

## Subklinik mastitisli inek sütlerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* izolatlarında bazı toksin genleri ve metisilin direnç geninin araştırılması

Nilgün ÜNAL

Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale, Türkiye.

**Özet:** Bu çalışma subklinik mastitisli inek sütlerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* izolatlarında bazı stafilkokal enterotoksin, Panton-Valentine lökositin genleriyle metisilin direnç geninin araştırılması amacıyla yapılmıştır. Araştırmada 60 *S. aureus* izolatu kullanılmış ve genlerin belirlenmesinde polimeraz zincir reaksiyonundan yararlanılmıştır. İzolatların sekizinde (% 13.33) *seg-sei*, altısında (% 10.00) *sej*, dördünde (% 6.67) *sec* ve üçünde (% 5.00) ise *seh* geni belirlenmiştir. Toplam on altı (% 26.67) izolatta bir veya daha fazla enterotoksin geni tespit edilmiştir. İncelenen izolatlarda enterotoksin genlerinden *sea*, *seb*, *sed*, *see* ve *tsst* belirlenemezken dördünde (% 6.6) Panton-Valentine lökositin geni ve ikisinde (% 3.30) metisilin direnç geni belirlenmiştir. Sonuç olarak subklinik mastitisli sütlerde bulunan *S. aureus* izolatlarının enterotoksin üretebilecekleri ve metisilin direnç geni taşıyabilecekleri belirlenmiştir. Bu durum halk sağlığı açısından önemli bir risk oluşturmaktadır.

Anahtar sözcükler: Enterotoksin, İnek, Metisilin direnci, Panton-Valentine Lökositin, *Staphylococcus aureus*.

### Investigation of some toxins genes and methicillin resistance gene in *Staphylococcus aureus* isolates from cows with subclinical mastitis

**Summary:** The aim of this study was to investigate the genes of some staphylococcal enterotoxins and Panton-Valentine leukocidin and methicillin resistance of *Staphylococcus aureus* strains isolated from subclinical bovine mastitis. In this study, 60 *S. aureus* isolates were used and the genes were detected by PCR. *seg-sei*, *sej*, *sec* and *seh* genes were detected in eight (13.33%) isolates, six (10.00%) isolates, four (6.67%) isolates and three (5.00%) isolates, respectively. Sixteen (26.67%) isolates were found to harbor one or more toxin genes. None of the investigated isolates harbored *sea*, *seb*, *sed*, *see*, and *tsst* genes, while four (6.6%) isolates and two (3.30%) isolates had Panton-Valentine leukocidin gene and *mecA* gene, respectively. As a conclusion, it was determined that *S. aureus* strains isolated from cows with subclinical mastitis could produce enterotoxin and harbor *mecA* gene. This situation could be a potential risk factor for public health.

Key words: Cow, Enterotoxin, Methicillin Resistance, Panton-Valentine Leukocidin, *Staphylococcus aureus*

### Giriş

*Staphylococcus aureus* insan ve hayvanlarda çok sayıda hastalığa neden olabilmektedirler. İneklerde görülen mastitislerin en önemli patojenlerinden biridir (1). *S. aureus*'un klinik izolatları, patojenitelerine katkısı olan toksik şok sendrom toksin-1 (TSST-1), stafilkokal enterotoksinler (SEs), ekfoliatif toksinler (ETA ve ETB) ve lökositinlerden bir ya da daha fazla sentezleyebilmektedirler. TSST-1 ve enterotoksinler pirojenik toksin süperantijenler (PTSAgs) olarak bilinmektedirler. Ayrıca TSST-1'e önceleri stafilkokal pirojenik ekzotoksin C ve stafilkokal enterotoksin F adları da verilmiştir (5). Bazı stafilkokal enterotoksinler, klasik enterotoksinler gibi primatlar üzerinde kusmaya neden olmadıklarından dolayı stafilkokal enterotoksin benzeri toksinler olarak (SE-like, SEI) tanımlanmışlardır. Günümüzde toplam 19 SEs ve SE-like (SEI) toksin belirlenmiştir. Bunlardan 5'i

iyi tanımlanmış klasik stafilkokal enterotoksinler (SEA, SEB, SEC, SED ve SEE) ve 14'ü yeni stafilkokal enterotoksinler (SEG, SEH, ve SEI) veya stafilkokal enterotoksin benzeri (SEIJ, SEIK, SEIL, SEIM, SEIN, SEIO, SEIP, SEIQ, SEIR, SEIU ve SEIV) toksinler olarak ayrılmaktadırlar (6, 30). Stafilkokal enterotoksinler (SEs) ile kontamine gıdaların tüketimi ile ortaya çıkan stafilkokal gıda zehirlenmeleri, insanlarda görülen en yaygın gıda kaynaklı hastalıklardandır (2, 6).

