

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

SUBKLİNİK MASTİTİSLİ KEÇİLERDEN
İZOLE EDİLEN STAFİLOKOK TÜRLERİNİN
FARKLI VİRULENS
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

EVİRİM DÖNMEZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Şükrü KIRKAN

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-19034 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2020

KABUL VE ONAY SAYFASI



TEŞEKKÜR



İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
RESİMLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1.Stafilokokkal Koagulaz.....	8
2.1.1. Koagulaz.....	8
2.1.2. Stafilokokkal İnfeksiyonlarda Koagulazların Rolü	11
2.2. Stafilokokkal Hemolizin	12
2.2.1.Stafilokokkal α -Hemolizin.....	12
2.2.2. Stafilokokkal β -Hemolizin	15
2.2.3.Stafilokokkal γ -Hemolizin	16
2.3. Stafilokokkal Panton-Valentine Lökositdin (PVL).....	17
2.4. Stafilokok Türlerinde Antibiyotik Direnci	18
2.4.1. Stafilokok Türlerinde Metisilin Direnci	19
2.4.2 Stafilokok Türlerinde Vankomisin Direnci	20
2.5. Stafilokokkal Enterotoksinler	23
2.6. Stafilokokların Moleküler İdentifikasyonu ve Genotiplendirilmesi	26
2.6.1. Stafilokokların Moleküler İdentifikasyon Yöntemleri.....	27
2.6.2. 16S rDNA Dizisine Dayalı Tür İdentifikasyonu	28
2.6.3. tuf gen Dizisine Dayalı Tür İdentifikasyonu	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. Gereç	30
3.1.1. Örnekleme.....	30

3.1.2. Kullanılan Solüsyonlar, Besiyerleri, Ayıraçlar.....	30
3.1.2.1. Gram boyama.....	30
3.1.2.2. Besiyerleri.....	30
3.1.2.2.1. Blood Agar (Merck® 1. 10886).....	30
3.1.2.2.2. Trypton Soya Agar (TSA) (Merck 105458)	31
3.1.2.3. Lam Katalaz Testi.....	31
3.1.2.4. Lam Koagülaz Testi.....	31
3.1.2.5. BD Phoenix™ ID/AST Broth ve AST İndikatör.....	32
3.1.2.6. Solüsyonlar.....	32
3.1.2.6.1. 50X TAE (Tris, Asetik Asit, EDTA) Elektrophorez Solüsyonu (Thermo Fisher Scientific®).....	32
3.1.2.6.2. 6X DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific®)	33
3.1.3. BD Phoenix™ M50 Otomatize İdentifikasyon Sistemi.....	33
3.1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	33
3.1.4.1. DNA Ekstraksiyonu.....	33
3.1.4.2. ExPrime Taq Premix (2X) (GeNet Bio®).....	33
3.1.4.3. Primerler.....	34
3.1.4.4. Agaroz Jel.....	35
3.1.4.5. Marker	35
3.1.4.6. Ethidium Bromür (AppliChem®)	35
3.1.4.7. PCR Ürünü Saflaştırılması	36
3.1.4.8. Sekans PCR ürünü saflaştırılması.....	36
3.1.4.9. Kullanılan Cihazlar.....	36
3.1.4.9.1. Santrifüj Cihazı	36
3.1.4.9.2. Termal Döngüleme Cihazı	36
3.1.4.9.3. Elektrophorez Cihazı	36
3.1.4.9.4. Görüntüleme Cihazı	37
3.1.4.9.5. Saflaştırılmış PCR Ürünü Ölçüm Cihazı	37
3.1.4.9.6. DNA Sekans Cihazı.....	37
3.2. Yöntem.....	37
3.2.1 Örneklem.....	37
3.2.2. Stafilokok İzolasyonu	38
3.2.3. Gram Boyama.....	38

3.2.4. Otomatize İdentifikasyon Cihazına Yükleme.....	38
3.2.5. Bakteriyel İzolatların BD Phoenix™ ile İdentifikasyonu.....	39
3.2.6. BD Phoenix™ ile Teşhis Edilen Bakteriyel Türlerin Antibiyotik Duyarlılığının Belirlenmesi.....	39
3.3. DNA Ekstraksiyonu	40
3.4. <i>Staphylococcus</i> sp. izolatların PCR ile Virulens genlerinin tespiti.....	41
3.4.1 <i>16S rRNA</i> Geninin PCR Yöntemi ile Tespiti.....	41
3.4.2. <i>nuc</i> Geninin PCR Yöntemi ile Tespiti	42
3.4.3. <i>coa</i> Geninin PCR Yöntemi ile Tespiti.....	44
3.4.4. <i>tuf</i> Geninin PCR Yöntemi ile Tespiti	45
3.5. <i>Staphylococcus</i> sp. Türlerinin Enterotoksin Genlerinin Tespiti.....	46
3.6. <i>Staphylococcus</i> sp. İzolatlarında Toksik Şok Sendrom Toksin Geninin Varlığının Belirlenmesi.....	50
3.7. <i>Staphylococcus</i> sp. İzolatlarının PVL, CLFA, Hla, Hlb, Ý-hlg, BAP Virulens Genlerinin Belirlenmesi.....	51
3.8. <i>Staphylococcus</i> sp. İzolatlarının Antimikrobiyel Direnç Genlerinin Belirlenmesi...	53
3.8.1. <i>Staphylococcus</i> sp. İzolatlarının <i>mecA</i> Direnç Geninin Belirlenmesi.....	53
3.8.2. <i>Staphylococcus</i> sp. İzolatlarının <i>mecC</i> Direnç Geninin Belirlenmesi.....	54
3.9. <i>Staphylococcus</i> sp. İzolatlarının <i>vanA-vanB-vanC</i> Direnç Geninin Belirlenmesi.....	56
3.10. PCR ürünlerinin Elektroforez Tankına Yüklmesi ve Görüntülenmesi	58
3.11. Stafilokok Türlerinin Sekans Analizleri.....	58
3.11.1. DNA Sekans Sonuçlarının Elektronik Ortamda Karşılaştırılması.....	58
4. BULGULAR.....	59
4.1. İzolasyon ve İdentifikasyon.....	59
4.2. BD Phoneix™ 50 otomatize identifikasyon cihazı ile identifikasyon.....	59
4.3. Genotipik İdentifikasyon	64
4.3.1. <i>16S rRNA</i> Geni Tespiti.....	64
4.3.2. <i>nuc</i> Geni Tespiti.....	65
4.3.3. <i>tuf</i> Geni Tespiti.....	65
4.3.4. <i>coa</i> Geni Tespiti.....	66
4.3.5. Enterotoksin A-B-C-D-E Genlerinin Tespiti.....	66
4.3.6. Enterotoksin G ve H Genlerinin Tespiti	67

4.3.7. <i>mecA</i> Geni Tespiti.....	67
4.3.8. <i>mecC</i> Geni Tespiti.....	67
4.3.9. PVL, <i>Hla</i> , <i>Hlb</i> Virulens Genlerinin tespiti	68
4.3.10. CLFA, BAP, γ - <i>Hlg</i> genlerinin tespiti	68
4.3.11. TSST Geni Tespiti.....	69
4.3.12. <i>vanA-B-C</i> Genlerinin Tespiti.....	69
4.4. Sekans Bulguları	71
5. TARTIŞMA	73
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	80
KAYNAKLAR	82
ÖZGEÇMİŞ	119



