassen, A., Luini, M. (2016). Genetic characterization and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk in Tunisia. *Letters in Applied Microbiology*. 63(6). 473-481.

Scarpa, M., Piccinini, R., Brun, P., Grillo, A., Palu, G., Mengoli, C., Dapra, V., Castagliuolo, I., Zecconi, A. (2010). Relationship between virulence factor genes in bovine *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis isolates and binding to anti-adhesin antibodies. *Journal of Dairy Research*. 77. 159-167.

Schabauer, A., Pinior, B., Gruber, C.M., Firth, C.L., Käsbohrer, A., Wagner, M., Rychli, K., Obritzhauser, W. (2018). The relationship between clinical signs and microbiological species, spa type, and antimicrobial resistance in bovine mastitis cases in Austria. *Veterinary Microbiology*. 227. 52-60.

Seyoum, E.T., Mekonene, T.K., Woldetsadik, D.A., Zewudie, B.M., Gebreyes, W.A. (2016). Enterotoxin gene profile of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine milk produced in central Ethiopia. *Journal of Infection in Developing Countries*. 10(2). 138-142.

Sezener, M.G., Findık, A., Ergüden, V.E., Akgöz, S., Gülhan, T., Çiftci, A. (2019). Mastitis izolatu *Staphylococcus aureus* suşlarında antibiyotik dirençliliğinin ve bazı virülens genlerinin araştırılması. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Science*. 4(2). 182-187.

Silva, N.C.C., Guimares, F.F., Manzi, M.P., Budri, M.P., Gomez-Sanz, E., Benito, D., Langoni, H., Rall, V.L.M., Torres, C. (2013). Molecular characterization and clonal diversity of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in milk of cows with mastitis in Brazil. *Journal of Dairy Science*. 96(11). 6856-6862.

Smyth, D.S., Hartigan, P.J., Meaney, W.J., Fitzgerald, J.R., Deobald, C.F., Bohach, G.A., Smyth, C.J. (2005). Superantigen genes encoded by the egc cluster and SaPIbov are predominant among *Staphylococcus aureus* isolates from cows, goats, sheep, rabbits and poultry. *Journal of Medical Microbiology*. 54. 401-411.

Srinivasan, V., Sawant, A.A., Gillespie, B.E., Headrick, S.J., Ceasar, L., Oliver S.P. (2006). Prevalence of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus*

aureus isolated from milk of cows with mastitis. *Foodborne Pathogens and Disease*. 3(3). 274-283.

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.

Şahin, R., Kaleli, İ. (2018). *Staphylococcus aureus* izolatlarında biyofilm üretiminin genotipik ve fenotipik karakterlerinin karşılaştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*. 52(2). 111-122.

Tung, H., Guss, B., Hellman, U., Persson, L., Rubin, K., Ryden, C. (2000). A bone sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*: a member of the staphylococcal Sdr family. *Biochemical Journal*. 345. 611-619.

Ünal, N., Çinar, O.D. (2012). Detection of staphylococcal enterotoxin, methicillin-resistant and Panton–Valentine leukocidin genes in coagulase-negative staphylococci isolated from cows and ewes with subclinical mastitis. *Tropical Animal Health and Production*. 44. 369-375.

Wang, S.C., Wu, C.M., Xia, S.C., Qi, Y.H., Xia, L.N., Shen, J.Z. (2009). Distribution of superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates from milk samples of bovine subclinical mastitis cases in two major dairy production regions of China. *Veterinary Microbiology*. 137. 276-281.

Wang, D., Zhang, L., Zhou, X., He, Y., Yong, C., Shen, M., Szenci, O., Han, B. (2016). Antimicrobial susceptibility, virulence genes, and randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from bovine mastitis in Ningxia, China. *Journal of Dairy Science*. 99. 9560-9569.

Wang, D., Zhang, L., Yong, C., Shen, M., Ali, T., Shahid, M., Han, K., Zhou, X., Han, B. (2017). Relationships among superantigen toxin gene profiles, genotypes, and pathogenic characteristics of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Dairy Science*. 100 (6). 4276-4286.

Wang, X., Wang, X., Wang, Y., Guo, G., Usman, T., Hao, D., Tang, X., Zhang, Y., Yu, Y. (2014). Antimicrobial resistance and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* strains from Holstein milk. *Letters in Applied Microbiology*. 58. 527-534.

Xu, J., Tan, X., Zhang, X., Xiaoli, X., Sun, H. (2015). The diversities of staphylococcal species, virulence and antibiotic resistance genes in the subclinical mastitis milk from a single Chinese cow herd. *Microbial Pathogenesis*. 88. 29-38.

Yang, F.L., Li, X.S., Liang, X.W., Zhang, X.F., Qin, G.S., Yang, B.Z. (2012). Detection of virulence associated genes in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis milk samples in Guangxi. *Tropical Animal Health and Production*. 44. 1821-1826.

Yang, F., Zhang, S., Shang, X., Li, H., Zhang, H., Cui, D., Wang, X., Wang, L., Yan, Z., Sun, Y. (2020). Detection and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis cases in China. *Journal of Dairy Science*. 103. 840-845.

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

Zhang, L., Gao, J., Barkema, H.W., Ali, T., Liu, G., Deng, Y., Naushad, S., Kastelic, J.P., Han, B. (2018). Virulence gene profiles: alpha-hemolysin and clonal diversity in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine clinical mastitis in China. *Veterinary Research*. 14(63). <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1374-7>.

Zouharova, M., Rysanek, D. (2008). Multiplex PCR and RPLA identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains from bulk tank milk. *Zoonoses and Public Health*. 55. 313-319.

Zschöck, M., Riße, K., Sommerhauser, J. (2004). Occurrence and clonal relatedness of *sec/tst*-gene positive *Staphylococcus aureus* isolates of quartermilk samples of cows suffering from mastitis. *Letters in Applied Microbiology*. 38. 493-498.

Zuniga, E., Melville, P.A., Saidenberg, A.B.S., Laes, M.A., Gonsales, F.F., Salaberry, S.R.S., Gregori, F., Brandao, P.E., dos Santos, F.G.B., Lincopan, N.E., Benites, N.R. (2015). Occurrence of genes coding for MSCRAMM and biofilm-associated protein Bap in *Staphylococcus spp.* isolated from bovine subclinical mastitis and relationship with somatic cell counts. *Microbial Pathogenesis*. 89. 1-6.