*S. aureus* süt sığıru yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olan mastitislerden en sık izole edilen bakteridir. İnfekte ineklerden elde edilen sütler enterotoksijenik *S. aureus* izolatlarının ana kaynağıdır (33).

İneklerin mastitisten korunmasında ve tedavisinde antibiyotik kullanımı oldukça yaygındır. Bu durum antibiyotik dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına neden

olabilmektedir. Bu nedenle antibiyotiklere dirençli bakterilerin tespiti özellikle de metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA)'ların belirlenmesi oldukça önemlidir (27). MRSA suşları, düşük affiniteli penisilin bağlayan proteinin (PBP2-a) sentezini sağlayan *mecA* geni taşırlar (17).

Son yıllarda insan ve veteriner hekimliği alanlarında *S. aureus* izolatlarının sahip olduğu virulens faktörlerin tespitinin önemi vurgulanmakta ve çalışmaların önemli bir kısmı *S. aureus* virülens faktörlerinin çeşitli genotipik yöntemlerle değerlendirilmesi konusunda yapılmaktadır (11, 22, 28, 29, 30, 32).

Bu çalışmada subklinik mastitisli ineklerden izole edilen *S. aureus* izolatlarının stafilokokal enterotoksin, Panton-Valentine lökositin genleriyle metisilin direnç geninin araştırılması amaçlanmıştır.

### Materyal ve Metot

*S. aureus* izolatları: Araştırma 2010 yılında Kırıkkale ve ilçelerinde ineklerde mastitisle ilgili yürütülen bir proje kapsamında (15) elde edilen subklinik mastitisli inek sütlerinden laboratuvarında izole edilen 60 *S. aureus* izolatı kullanılarak yapılmıştır. Uygun şekilde alınıp laboratuvara getirilen süt örneklerinden kanlı agara (%5 koyun kanı) 10 mikrolitre miktarında ekimler yapılmış, daha sonra 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Üreyen koloniler, Gram boyama, morfoloji, hemoliz özellikleri, katalaz, oksidaz, tavşan plazması ile tüp koagülaz, mannitolün anerobik kullanımı testlerine göre *S. aureus*

olarak tanımlanmıştır. Bu izolatların Kristal Gram pozitif ID kit (Becton Dickinson- USA) ile doğrulanması yapılmıştır. Bütün izolatlar diğer analizleri yapılana kadar % 15 gliserol içeren brain heart infüzyon sıvı besiyerinde -20°C 'de depolanmıştır.

*S. aureus* izolatlarının toksin analizi: *S. aureus* izolatlarının PZR için DNA ekstraksiyonunda izolatlar Mueller-Hinton sıvı besiyerinde bir gece inkübe edilmiştir. Sıvı kültürler 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek bakteriler çöktürülmüştür. Pelet üzerine 1mL TE bufer (10 mM Tris-HCl pH 8.0; 1mM EDTA) ilave edilmiş ve 14000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek bakteriler yıkanmıştır. Üst sıvı atıldıktan sonra pelete 50 µL lizostafin (100µg/mL) eklenmiş, 10 dk 37°C inkübe edilmiş ve daha sonra 50µL proteinaz K (100µg/ml) ilave edilerek 10 dk 37°C inkübe edilmiştir. Proteinaz K'nın inaktivasyonu için ise 10 dk 100°C kaynatılan örneklerden elde edilen DNA -20°C de kullanılabilecek kadar saklanmıştır (26).

Stafilokokal enterotoksin genlerinin (*sea-sej*), toksik şok sendrom toksin geni (*tst*), Panton-Valentine lökositin geni (*pvl*) ve metisilin direnç geni (*mecA*) primerleri literatürlerde bildirilen primer dizilerinden seçilmiştir (3, 13, 14, 16). Kullanılan primer dizileri Tablo 1'de verilmiştir.