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
<	: Küçüktür
>	: Büyüktür
°C	: Santigrat Derece
bp	: Baz Çift
CLSI	: Klinik Laboratuar Standartları Enstitüsü
DNA	: Deoksiribonükleik asit
MgCl₂	: Magnezyum Klorür
MIC	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MRSA	: Metisilin Dirençli Staphylococcus aureus
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PVL	: Panton Valentine Lökosidin
rRNA :	: Ribozomal Ribonükleik Asit
TSST	: Toxic Shock Syndrome Toxin
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Membrana dik olarak ve yedi kat simetri eksenini boyunca görülen α -hemolizin yapısı ve alfa-hemolizin monomer düzeniğinin mekanizması....	14
Şekil 2.	Vankomisine dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> 'un direnç mekanizması	22
Şekil 3.	İdentifiye edilmiş izolatların BD Phoneix™ 50 cihazına göre antibiyotik duyarlılık sonuçları grafiğı	64



RESİMLER DİZİNİ

Resim 1.	Katalaz pozitif ve negatif örnek görünümü	31
Resim 2.	Lam koagulaz testinde pozitif ve negatif örnek görünümü.....	32
Resim 3.	ID/AST Broth ve AST indikatörü	32
Resim 4.	<i>16S rRNA</i> geninin jel elektroforez görüntüsü.....	65
Resim 5.	<i>nuc</i> geninin jel elektroforez görüntüsü	65
Resim 6.	<i>tuf</i> geninin jel elektroforez görüntüsü	66
Resim 7.	<i>coa</i> geninin jel elektroforez görüntüsü	66
Resim 8.	<i>entA-B-C-D-E</i> (SetI) genlerinin jel elektroforez görüntüsü	67
Resim 9.	<i>mecC</i> geni jel elektroforez görüntüsü	68
Resim 10.	PVL, <i>Hla</i> , <i>Hlb</i> genleri jel elektroforez görüntüsü.....	68
Resim 11.	BAP geni pozitif 2 izolatın jel elektroforez görüntüsü	69
Resim 12.	<i>tsst</i> geninin jel elektroforez görüntüsü	69

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.	<i>Staphylococcus</i> hemolizinin ifade edilen farklı özellikleri	14
Tablo 2.	Stafilokokkal tanımlama için kullanılan yöntemler	27
Tablo 3.	Stafilokok izolatlarının genotiplendirilmesinde kullanılan primerler.....	34
Tablo 4.	<i>16S rRNA</i> geni için kullanılan primer.....	41
Tablo 5.	<i>16S rRNA</i> geni için mastermiks hazırlama oranları.....	42
Tablo 6.	<i>16S rRNA</i> geni PCR işlemlerine ait ısı döngü ve süre diyagramı.....	42
Tablo 7.	<i>nuc</i> geni için kullanılan primer.....	42
Tablo 8.	<i>nuc</i> geni için mastermiks hazırlama oranları.....	43
Tablo 9.	<i>nuc</i> geni PCR işlemlerine ait ısı döngü ve süre diyagramı.....	43
Tablo 10.	<i>coa</i> geni için kullanılan primer.....	44
Tablo 11.	<i>coa</i> geni için mastermiks hazırlama oranları.....	44
Tablo 12.	<i>coa</i> geni PCR işlemlerine ait ısı döngü ve süre diyagramı.....	45
Tablo 13.	<i>tuf</i> geni için kullanılan primer.....	45
Tablo 14.	<i>tuf</i> geni için mastermiks hazırlama oranları.....	46
Tablo 15.	<i>tuf</i> geni PCR işlemlerine ait ısı döngü ve süre diyagramı.....	46
Tablo 16.	Enterotoxin A-B-C-D-E-G-H geni için kullanılan primerler.....	47
Tablo 17.	<i>Staphylococcus sp.</i> Enterotoksin genleri için oluşturulan Set I PCR miksi.....	48
Tablo 18.	Enterotoksin A-B-C-D-E (Set I) genleri için mastermiks hazırlama oranları.....	48
Tablo 19.	Enterotoksin G ve H genleri için mastermiks hazırlama oranları.....	48
Tablo 20.	Enterotoksin A-B-C-D-E (Set I) genleri PCR işlemlerine ait ısı döngü ve süre diyagramı.....	49
Tablo 21.	Enterotoksin G ve H genleri PCR işlemlerine ait ısı döngü ve süre diyagramı.....	49
Tablo 22.	<i>TSST</i> geni için kullanılan primer.....	50
Tablo 23.	<i>TSST</i> geni için mastermiks hazırlama oranları.....	50
Tablo 24.	<i>TSST</i> geni PCR işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı	51
Tablo 25.	Stafilokok izolatlarının virulens genlerinin belirlenmesinde kullanılan primerler.....	51
Tablo 26.	PVL, CLFA, <i>Hla</i> , <i>Hlb</i> <i>Y-hlg</i> , BAP genleri için mastermiks hazırlama	52

oranları.....	
Tablo 27. PVL, CLFA, <i>Hla</i> , <i>Hlb</i> $\dot{Y}$ - <i>hlg</i> , BAP genlerinin multipleks PCR işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı.....	53
Tablo 28. <i>mecA</i> direnç geninin belirlenmesinde kullanılan primerler.....	53
Tablo 29. <i>mecA</i> geni için mastermiks hazırlama oranları.....	54
Tablo 30. <i>mecA</i> geni PCR işlemlerine ait ısı döngü ve süre diyagramı.....	54
Tablo 31. <i>mecC</i> direnç geninin belirlenmesinde kullanılan primerler.....	54
Tablo 32. <i>mecC</i> geni için mastermiks hazırlama oranları.....	55
Tablo 33. <i>mecC</i> geni PCR işlemlerine ait ısı döngü ve süre diyagramı	55
Tablo 34. Stafilokok izolatlarının <i>vanA-vanB-vanC</i> antimikrobiyel direnç genlerinin belirlenmesinde kullanılan primerler.....	56
Tablo 35. <i>vanA,vanB,vanC</i> genleri için mastermiks hazırlama oranları.....	57
Tablo 36. <i>vanA,vanB,vanC</i> geni PCR işlemlerine ait ısı döngü ve süre.....	57
Tablo 37. CLSI standardına göre Gram pozitif bakteriler için MİK değerleri.....	60
Tablo 38. İdentifiye edilen Stafilokok türlerinin antibiyogram duyarlılıkları.....	61
Tablo 39. Stafilokok İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılık Yüzdeleri.....	62
Tablo 40. PCR ile genotipik identifikasyonu yapılan tüm genler ve sonuçları.....	70
Tablo 41. 16S <i>rRNA</i> Sekans sonuçları.....	71
Tablo 42. BD Phoenix M50 İdentifikasyon Sonucu ve 16S <i>rRNA</i> Sekans sonuçlarının karşılaştırılması.....	72

ÖZET

SUBKLİNİK MASTİTİSLİ KEÇİLERDEN İZOLE EDİLEN STAFİLOKOK TÜRLERİNİN FARKLI VİRULANS ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dönmez E. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2020.

Araştırmamızda subklinik mastitisli keçilerden izole edilen Stafilocok suşlarının virulens faktörleri, enterotoksinleri, antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Subklinik mastitisli keçilerden toplanan 110 süt örneğinden izole edilen Stafilocok suşları araştırmanın temelini oluşturmaktadır. Stafilocok suşları biyokimyasal testlere tabii tutulmuş ve koagulaz pozitif ve negatif olarak ayrılmıştır. Bu izolatlar genotipik olarak PCR ile tiplendirilmiş ardından sekans analizleri yapılarak tam identifikasyonları gerçekleştirilmiştir. İdentifiye edilen Stafilocok suşlarının Panton Valentine Leukocidin (PVL), Clumping factor (CLFA), Coagulase (*coa*), Alpha hemolysin (*Hla*), Beta Hemolysin (*Hlb*), Ý-hemolysin (*Ý-hlg*) ve Enterotoksin tiplendirilmeleri moleküler yöntemlerle yapılmıştır. Stafilocok izolatlarının sahada sıklıkla kullanılan antibiyotikler ile antibiyogramları gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak numunelerden %23.6 oranında Stafilocok izolasyonu yapılmıştır. Yapılan identifikasyon çalışmaları sonucunda, 5 *S. equorum* (%19), 5 *S. pettenkoferi* (%19), 5 *S. epidermidis* (%19), 3 *S. warneri* (%12), 3 *S. caprae* (%12), 2 *S. capitis* (%7), 1 *S. simulans* (%4), 1 *S. hominis* (%4) ve 1 *S. aureus* (%4), 15 (%13.8) *Streptococcus* sp., 13 (%12) *Bacillus* sp., 10 (%9) *Lactobacillus* sp., 7 (%6.3) *Shigella* sp., 7 (%6.3) *E. coli*, 7 (%6.3) *Corynebacterium* sp., 5 (%4.5) *Klebsiella* sp. ve 3 (%2.7) *Flavobacterium* sp. izole ve identifiye edilmiştir. Toplam 17 (%15.5) örnekte ise bakteriyel üreme görülmemiştir. Araştırmamızda elde edilen Stafilocok izolatlarının da söz konusu antibiyotik gruplarından olan Amoksisilin-Klavulanik asit, Ampisilin ve Penisilin G antibiyotiklerine karşı dirençli bulunduğu saptanmıştır. Bu araştırma ile subklinik mastitis etiyolojisinde yaklaşık olarak %70 oranında önemli bir rol oynayan Stafilocokların keçilerde görülen subklinik mastitis hakkındaki bölgesel profili çıkarılmıştır.

Anahtar kelimeler: Mastitis, *Staphylococcus* sp., Sekans, virulens, keçi,

ABSTRACT

INVESTIGATION OF DIFFERENT VIRULENCE PROPERTIES OF STAPHYLOCOCCUS SPECIES ISOLATED FROM GOATS WITH SUBCLINICAL MASTITIS

Dönmez E. Aydın Adnan Menderes University Health Sciences Institute of Microbiology Program, Master's Thesis, Aydın, 2020.

In our study, it was aimed to determine the virulence factors, enterotoxins and antibiotic susceptibilities of *Staphylococcus* strains isolated from goats with subclinical mastitis. *Staphylococcus* strains isolated from 110 milk samples collected from goats with subclinical mastitis constitute the basis of the study. *Staphylococcus* strains were subjected to biochemical tests and coagulase was divided into positive and negative. These isolates were genotypically typed by PCR and then sequenced analysis and full identification were performed. The types of *Staphylococcus* strains identified were Pantone Valentine Leukocidin (PVL), Clumping factor (CLFA), Coagulase (Coa), Alpha hemolysin (Hla), Beta Hemolysin (Hlb), γ -hemolysin (-hlg) and Enterotoxin by molecular methods. Antibiofilms of *Staphylococcal* isolates were performed with antibiotics frequently used in the field. As a result, 23.6% *Staphylococcus* isolation was made from the samples. As a result of the identification studies, 5 *S. equorum* (19%), 5 *S. pettenkoferi* (19%), 5 *S. epidermidis* (19%), 3 *S. warneri* (12%), 3 *S. caprae* (12%), 2 *S. capitis* (7%), 1 *S. simulans* (4%), 1 *S. hominis* (4%) and 1 *S. aureus* (4%), 15 (13.8%) *Streptococcus* sp., 13 (12%) *Bacillus* sp., 10 (9%) *Lactobacillus* sp., 7 (6.3%) *Shigella* sp., 7 (6.3%) *E. coli*, 7 (6.3%) *Corynebacterium* sp., 5 (4.5%) *Klebsiella* sp. and 3 (2.7%) *Flavobacterium* sp. isolated and identified. Bacterial growth was not observed in 17 (15.5%) samples. *Staphylococcal* isolates obtained in our study were found to be resistant to Amoxicillin-Clavulanic acid, Ampicillin and Penicillin G antibiotics, which are among the mentioned antibiotic groups. With this study, the regional profile of *Staphylococci*, which play an important role in the etiology of subclinical mastitis by approximately 70%, on subclinical mastitis in goats was obtained.

Keywords: Mastitis, *Staphylococcus* sp., Sequence, virulence, goat

1. GİRİŞ

Süt, tüm yaşlarda ki insanlar için ideal bir besin kaynağıdır ve süphessiz ki hayvansal gıdalar arasında en önemli olanlarından. Keçi sütü oldukça besleyicidir, anne sütüne benzer bir beslenme profiline sahiptir. Ancak süt kalitesi, klinik ve subklinik mastite neden olan meme bezinin bakteriyel kontaminasyonundan etkilenebilmektedir (Boscos ve ark, 1996).

Mastitis; bakteri, mantar ve virüs gibi infeksiyöz ajanların veya travmaların neden olabileceği meme bezlerinin iltihabı olarak tanımlanmaktadır. Bu etiyojilerden en yaygın olanı bakteriyel mastitistir. Mastitis sütün fiziksel, kimyasal ve bakteriyolojik özelliklerini etkilemektedir. Klinik mastitis, meme iltihabı, iltihaplanma, süt üretiminde kayıp ve süt rengindeki değişiklikler gibi patolojik değişiklikler ile karakterizedir (Koop ve ark, 2012).

Düşük keçi sütü üretimine çeşitli faktörler sebep olmaktadır, bunlardan biri mastitistir (Gelasakis ve ark, 2016). Mastitis (klinik ve subklinik) süt keçilerinde en önemli hastalıklardan biridir, çünkü bu hastalık süt veriminde önemli bir kayba neden olmaktadır (Megersa ve ark, 2010). Antibiyotiklerin meme içi uygulaması yaygın olarak keçilerde subklinik mastitisin kontrolü için uygulanmaktadır (Poutrel ve ark, 1997). Subklinik mastitis tedavisinde etkili olduğu kanıtlanmış olmasına rağmen, antibiyotikler ile tedavi hem insanda hem de hayvanlarda küresel bir endişe haline gelen antibiyotik direncine neden olmaktadır (Virdis ve ark, 2010).