Stafilokokal enterotoksin genleri multipleks-PZR ile belirlenmiştir. PZR ürünlerinin yakın büyüklüklerde olması nedeniyle ayırımlarında zorluklar yaşamamak için

Tablo 1. Çalışmada kullanılan oligonükleotid primerler.  
Table 1. Oligonucleotide primers used in the study.

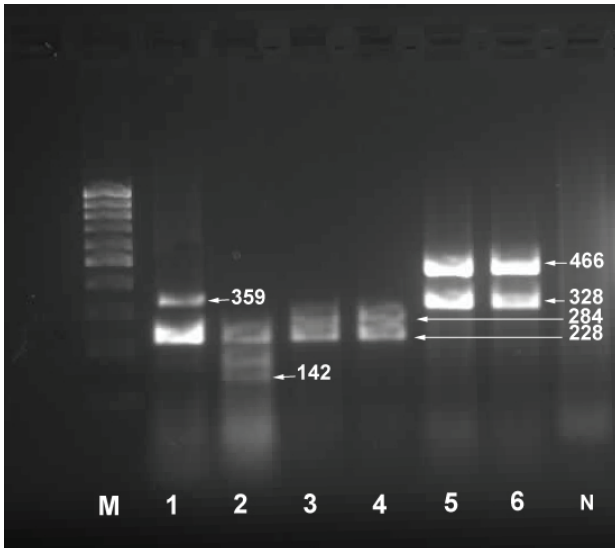
Gen	Dizilim (5'-3') <sup>a</sup>	Kaynaklar	Ürün (bp)
<i>sea</i>	GCA GGG AAC AGC TTT AGG C GTT CTG TAG AAG TAT GAA ACA CG	16	520
<i>seb-sec</i>	ACA TGT AAT TTT GAT ATT CGC ACT G TGC AGG CAT CAT GTC ATA CCA	14	667
<i>sec</i>	CTT GTA TGT ATG GAG GAA TAA CAA TGC AGG CAT CAT ATC ATA CCA	16	284
<i>sed</i>	GTG GTG AAA TAG ATA GGA CTG C ATA TGA AGG TGC TCT GTG G	16	385
<i>see</i>	TAC CAA TTA ACT TGT GGA TAG AC CTC TTT GCA CCT TAC CGC	16	171
<i>seg</i>	CGT CTC CAC CTG TTG AAG G CCA AGT GAT TGT CTA TTG TCG	16	328
<i>seh</i>	CAA CTG CTG ATT TAG CTC AG GTC GAA TGA GTA ATC TCT AGG	16	359
<i>sei</i>	CAA CTC GAA TTT TCA ACA GGT ACC CAG GCA GTC CAT CTC CTG	16	466
<i>sej</i>	CAT CAG AAC TGT TGT TCC GCT AG CTG AAT TTT ACC ATC AAA GGT AC	16	142
<i>tst</i>	GCT TGC GAC AAC TGC TAC AG TGG ATC CGT CAT TCA TTG TTA T	14	559
<i>pvl</i>	ATCATTAGGTA AAAATGCTCTGGACATGATCCA GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAAGC	13	433
<i>mecA</i>	FCCTAGTAAAGCTCCGGAA CTAGTCCATTCGGTCCA	3	314
<i>16S rRNA F</i>	GTA GGT GGC AAG CGT TAT CC	16	228
<i>16S rRNA R</i>	CGC ACA TCA GCG TCA G		

a: Prmimer dizileri 5' →3' yönünde verilmektedir. Her bir primerin ilk dizisi (üstteki) 5' ucundan başlarken, ikincisi (alttaki) 3' ucundan başlamaktadır.

11 primer 2 gruba ayrılarak çalışılmıştır. *sed*, *see*, *seg*, *sei*, ve *tsst* primerleri karışım 1 içinde araştırılmıştır. *sea*, *seb-sec*, *sec*, *seh*, *sej* ve 16S rRNA primerleri ise karışım 2 içerisinde hazırlanmıştır. Multipleks-PZR için Lovseth ve ark. (2004)'nın protokolü (14); 5µl DNA, 45µL PZR karışımı (1X Taq polimeraz tampon çözeltisi, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 2U Taq polimeraz enzimi, 400µM her bir deoksiniükleosit trifosfat, her bir primerden 300nM) kullanılmıştır. İstenilen DNA parçalarını çoğaltmak için "thermal cycler (TC-PRO/Boeco)"; 95 °C'de 10 dk ilk denatürasyonu takiben 30 döngü 95 °C de 1 dk, 64 °C de 45 sn, 72 °C de 1 dk, son uzama ise 72 °C 10 dk olacak şekilde programlanmıştır.

*mecA* ve *pvl* genleri için hazırlanan iki PZR protokolü ise 5µl DNA ve 45µL PZR karışımı olacak şekilde hazırlanmıştır. PZR karışımı 1X Taq polimeraz tampon çözeltisi, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 2U Taq polimeraz enzimi, 400µM her bir deoksiniükleosit trifosfat ve her bir primerden 300nM olacak şekilde ayarlanmıştır. Amplifikasyon siklusları ise 95°C'de 5 dk ilk denatürasyon; 30 siklus, 94 °C 'de 1 dk, 55 °C 30 sn *mecA* geni için, 62°C'de 30 sn Panton-Valentine lökositin geni (*pvl*) için, 72°C'de 1 dk uzama; ve son uzama içinde 72°C'de 5 dk olacak şekilde programlanmıştır.

Tüm PZR ürünleri, %1.5 agaroz jele (1X Tris-EDTA tampon çözeltisinde 100V/100 dk) her örnekten 10 µl yüklenerek elektroforeze tabi tutulmuştur ve "UV transilluminator (Ingenius, Syngene Bio Imaging)" ile bant görüntüleri elde edilmiştir. PZR sonucunda elde edilen ürünlerin boyutları 100bp'lik (Vivantis-NL0401) belirleyici ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.



Şekil 1. Stafilokokal enterotoksin genleri belirlenen *S. aureus* izolatları.

Figure 1. *S. aureus* isolates harbored staphylococcal enterotoxin genes.

M: Marker, 1: *seh* ve 16SrRNA taşıyan *S. aureus* izolatu, 2: 16SrRNA ve *sej* geni taşıyan *S. aureus* izolatu, 3-4: *sec* ve 16SrRNA taşıyan *S. aureus* izolatları, 5-6: *seg-sei* taşıyan *S. aureus* izolatları, N: negatif kontrol

Bu çalışmada, D4508 (*sea*, *seh*), FRI913 (*see*), RIMD 31092 (*seb*, *seg*, *sei*), NTCC9393 (*sej*, *sed*, *seg*, *sei*), FRI137 (*sec*, *seh*), ATCC25903(16S rRNA), A900322 (*seg*, *sei*), ATCC 49775 (*pvl*), *S. aureus* 27R (*mecA*) *S. aureus* referens suşları kullanılmıştır.

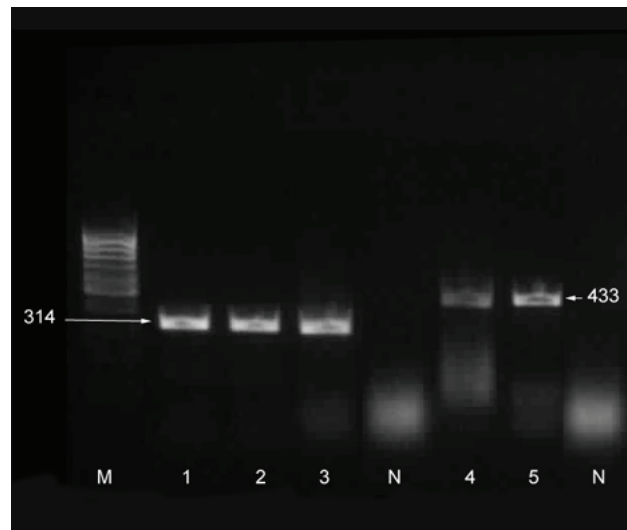
## Bulgular

Subklinik mastitisli inek sütlerinden izole edilen 60 *S. aureus* izolatının 16 (% 26.67) tanesinde bir veya daha fazla stafilokokal enterotoksin geni belirlenmiştir. Sekiz (% 13.33) izolatta *seg-sei*, 6 (% 10.00) izolatta *sej*, 4 (% 6.67) izolatta *sec*, 3 (% 5.00) izolatta ise *seh* geni tespit edilmiştir (Tablo 2, Şekil 1). Ancak izolatlarda *sea*, *seb*, *sed*, *see* ve *tsst* enterotoksin genleri belirlenmemiştir. Altmış *S. aureus* izolatın 4 (% 6.6)'ünde Panton-Valentine lökositin geni ve 2 (% 3.3)'sinde metisilin direnç geni tespit edilmiştir (Şekil 2).