Mastitis, meme bezinin iltihaplanması veya infeksiyonu, çiftliklerin çoğunda en yaygın bakteriyel hastalık olmaya devam etmektedir. Bu hastalığın tedavi ve önlenmesi, yetişkin süt sığırcılığında uygulanan antimikrobiyallerin çoğunluğunu oluşturmaktadır (Pol ve Ruegg, 2007; Stevens ve ark, 2016; Ruegg, 2017).

Klinik mastitisin keçilerde yılda %2'ye çıkabilen düşük bir insidansa sahip olduğu tespit edilmiştir (Bergonier ve ark, 2003). Subklinik mastitis durumunda, süt normal bir görünüm sergilediğinden görünür bir hastalık belirtisi yoktur. Bu yüzden hastalık sadece sütteki somatik hücrelerin miktarına dayanan teşhis tekniklerinin uygulanması ile tespit edilebilmektedir. Mastitis nakli keçiden keçiye veya sütçülerin elleri, hayvanların yattıkları yerler ile gerçekleşebilmektedir (Hernández, 2015).

Subklinik mastitisin maliyet faktörlerinden biri sütteki üretim kaybıdır. Keçi sütü, sığır sütüne göre nispeten pahalıdır ve kota sistemi yoktur. Bu nedenle, subklinik mastitis ile süt veriminin ne kadar azaldığını araştırmak önemlidir.

Mastitis, damızlık süt sistemlerinde ciddi bir problemdir. Keçilerde mastitis, genel olarak küçükbaş hayvanlarda olduğu gibi, istemsiz boşaltmanın birincil nedenidir. Keçilerde klinik mastitis nadir görülmektedir (<% 5), ancak subklinik mastitis prevalansı laktasyon başına % 20-30 olarak gözlenmiştir (Bergonier ve ark, 2003). Rupp ve Foucras (2010) Avrupa Birliği süt keçisi sürülerinde bulaşıcı mastitis görülme sıklığının %10'unun; mastitisli hayvanlarda (etkilenen hayvanlarda %20) süt azalmasına bağlı olarak gerçekleşen kayıpların yıllık 60 milyon Euro civarında olduğunu tahmin etmektedir. Yüksek hijyenik süt kalitesi, diyet sütleri (inek sütünden daha düşük miktarda uzun zincirli yağ asidi) ve taze veya olgunlaşmış peynirler gibi, keçi yetiştiricileri ve endüstri için önemlidir, çünkü sütün büyük bir kısmı yüksek kaliteli pazarlara yöneliktir (Duboeuf ve ark, 2004). Birçok ülkede, sığır ve koyunlarda mastitise direnç; üreme hedeflerini, hayvanların sağlığını ve refahını, süt ürünlerinin hijyenik kalitesini, genel verimliliği ve esnekliği iyileştirmeyi amaçlamaktadır (Heringstad ve ark, 2000; Rupp ve ark, 2002; Miglior ve ark, 2005).

Her ne kadar çeşitli patojenler bu hastalığın başlamasına yol açsa da, predispoze faktörler de önemli bir rol oynamaktadır. Önceden belirlenmiş faktörler arasında kötü yönetim ve hijyen, dağlık çevre ile ilgili koşullar, meme başı yaralanmasına yol açan hayvanların hatalı veya düzensiz sağımları, meme başı kanalının ve meme ucunun daralması bulunmaktadır (East ve ark, 1978; Lewter ve Walker, 1984).

Süt keçilerinde mastitis, süt ineklerinde olduğu gibi dünya çapında ekonomik öneme sahip bir hastalıktır. Klinik mastitis, meme dokularında ve anormal meme salgılanmasında enflamatuvar bulguların önemli klinik özelliklerini gösterirken, subklinik mastitisin tek göstergesi meme dokusunda ve sütte gözle görülür anormallikler olmadan sütteki somatik hücre sayısının daha yüksek olmasıdır. İnek sütünden farklı olarak keçi sütü, apokrin salgılama süreci nedeniyle oldukça yüksek hücre içeriğine sahiptir (Wooding ve ark, 1977).

Geçtiğimiz yirmi yılda keçi sütü üretimi, keçi sütünün beslenme özellikleri büyük ölçüde insan sütüne benzediği ve insan için sığır sütünden daha az alerjenik olduğu için önemli bir artış göstermiştir (FAO, 2013; Zenebe ve ark, 2014; Skapetas ve Bampidis, 2016).

İnfekte olmuş keçilerde meme başı belirtileri olmadığından ve anormal süt gözlenmediği için hastalığın tanımlanması gecikebilmektedir, bu yüzden subklinik mastitis sorunu daha da kötüleşmektedir (Haenlein, 2002)

Keçilerde mastite neden olan en yaygın bakteriler şunlardır: *Staphylococcus aureus*, koagulaz negatif *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactia*, *Streptococcus caprae*, *Mycoplasma capricolum*, *Enterobacteria spp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium sp.* (Rudra ve Dutta, 2018).

Mastitis, meme bezinin, meme veya sütün fiziksel özelliklerinde meydana gelen değişikliklerle karakterize enflamatuvar bir durumdur (Nazifi ve ark, 2011). Mastitis üç ana tipte sınıflandırılmaktadır: klinik mastitis (CM), subklinik mastitis (SCM) ve kronik mastitis (ChM). Klinik mastitiste süt renginde değişiklikler, sütte pıhtılaşma ve çok sayıda lökosit bulunmaktadır. Klinik vakalarda meme bezinde şişlik, ısı, ağrı ve soluklanmalar görülmektedir. Bu belirtiler memenin görsel olarak gözlemlenmesiyle tespit edilmektedir. Subklinik mastitiste, sütteki artmış somatik hücre sayısı (SCC), sütteki patojen organizmaların varlığı ve sadece tarama veya laboratuvar testleri ile tespit edilebilecek enflamatuvar bir yanıt dışında klinik bir hastalık belirtisi yoktur. Kronik mastitis aylarca süren ve bir laktasyondan diğerine devam edebilen inflamatuvar bir süreçtir. Subklinik mastitis, küçük ruminantlarda en önemli bulaşıcı hastalıklardan biridir. Ayrıca, Subklinik mastitis, tüm sürü için sabit bir infeksiyon riski teşkil etmektedir. Süt keçisi sürülerinde daha yüksek süt verimine ve süt kalitesine ihtiyaç duyulduğundan, yalnızca çiftçiye değil tüketiciyi korumak için meme infeksiyonları önlenmeli veya erken aşamada tespit edilmelidir. Mastitis, klinik bulgulara dayanarak SCC'de bir artışa ve sütteki bakterilerin tanımlanmasına dayanarak teşhis edilebilmektedir (Droke ve ark, 1993). Süt hayvanlarında SCC, mastitisin ciddiyeti ile doğrudan ilişkilidir (Pantoja ve ark, 2009). Mevsim, süt humması sıklığı ve hijyen sıhhi yönetim koşulları gibi faktörler, somatik hücre sayısını etkileyebilmektedir (Koop ve ark, 2009). Somatik hücre sayıları keçilerde sığırlara göre daha yüksektir; bu durum keçi sütündeki yüksek miktarlarda sitoplazmik parçacıklar ve epitel hücrelerinden kaynaklanmaktadır (Paape ve Capuco, 1997). Bu nedenle, artan somatik hücre sayımı yorumlanırken tür farklılıkları dikkate alınmalıdır.

Keçi mastitisine neden olabilecek en yaygın bakteriler arasında *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus pp.*, *Enterobacteria* ve *Mycoplasma sp.* bulunmaktadır (Contreras ve ark, 2007). En yaygın tanımlanan cins *Staphylococcus sp.*'dir, bu cins içinde en önemli türler *Staphylococcus aureus* ve *Koagulaz Negatif Stafilokoklardır* (KNS). *S. aureus* klinik mastitis oluşturmaktadır ve α toksininin neden olduğu gangrenöz mastitis'ten sorumludur. Keçilerde, hızlı ve etkili bir tedaviye başlanmazsa, bu toksin ile infeksiyon 24 saat içinde ölüme neden olabilmektedir. *S. aureus*, ürettiği toksinler ve süt üretimindeki azalmalar nedeniyle halk sağlığı için tehlike olarak kabul edilmektedir (Hernández, 2015). *Staphylococcus sp.* subklinik mastitis vakalarında en sık yer alan KNS'dur (Contreras ve ark, 2003). KNS ile infeksiyon, somatik hücre sayısında önemli bir artışa ve süt üretimini önemli ölçüde azaltmaya neden olmaktadır (Bergonier ve ark, 2003).

Araştırmamızda Stafilokokkal mastitisler bir bütün olarak ele alınması, suşların tüm tiplendirilmeleri, virulens genlerinin ve enterotoksinlerin varlığı, antibiyogram sonuçları ve antimikrobiyel direnç gelişimleri hakkında tam bir profil çıkarılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Staphylococcus türleri, çevresel ortamda yaygın olarak, cilt, cilt bezleri, sıcak kanlı hayvanların ve insanların mukoza zarlarında bulunmaktadır. Çiğ süt, peynir ve fermente et de dahil olmak üzere hayvansal kaynaklı gıdalardan sıkça izole edilmektedirler (Rola ve ark, 2015; Ruiz ve ark, 2016). Hayvancılıkla doğrudan temasın yanı sıra, bu ürünler, Stafilokokların insanlara bulaşması için potansiyel kaynaklardır (Spanu ve ark, 2013). Çoğu *Staphylococcus* türünün, iyi huylu gıda zehirlenmesinden, yaşamı tehdit edici toksik şok sendromuna kadar hem insanlarda hem de hayvanlarda çeşitli hastalıklara neden olan fırsatçı patojenler olarak kabul edilmesi önemli bir noktadır (Jans ve ark, 2017). Bu cinsin patojenitesi, hücre dışı proteinleri şifreleyen virulens genleri (enterotoksinler, toksik şok sendromu toksin-1 (TSST-1), nükleazlar, hemolizinler, vb.), antibiyotik direnci ve biyojenik amin üretimi ile sağlanmaktadır (Carfora ve ark, 2015; Jans ve ark, 2017).

Tarihsel olarak, iki ilişkili cins *Staphylococcus* ve *Micrococcus*'a ait bakteri türlerinin, *Micrococcaceae* ailesinin bir parçası olarak *Stomatococcus* ve *Planococcus* cinsine ait olduğu düşünülmüştür. Daha sonra, moleküler analiz ve filogenetik ve kemotaksonomik veriler Stafilokok ve Mikrokokların yakından ilişkili olmadığını ortaya koymuştur (Stackebrandt ve ark, 1997). *Staphylococcus* cinsi, kromozomal DNA'da düşük G/C içeriğine sahip Gram-pozitif bakterilerden oluşan *Bacillus-Lactobacillus*, *Streptococcus* kümesine aittir. Bergey'nin Sistematik Bakteriyoloji El Kitabı'nın (Garrity ve ark, 2004) 2. baskısı, 2004'te güncellenen *Staphylococcus* cinsini, *Jeotgalicoccus*, *Macrococcus*, *Salinicoccus* ve *Gemella* cinsleriyle birlikte *Staphylococcaceae* adlı yeni bir ailede sınıflandırmıştır (Ludwig ve ark, 2009). *Staphylococcaceae* ailesi *Bacillaceae*, *Planococcaceae*, *Listeriaceae* ve diğer aileler ile birlikte *Bacillales* ailesinin bir parçasıdır (Ludwig ve ark, 2009).

Staphylococcus, mikroskopik inceleme sonrasında, teikoik asit ve peptidoglikanı içeren tipik bir Gram pozitif bakteri hücre duvarı ile, kümeler halinde gözüken Gram pozitif, hareketsiz koklardır (Noble ve ark, 1992). Stafilokoklar, anaerobik; *S. saccharolyticus* ve *S. aureus subsp. anaerobius* hariç fakültatif anaeroblardır. Stafilokoklar genellikle katalaz pozitif olsa da, katalaz negatif olan nadir suşlarda bildirilmiştir (Över ve ark, 2000).

Stafilokok türlerinin çoğu, *S. fleurettii*, *S. lentus*, *S. sciuri* ve *S. vitulinus* hariç, modifiye oksidaz testinde oksidaz negatiftir. *Staphylococcus*, 18°C ile 40°C arasındaki bir sıcaklıkta %10 NaCl varlığında üreyebilmektedir. Tipik olarak solunum ve fermentatif bir metabolizmaya sahiptirler. Tüm Stafilokok türlerinin ortak bir özelliği, yalnızca nadir istisnalar dışında, lizostafine duyarlı olmalarıdır (Savini ve ark, 2009; Becker ve von Eiff, 2011). Stafilokok türlerinin kromozomal DNA'sındaki G/C içeriğinin yüzdesi yaklaşık % 30-40'tır. *Koagulaz Pozitif Stafilokoklar* (KPS), cins içindeki başlıca patojenik türleri temsil eder ve fibrinojeni fibrine dönüştürerek koagüle edebilen bir enzim olan koagulazı içermektedir. Tersine, koagulaz bulunmayanlar, *Koagulaz Negatif Stafilokoklar* (KNS) olarak sınıflandırılır ve genellikle tehlikeye giren konaklarda fırsatçı infeksiyonlara neden olan nispeten diğerlerine göre küçük patojenlerdir. *S. aureus* da dahil olmak üzere Stafilokoklar, genel olarak hayvanlar ve insanlarda konakçı deri ve mukoza üzerinde bulunan fırsatçı patojenlerdir. Taşıyıcı bölgelerden Stafilokoklar yayılabilir ve uzun süre hayatta kalabilecekleri ortama yerleşebilmektedirler (Neely ve Maley, 2000; Wagenvoort ve ark, 2000). Komponent olan Stafilokoklar, konakçıda cilt travması, aşılama, cihaz implantasyonu; immun sistemi baskılanmış hastalarda, hem de değişmiş bir mikrobiyota gösteren tüm mekanizmalar gibi çeşitli mekanizmalarla girmeyi başarırlarsa patojenler gibi davranabilmektedirler (Kloos ve Schleifer, 1986; Kloos ve Bannerman, 1994). İnsanlarda, hastanede edinilen *S. aureus* hastalıklarının % 80'inden fazlası, hastanın burnunda taşınan suşların neden olduğu endojen infeksiyonlardır (von Eiff ve ark, 2001). Bunların her biri birlikte ele alındığında, konakçı-patojen ilişkilerinin detaylı bir şekilde belirlenmesine izin vermek için tüm stafilokokların doğru ve güvenilir bir tür tanımlanması yapılması gerekmektedir (Kleeman ve ark, 1993; Gribaldo ve ark, 1997).