Tablo 2. İzolatlarda stafilokokal enterotoksin, Panton-Valentine lökositin ve metisilin direnç genleri.

Table 2. Staphylococcal enterotoxin, Panton-Valentine leukocidin and methicillin resistance genes of isolates.

Enterotoksin, Panton-Valentine lökositin ve metisilin direnç genotipi	İzolat sayısı (%)
<i>seg-sei</i>	2 (3.28)
<i>seg-sei-pvl</i>	1 (1.64)
<i>seg-sei-sec</i>	3 (4.92)
<i>seg-sei-sec-pvl-mecA</i>	1 (1.64)
<i>seg-sei-sej-pvl</i>	1 (1.64)
<i>seh</i>	2 (3.28)
<i>seh-mecA</i>	1 (1.64)
<i>sej</i>	4 (6.56)
<i>sej-pvl</i>	1 (1.64)
Toplam	16 (26.23)



Şekil 2. *pvl* ve *mecA* geni taşıyan *S. aureus* izolatları.

Figure 2. *S. aureus* isolates harbored *pvl* and *mecA* genes.

M: Marker, 1: ATCC 49775 (*pvl*), 2-3: subklinik mastitisli ineklerden izole edilen *pvl* geni taşıyan *S. aureus* izolatları. N: negatif kontrol, 4: *S. aureus* 27R (*mecA*). 5: subklinik mastitisli ineklerden izole edilen *mecA* genine sahip *S. aureus* izolatu.

### Tartışma

Türkiye’de subklinik mastitisli ineklerden izole edilen *S. aureus* izolatlarının stafilocokal enterotoksin genleri üzerinde yapılan çalışmalarda izolatların % 29.3 (9) ve % 46.9’ nun (8) en az bir stafilocokal toksin geni taşıdıkları bildirilmiştir. Çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalarda ise subklinik mastitisli ineklerden izole edilen Stafilocok izolatlarında % 7 (31), % 65 (30), % 75 (29) ve % 80.2 (7) oranlarında en az bir *se* geni belirlenmiştir. Bu çalışmada subklinik mastitisli ineklerden izole edilen *S. aureus* izolatlarının klasik ve yeni tanımlanmış enterotoksin genlerinin en az birini % 26.67 oranında taşıdığı belirlenmiştir. Bu durum, Türkiye ve çeşitli ülkelerde ineklerde subklinik mastitise neden olan *S. aureus* izolatlarının farklı oranlarda da olsa stafilocokal enterotoksin genlerini taşıdığı ve bu oranın bölgelere ve ülkelere göre değişebildiğini göstermektedir.

Bu çalışmada en yaygın stafilocokal enterotoksin geni *sei* ve *seg* olarak belirlenmiştir. Ayrıca *sei* geni taşıyan tüm izolatların *seg* geni de taşıdığı tespit edilmiştir. *seg* ve *sei* genlerinin izolatlarda her zaman olmasa da çoğu zaman bir arada bulunabileceği ve hatta *sei* ve *seg*’nin yanı sıra aynı enterotoksin gen kümesinde *selm*, *seln* ve *selo* genlerinin de yer alabileceği daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (11, 21, 30, 33). Karahan ve ark. (2009)’nın yaptığı çalışmada (11) bu sonuca benzer olarak *sei* geni en yaygın izole edilen stafilocokal enterotoksin geni olarak belirlenmiştir. İnek mastitisli sütlerden izole edilen *S. aureus* izolatlarının stafilocokal enterotoksin genlerinin tespitiyle ilgili yapılan çalışmaların çoğunda (11, 21, 23, 32), sunulan bu çalışmanın bulgularına benzer olarak *seb*, *see* ve *seh* genleri hiç izole edilmemiş veya çok az oranlarda izole edilmiştir. Diğer taraftan bazı çalışmalarda (29, 30), yüksek oranlarda *sea* geni tespit edilirken; bazı çalışmalarda (7, 8, 11, 21, 33) sunulan bu çalışmada olduğu gibi *sea* geni ya hiç belirlenmemiş ya da çok az oranlarda belirlenmiştir. Bu çalışmada *tst* geni hiç belirlenmemiştir. Bu durum Freitas ve ark. (2008) (7) ve Piccinini ve ark. (2010) (23) çalışmalarına benzerlik gösterirken; Günaydın ve ark. 2011 (8) (% 5.4) ile Ote ve ark. (2011) (21) (% 27.5) tarafından bildirilen sonuçlardan farklı olmuştur.

Subklinik mastitisli ineklerin sütlerinden izole edilen *S. aureus* izolatları değişik oranlarda da olsa bir veya daha fazla stafilocokal enterotoksin kodlayan genleri taşıyabilmektedirler. Enterotoksinlerin *S. aureus*’ların konakçı savunma sistemini etkileyerek kolonizasyonları için uygun bir çevre oluşmasına yardım eden önemli virülens faktörlerinden (19) olduğu düşünülürse, mastitislerin patogenezinde bu toksinlerin önemli olabileceği göz önüne alınmalıdır. Ancak enterotoksinlerin mastitislerin patogenezindeki rolleri hala tam olarak aydınlatılmamıştır (21, 32). Bu durumda, subklinik mastitisin patogenezinde *S. aureus* enterotoksinlerin rolü ile ilgili daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir. Ayrıca

sütlerdeki enterotoksin varlığı gıda zehirlenmelerine neden olabileceğinden halk sağlığı açısından önemli bir risk oluşturmaktadır.

Mastitisli inek sütlerinde bulunan çoğul dirençli *S. aureus*, özellikle metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) izolatları, antibiyotik direncinin insanlardaki patojenlere transferinde önemli bir faktör olduğu bildirilmektedir (10, 12, 27). Metisilin direncine sahip stafilocoklar, yeni bir penisilin bağlayan protein (PBP2a) sentezleyerek tüm  $\beta$ -laktamaz dirençli  $\beta$ -laktam grubu antibiyotiklere direnç kazanmaktadırlar (20). Türkiye’de subklinik mastitisli ineklerden izole edilen *S. aureus* izolatlarında % 6.7 (4)-17.2 (25) oranlarında *mecA* geni belirlenmiştir. Ayrıca Stafilocokal patojenik adalar (SaPIs), enterotoksin genlerini taşıyan; stafilocokal kromozom kaset metisilin direnç adaları (SCC*mecs*) ise stafilocokların direnç determinantlarını taşıyan önemli mobil yapılardır. Bazı çalışmalarda (12, 18, 22) metisilin dirençli ve duyarlı *S. aureus* (MSSA) izolatlarının enterotoksin gen prevalansı araştırılmış; MSSA izolatlarına göre MRSA izolatlarında enterotoksin geninin daha fazla belirlenmesi dışında toksin geni varlığı ile antibiyotiklere direnç arasında kesin bir ilişki ortaya konamamıştır. Sunulan bu çalışma da yukarıda bahsedilenlere paralel olarak 2 MRSA izolatının *mecA* geniyle birlikte enterotoksin genlerini de taşıdıkları belirlenmiştir.

*S. aureus* izolatlarının patojenitelerinde önemli olduğu düşünülen başka bir virülens faktör de Pantone Valetine lökositidin toksinidir. Bu toksini kodlayan gen mastitisli ineklerden izole edilen *S. aureus* izolatlarında % 0-84 arasında belirlenmiştir (9, 23, 31). Bu çalışmada ise *pvl* geni taşıyan izolat oranı % 6.6 olarak belirlenmiştir. Lökositidinlerin inek mastitislerinde önemli bir rolü olduğunu belirten çalışmaların (24, 31) aksine bu çalışmada *pvl* geninin subklinik mastitislerin patogenezinde çok önemli bir rolü olmadığı söylenebilir.

Sonuç olarak subklinik mastitislerden izole edilen *S. aureus* izolatları stafilocokal enterotoksin genlerini taşıyabilmektedirler. Bu nedenle stafilocokal enterotoksinlerin mastitislerin patogenezindeki rollerini ortaya koyacak moleküler çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca stafilocokal enterotoksin genleri ve metisilin direnç genlerini taşıyan *S. aureus* izolatların sütlerde bulunabilmeleri halk sağlığı açısından önemli bir risk oluşturmaktadır.