1925'te, *Staphylococcus* cinsindeki ilk farklılaşma, iki ayrı grubun, yani KPS ve KNS'nin grubunun tanımlanmasından ibaretti (von Darányi, 1925; Gherardi ve ark, 2018). Daha sonra, novobiosine duyarlılıklarına veya dirençlerine dayanarak bir başka KNS sınıflandırması, “*S. epidermidis* grubu” ve novobiosine dirençli olan “*S. saprophyticus* grubu” olarak tanımlanmıştır (Baird-Parker, 1963; Mitchell, 1967, Gherardi ve ark, 2018). Sınırlamalara rağmen, koagulaz aktivitesi ve Novobiosin duyarlılığı, Stafilokok izolatlarının varsayımsal tanımlanmasında hala kullanılan fenotipik testleri temsil etmektedir. Genel olarak, *Staphylococcus* cinsinde şu ana kadar 45 stafilokok türü ve 24 alt tür tanımlanmıştır (Euzéby, 1997; Kwok ve Chow, 2003; Place, 2003; Garrity ve ark, 2004, Spargser, 2007; Becker ve von Eiff, 2011; Bond ve Loeffler, 2012). Bu, moleküler yöntemlerle başarılmıştır. İnsan ve veteriner tıbbındaki klinik olarak en önemli türler, temel olarak koloni morfolojisi,

koagulaz üretimi, aglutinasyon analizleri ve Novobiosin ve Polimiksin B duyarlılığı gibi çeşitli anahtar özelliklere dayanarak tanımlanabilmektedir. Ayrıca, klasik fermentasyon, oksidasyon, bozulma ve hidroliz (çeşitli substratların) analizleri ticari el kitabı ve otomatik biyokimyasal sistemlere dahil edilmiştir (Becker ve von Eiff, 2011). Bununla birlikte, Stafilokokların türler düzeyinde doğru bir şekilde tanımlanması oldukça zahmetlidir, fenotipik yöntemler sıklıkla doğru tanımlamayı sağlamada başarısız olmaktadır. Bu nedenle, mikrobiyoloji laboratuvarlarına çeşitli moleküler biyoloji yöntemleri tanıtılmıştır. Bu moleküler teknikler tipik olarak birkaç türe özgü PCR primerinin veya hibridizasyon probunun kullanılmasını gerektirmektedir veya genellikle tüm bilinen türleri aynı anda ayırt edememelerine rağmen, çoklu restriksiyon enzimleri gerektirmektedir. *Staphylococcus* türlerinin tanımlanması için kısmi 16S rRNA gen dizilimi ve PCR-restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmi (PCR-RFLP) analizi tanımlanmıştır (Bialkowska-Hobrzanska ve ark, 1990; De Buyser ve ark, 1992; Becker ve ark, 2004), ancak bu yöntemler bazı stafilokok türleri arasında, yani *S. lentus* ve *S. sciuri* arasında farklılık göstermemektedir. 23S rRNA geninin PCR-RFLP analizinin iki restriksiyon enzimi ile kullanıldığı, bunun yerine *Staphylococcus* türlerini doğru tanımladığı görülmüştür (Maes ve ark, 1997), sonuçların yorumlanması karmaşıktır (Fujita ve ark, 2005). Son zamanlarda, restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizm tanıtımı yapılmıştır, zaman alıcı ve pahalı olmasına rağmen yüksek düzeyde ayırt edici olduğu kanıtlanmıştır (Taponen ve ark, 2006). Bütün genom DNA-DNA hibridizasyon analizi, iyi bir performans göstermektedir (Svec, 2006), ancak rutin uygulamalar için uygun olmadığı kanıtlanmıştır. Nükleik asitlerin kullanımı, yüksek hassasiyet ve özgüllüklerinden dolayı, doğru *Staphylococcus* sınıflamasına ulaşmak için alternatif bir seçenek sunmaktadır.

Bilimsel yayınlarda çok sayıda 16S rRNA sekansı verisinin mevcut olması nedeniyle, 16S rRNA geni bakteriyel türlerin tanımlanması için en yaygın kullanılan yöntem olmaktadır. Bununla birlikte, 16S rRNA gen dizilerinin güvenilirliği, cins düzeyinde filogenetik çalışmalarda faydalı olmasına rağmen, tür seviyesine uygulandığında tartışılabilir bir durumdadır. 16S rRNA genine (Bialkowska-Hobrzanska ve ark, 1990; De Buyser ve ark, 1992; Becker ve ark, 2004) ek olarak, 16S-23S rRNA intergenik aralık bölgesi (Maes ve ark, 1997) ve ısı şok proteini 60 geni (*hsp60*) (Goh ve ark, 1996; Goh ve ark, 1997; Takahashi ve ark, 1999), *femA* geni gibi birkaç gen hedefi (Vannuffel ve ark, 1999), *sodA* geni (Poyart ve ark, 2001), *tuf* geni (Martineau ve ark, 2001), *rpoB* geni (Drancourt ve Raoult, 2002; Mollet ve ark, 1997) ve *gap* geni (Yugueros ve ark, 2000; Yugueros ve ark, 2001), doğru tanımlama için faydalı markerler olduğu kanıtlanmıştır. *tuf* geni genellikle 16S rRNA türevli verilere göre