### Teşekkür

Araştırmada kullanılan izolatlar, daha önce mastitisle ilgili tamamlanan bir proje kapsamında laboratuvarında izole edildiklerinden proje yürütücüsü Yrd. Doç. Dr. Hasan Ceyhan MACUN ve yardımcı araştırmacılara teşekkür ederim. Ayrıca çalışmada kullanılan pozitif kontroller için Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalından Prof. Dr. Burhan Çetinkaya ve Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkür ederim.



### Kaynaklar

1. **Akan M** (2006): *Staphylococcus* infeksiyonları. 15-29 In: Aydın N, Paracıklıoğlu J (Ed), Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). İlke-Emek yayımları, Ankara.
2. **Balaban N, Rasooly A** (2000): *Staphylococcal enterotoxins*. Inter J Food Microbiol, **61**, 1-10.
3. **Choi SM, Kim SH, Kim HJ, Lee DG, Choi JH, Yoo JH, Kang JH, Shin WS, Kang MW** (2003): *Multiplex PCR for detection of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes and methicillin resistance among Staphylococcus species*. J Korean Med Sci, **18**, 631-636.
4. **Ciftci A, Findik A, Onuk EE, Savasan S** (2009): *Detection of methicillin resistance and slime factor production of Staphylococcus aureus in bovine mastitis*. Braz J Microbiol, **40**, 254-261.
5. **Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM** (2000): *Exotoxins of Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev, **13**, 16-34.
6. **Erol İ, İşeri Ö** (2004): *Stafilokokal enterotoksinler*. Ankara Üniv Vet Fak Derg, **51**, 239-245.
7. **Freitas MFL, Luz IS, Silveira-Filho VM, Junior JWP, Stamford TLM, Mota RA, Sena MJ, Almeida AMP, Balbino VQ, Leal-Balbino TC** (2008): *Staphylococcal toxin genes in strains isolated from cows with subclinical mastitis*. Pesquisa Vet Brasileira, **28**, 617-621.
8. **Günaydın B, Aslantaş Ö, Demir C** (2011): *Detection of superantigenic toxin genes in Staphylococcus aureus strains from subclinical bovine mastitis*. Trop Anim Health Product, **43**, 1633-1637.
9. **Hazımoğlu Ş** (2011): *Staphylococcus aureus* suşlarında Panton Valentine Lökosidin (PVL) genlerinin araştırılması. ADÜ. Sağlık Bil Enst Doktora Tezi, Aydın.
10. **İnegöl E, Türkyılmaz S** (2012): *Determination of SCCmec types in methicillin resistant staphylococci isolated from cows and farm workers*. Ankara Üniv Vet Fak Derg, **59**, 89-93.
11. **Karahan M, Açık MN, Çetinkaya B** (2009): *Investigation of toxin genes by polymerase chain reaction in Staphylococcus aureus strains isolated from bovine mastitis in Turkey*. Foodborne Pathog Dis, **6**, 1029-1035.
12. **Lee JH** (2003): *Methicillin (oxacillin)-resistant Staphylococcus aureus strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans*. Appl Environ Microbiol, **69**, 6489-6494.
13. **Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter M, Gauduchon V, Vandenesch F, Etienne J** (1999): *Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing Staphylococcus aureus in primary skin infections and pneumonia*. Clin Infec Dis, **29**, 1128-1132.
14. **Lövseth A, Loncarevic S, Berdal KG** (2004): *Modified multiplex PCR method for detection of pyrogenic enterotoxin genes in Staphylococcal isolated*. J Clin Microbiol, **42**, 3869-3872.
15. **Macun HC, Yıldırım M, Kalander H, Pir Yağcı İ, Ünal N, Sakarya F** (2011) *Kırıkkale'de belirlenen mastitisli ineklerin sütlerinden etken izolasyonu ve antibiyotik direnç durumu*. Kırıkkale Üniv BAP 2007/28.
16. **Monday S, Bohach G** (1999): *Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in Staphylococcal isolates*, J Clin Microbiol, **37**, 3411-3414.
17. **Morgan M** (2008): *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus and animals: zoonosis or humanosis?* J Antimicrob Chemother, **62**, 1181-1187.