daha fazla tür içi sekans ayrımı göstermiştir. Görünüşe göre, *16S rRNA* geni, *tuf* geninden daha yüksek oranda korunmaktadır. *tuf* geni ile yakından ilişkili *Staphylococcus* türlerini ayırt etmek için *16S rRNA*'dan daha ayırt edici bir hedef oluşturduğu gösterilmektedir. DNA-DNA yeniden hibridizasyonu ile *Staphylococcus* türleri, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. simulans*, *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. sciuri*, *S. auricularis* ve *S. aureus* tarafından temsil edilen sekiz ayrı tür grubuna bölünebilir (Kloos ve Schleifer, 1986; Kloos ve George, 1991). *16S rRNA* dizi analizi, araştırmacıların 38 taksonda 11 geno grubu tanımlamasını sağlamıştır (*S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. simulans*, *S. carnosus*, *S. hyicus/S. intermedius*, *S. sciuri*, *S. auricularis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, ve *S. aureus*) (Takahashi ve ark, 1999; Takahashi ve ark, 1997). Ayrıntılı olarak, boşluk dizisi analizi ile tanımlanan dört grup göz önüne alındığında, birinci bölüm, “*Staphylococcus hyicus/Staphylococcus intermedius*” grubuna ait türlerle temsil edilmiştir, bu grup *S. hyicus*, *S. chromogenes*, *S. delphini*, *S. intermedius* ve *S. pseudintermedius*'tan oluşmaktadır. Veteriner sahada önem taşıyan *S. intermedius* grubuyla yakından ilişkili Stafilocok türlerinin (*S. intermedius*, *S. pseudintermedius* ve *S. delphini* dahil) aralarında kolay bir ayırım yapılmasına izin vermeyen bazı fenotipik özellikler gösterdiği tespit edilmiştir (Takahashi ve ark, 1999; Bannoehr ve ark, 2007; Sasaki ve ark, 2007; Ghebremedhin ve ark, 2008). *S. intermedius* ilk olarak 1976'da tanımlanmıştır ve *S. aureus* ve *S. epidermidis* arasında ara biyokimyasal özellikler gösterdiği için “*S. intermedius*” olarak tanımlanmıştır (Hajek, 1976; Gherardi ve ark, 2018). *S. intermedius* izolatları ile (Hajek, 1976; Devriese ve van de Kerckhove, 1979) gözlenen yüksek fenotipik değişkenlik, önemli bir genotipik değişim (Meyer ve Schleifer, 1978; Chesneau, 2000; Bannoehr ve ark, 2007) ile ilişkilendirilmiştir. *S. pseudintermedius*' un ilk tanımı 2005 yılına kadar uzanmaktadır ve fenotipinin *S. intermedius* ve *S. delphini*'ninkine benzer olduğu gözlenmiştir (ilk olarak 1988'de yunuslardan bildirilmiştir) (Varaldo ve ark, 1988; Devriese ve ark, 2005). 2007 yılında, *S. intermedius* koleksiyonlarının filogenetik analizi üzerine yapılan çalışmalar (Bannoehr ve ark, 2007; Sasaki ve ark, 2007) köpeklerden, kedilerden ve insanlardan gelen tüm suşların aslında *S. pseudintermedius* olduğunu göstermiştir. Çoğu yabani güvercin türevi türler *S. intermedius* çoğu at ve evcil güvercin türevi izolatlar *S. delphini*'ye aittir. Ayrıca, *S. intermedius* grubu içerisinde, spesifik bir multipleks PCR metodu kullanılarak güvenilir bir ayırımın elde edilebileceği de tespit edilmiştir (Sasaki ve ark, 2010). Birlikte ele alındığında, bu bulgular, geleneksel *S. intermedius* benzeri fenotipik özelliklere sahip izolatların, köpeklerden olduklarında *S. pseudintermedius* olarak tanımlanması gerektiğini öne sürmüşlerdir (Kwok ve Chow 2003; Hermans ve ark, 2010). İkinci bölüm “*Staphylococcus sciuri*” ve “*Staphylococcus*

haemolyticus/Staphylococcus simulans” gruplarına ayrılabilir. Bunlardan ilki, *Staphylococcus sciuri* ve *Staphylococcus lentus* türlerinden ve *Staphylococcus vitulinus*’tan oluşmaktadır. Bu türler novobiosine dirençli ve oksidaz pozitifdir ve hepsi *hsp60* proteinlerinde aynı karakteristik amino asit modelinden oluşmaktadırlar (Goh ve ark, 1997; Kwok ve ark 1999). “*S. haemolyticus/S. simulans*” grubu *S. haemolyticus*, *S. xylosus*, *S. muscae*, *S. simulans*, *S. schleiferi subsp. schleiferi*, *S. carnosus subsp. carnosus*, *S. caprae*, and *S. felis*’den oluşmaktadır. Son olarak, dördüncü grubu temsil eden üçüncü bölüm “*Staphylococcus aureus/Staphylococcus epidermidis*” grubudur, *S. aureus*, *S. hominis subsp. hominis*, *S. warneri*, *S. epidermidis*, *S. capitis subsp. capitis*, ve *S. lugdunensis*’tir. 16S rRNA’dan elde edilen verilerle “*S. epidermidis*” grubu beş kümeye ayrılabilir, yani *S. lugdunensis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. epidermidis* ve *S. aureus* (Kloos 1997; Takahashi ve ark, 1999), *rpoB* sekansı verilerine dayanarak, *S. caprae* ve *S. capitis*, *S. haemolyticus* grubunda olduğu görülmüştür. *S. saprophyticus* grubuna benzer şekilde, *S. epidermidis* grubu, *sodA* tabanlı çalışmada net bir şekilde belirgin bir soy oluşturmamış ve grup türleri arasında düşük bir benzerlik yüzdesi gözlemlenmiştir.

2.1. Stafilokokkal Koagulaz

Tarihsel olarak, koagulaz testleri, kalsiyum şelatlı plazma veya kanın *S. aureus* ile aşılmasının hızlı pıhtılaşmaya yol açtığının gözlenmesi 1903 yılına kadar uzanmaktadır (Loeb, 1903). O zamandan beri büyük bir ilgi ile incelenmektedir ve dayandığı protein faktörleri, yani koagulaz (*coa*) ve von Willebrand faktör bağlayıcı protein (*vWbp*) genleriyle birlikte tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Ayrıca, plazma proteinleri ile etkileşimin arkasındaki moleküler ve yapısal temel açıklanmıştır. Son olarak, bir dizi *in vivo* çalışma, *coa* ve *vWbp* salgılanmasının, stafilokok apselerinin, bakteriyeminin ve endokarditin patogenezi, hastalık kalıcılığı ile birlikte destekleyen anahtar virülans stratejileri arasında olduğunu göstermiştir (McAdow ve ark, 2012).

2.1.1. Koagulaz

Koagulasyon, trombinin olduğu serin proteaz kaynaklı reaksiyonların bir kademesidir, fibrinojenin fibrine dönüşmesinden sorumludur ve bakterilerin bir pıhtıda immobilizasyonu ve daha sonra öldürülmesi yoluyla bakteriyel patojenlere karşı savunma mekanizması olarak rol oynamaktadır (Loof ve ark, 2011). Diğer yandan bu olgu, bakteriyel immun kaçınma stratejilerinin hedefini oluşturmaktadır.