18. **Normanno G, Corrente M, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, Parisi A, Greco, G, Bellacicco AL, Virgilio S, Celano GV** (2007): *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in foods of animal origin product in Italy*. Int J Food Microbiol, **117**, 219-222.
19. **Omoe K, Hu DL, Takahashi-Omoe H, Nakane A, Shinagawa K** (2003): *Identification and characterization of a new staphylococcal entero-toxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids*. Infect Immun, **71**, 6088-6094.
20. **Ortega E, Abriouel H, Lucas R, Gálvez A** (2010): *Multiple roles of Staphylococcus aureus enterotoxins: pathogenicity, superantigenic activity, and correlation to antibiotic resistance*. Toxins, **2**, 2117-2131.
21. **Ote I, Taminiau B, Duprez JN, Dizier I, Mainil JG** (2011). *Genotypic characterization by polymerase chain reaction of Staphylococcus aureus isolates associated with bovine mastitis*. Vet Mic, **153**, 285-292.
22. **Pereira V, Lopes C, Castro A, Silva J, Gibbs P, Teixeira P** (2009): *Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of Staphylococcus aureus isolates from various foods in Portugal*. Food Microbiol, **26**, 278-282.
23. **Piccinini R, Borromeo V, Zecconi A** (2010): *Relationship between S. aureus gene pattern and dairy herd mastitis prevalence*. Vet Mic, **145**, 100-105.
24. **Rainard P, Corrales JC, Barrio MB, Cochard T, Poutrel B** (2003): *Leucotoxic activities of Staphylococcus aureus strains isolated from cows, ewes, and goats with mastitis: importance of LukM/LukF'-PV leukotoxin*. Clin Diagn Lab Immunol, **10**, 272-277.
25. **Türkyılmaz S, Tekbiyık S, Oryasin E, Bozdoğan B** (2010): *Molecular Epidemiology and Antimicrobial Resistance Mechanisms of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Isolated from Bovine Milk*. Zoonoses Public Health, **57**, 197-203.
26. **Unal S, Hoskins J, Flokowitsch JE, Wu CY E, Preston DA, Skantrud PL** (1992): *Detection of methicillin-resistant Staphylococci by using the polymerase chain reaction*. J Clin Microbiol, **30**, 1685-1691.
27. **Unal N, İstanbulluoğlu E** (2009) *İnsan ve sığır kökenli Staphylococcus aureus izolatlarının fenotipik ve genotipik özelliklerinin araştırılması*. Ankara Üniv Vet Fak Derg, **56**, 119-126.
28. **Unal N, Askar S, Macun HC, Sakarya F, Altun B, Yıldırım M** (2012) *Panton-Valentine leukocidin and some exotoxins of Staphylococcus aureus and antimicrobial susceptibility profiles of staphylococci isolated from milks of small ruminants*. Trop Anim Health Prod, **44**, 573-579.
29. **Vimercati C, Cremonesi P, Castiglioni B, Pisoni G, Boettcher PJ, Stella A, Vicenzoni G, Moroni P** (2006): *Molecular typing of Staphylococcus aureus isolated from cows, goats and sheep with intramammary infections on the basis of gene polymorphisms and toxins genes*. J Vet Med B, Infec Dis Vet Public Health, **53**, 423-428.
30. **Wang SC, Wu CM, Xia SC, Qi YH, Xia LN, Shen JZ** (2009): *Distribution of superantigenic toxin genes in Staphylococcus aureus isolates from milk samples of*

- bovine subclinical mastitis cases in two major diary production regions of China. Vet Mic, 137, 276–281.*
31. **Wang X, Wei YY, Zhang J, Zhou T, Liang ZJ, Yang BW, Xi ML, Xia XD, Meng JH, Yu Y** (2011): *Virulence genes and PFGE profiles of Staphylococcus aureus isolated from cows with subclinical and clinical mastitis. Chinese J Anim Vet Sci, Doi: CNKI:SUN:XMSY.0.2011-07-012.*
32. **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. Microb Pathog, 40, 177–183.*
33. **Zschöck M, Kloppert B, Wolter W, Hamann HP, Lammler C** (2005): *Pattern of enterotoxin genes seg, seh, sei, and sej positive Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis. Vet Mic, 108, 243-249.*

Geliş tarihi: 22.02.2012 / Kabul tarihi: 12.10.2012

**Yazışma adresi:**

*Dr. Nilgün Ünal*

*Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,*

*Mikrobiyoloji Anabilim Dalı*

*Yahşihan/Kırıkkale*

*e-mail: nilkarakaya@hotmail.com*