Stafilokoagulaz olarak da adlandırılan Stafilokokkal *coa*, değışken sayıda 600-700 amino asit kalıntısından oluşan ve *coa* geni tarafından kodlanan ekstraselüler bir proteindir. Serotip spesifik antikorlar tarafından pıhtılaşma aktivitesinin inhibisyonunu değerlendiren testlere dayanarak 10 stafilokoagulaz serotipi tanımlanmıştır (Ushioda ve ark, 1981; Kanemitsu ve ark, 2001). *coa* nükleotit sekansı üzerine yapılan çalışmalar, antijen kompozisyonunda gözlenen değışiklikleri açıklamıştır. *coa* molekülünde altı bölge ayırt edilmektedir; bu, koagulazı hücre dışı ortama yönlendiren bir sinyal dizisidir; protrombin bağlanmasından sorumlu D1 ve D2 bölgeleri; bilinmeyen bir fonksiyonun merkezi alanı; fibrinojen bağlama tekrarları bölgesi; ve C-terminal bölgesi, N-terminalindeki ilk 33 amino asit (sinyal peptidinin 26 amino asidi ve olgun proteinin ilk 7 amino asidi dahil) ve C-terminalindeki son 5 amino asit, 10 serotip arasında tam olarak aynı gözlenmiştir (Freidrich ve ark, 2003). Bununla birlikte, D1 ve D2 bölgeleri, sırasıyla ortalama % 52.8 ve % 60.2 amino asit kimlik oranları ile oldukça farklılık göstermektedir. Merkez bölge daha fazla korunmaktadır (% 86.7 benzerlik). Tandem tekrarlı birimlerin sayısı (2-8) değışkendir, ancak 27-amino asit dizileri korunmuş, ortalama amino asit benzerlikleri (10 serotip arasında) % 92.9 olarak tespit edilmiştir. Bu nedenle, tekrar ünitesi sayısındaki değışiklik, antijenikliğinden ziyade *coa*'nın moleküler ağırlıklarındaki farklılıkları ifade etmektedir (Watanabe ve ark, 2005). *coa* geni, kromozom üzerinde lipaz geni *geh* ile protein A geni *spa* arasında bulunmaktadır. Stafilokoagulaz ile ilişkili pıhtılaşma, fizyolojik pıhtılaşma yolundan oldukça farklıdır. *coa*, 1:1 stokiyometrik oranda protrombine ve türevlerine bağlanmaktadır, stafiloprotrombin olarak adlandırılan bir kompleks oluşturmaktadır (Morita ve ark, 1981; Hendrix ve ark, 1983). Konak infeksiyon sırasında stafilokagulaz protrombini aktive etmektedir. *coa*-protrombin kompleksi, fibrinojeni spesifik bir substrat olarak tanır, böylece doğrudan fibrine dönüştürmektedir (Panizzi ve ark, 2006). Protrombinin aktivasyonu, tipik proteolitik bölünmeden kaynaklanmamaktadır; aktif *coa*-protrombin kompleksinin kristal yapısı, *coa*'nın, N-terminalini pretrombin 2 alanının yarığına eklediğini ve böylece fonksiyonel aktif sitenin oluşumuna yol açan konformasyonel değışiklikleri indüklediği ortaya koyulmuştur (Friedrich ve ark, 2003; Panizzi ve ark, 2006). *coa* geni, üssel büyüme fazı sırasında seçici bir şekilde eksprese edilmektedir ve daha sonra düzenleyici sistem *agr*

tarafından bastırılmaktadır. Başka bir düzenleyici bölge, bakteri çevresinde fibrinojen çökmesidir (Birch-Hirschfeld, 1934).

Günümüzde koagülaz tespiti için lam ve tüp testleri halen kullanılmaktadır (Goja ve ark, 2013). Lam testinin gerçekleştirmesi çok hızlıdır ve bu nedenle stafilokokların tanısal algoritması boyunca ilk adım olarak sayılmaktadır, negatif izolatlar tüp testi ile analiz edilmektedir. Bu ikinci durumda, plazmanın pıhtılaşması ilk saatte ortaya çıkabilir, ancak sadece 24 saat içinde plazmayı pıhtılamayan izolatlar KNS olarak etiketlenir. Her ne kadar koagülaz testleri tavşan plazmasında rutin olarak yapılsa da, farklı memeli türlerinden elde edilen plazmaların test performanslarında belirgin bir farklılık gösterdiği bilinmektedir (Zojdel ve ark, 1973). Bu gözlem, *coa* ve *vWbp*'nin sorumlu olduğu olaydan ve ayrıca moleküler hedeflerinin belirlenmesinden sonra anlaşılabilir. Her iki proteinin rekombinant varyantlarını kullanarak, koagülasyon süresinin konsantrasyonlarına bağlı olduğu ve daha kısa bir koagülasyon süresinde daha yüksek bir konsantrasyona yol açtığı gösterilmiştir. Daha da önemlisi, her bir pıhtılaştırıcı faktör için farklı türlerden plazmalar için güçlü tropizm ortaya çıkarılmıştır. *coa* ayırt etmeden yaklaşık 1 saat içinde insan ve tavşan plazmasını pıhtılaştırırken, *vWbp* hem insan hem de domuz plazmasını 1 dakika içinde verimli bir şekilde pıhtılaştırmaktadır. *vWbp* ile karıştırıldıktan sonra, keçi ve koyun plazmaları 10 dakikada pıhtılaşmış, at plazması 1 saatte pıhtılaşmış ve sığır plazması 6 saatte pıhtılaşmışken, farelerden, tavşanlardan, sıçanlardan ve tavuklardan elde edilen plazma 18 saat içinde pıhtılaşmamıştır (Bjerketorp ve ark, 2004). İnsan plazmasının sadece% 1'inin ineklerden, atlardan, farelerden ve tavşanlardan elde edilen plazmaya eklenmesi *vWbp*'nin neden olduğu pıhtılaşma süresini 10 dakikaya kadar belirgin bir şekilde düşürmüştü, tavuk plazması insan plazmasına eklendikten sonra bile 2 saat içinde pıhtılaşmamıştır. Daha sonra yapılan araştırmalar, hem *vWbp* hem de *coa* tarafından farklı bir protrombin aktivasyon oranının pıhtılaşma verimliliğindeki farklılıklardan sorumlu olduğunu bulmuştur. Friedrich ve arkadaşları, kinetik ve yapısal çalışmalar kullanarak, tamamen aktif bir *coa* fragmanı olan *coa*'nın (1-325), benzer afiniteli sığır ve insan protrombinine bağlandığını, ancak sığır protrombinini çok zayıf şekilde harekete geçirdiğini göstermiştir. *coa*-(1-325) sığır protrombin kompleksi, insan ile karşılaştırıldığında yaklaşık 5800 kat daha az aktif olduğu belirlenmiştir. İlgili komplekslerin kristal yapısı, *coa*-(1-325) insan prothormbinine kıyasla, *coa*-(1-325) sığır prothormbinindeki katalitik bölgenin tam olarak oluştuğunu doğrulanmıştır. Bu nedenle *coa*-(1-325) sığır protrombinin düşük katalitik aktivitesi, düşük fibrinojen pıhtılaşma aktivitesinden esas olarak sorumlu olduğu belirlenmiştir (Panizzi ve ark, 2006). 1984'te Devriese, birçok insan *S. aureus* suşlarının, ruminant plazmalarını zayıf pıhtılaştığını

gözlemlemiştir, oysa ki ruminant izolatlar için bunun tersi geçerlidir. Ruminant suşları ruminant plazmasını iyi pıhtılaştırmaktadır; bu yüzden bu özellik suşları hayvan habitatlarının adaptasyonlarına göre sınıflandırmak için kullanılmıştır (Devriese, 1984). Son zamanlarda, farklı koagulaz aktivitesinin, *vWbp*'yi kodlayan *vwb* geninin hayvansal spesifik allellerinden kaynaklandığı ve bu *vwb* allellerinin, SaPI'ler adı verilen yüksek derecede mobil patojenik adalar tarafından taşındığı açıklığa kavuşturulmuştur. Aynı zamanda *coa* genleri kromozomal *vWbp* aksine, SAPI-kodlanmışlardır *vWbps* ruminant ve at protrombinin spesifik aktivasyonu için benzersiz bir N-terminal bölgesine sahiptirler. Ayrıca, SaPI tarafından taşınan *vwb* genleri (*vwbs*), aynı suşların kromozomal *vwb* genlerinden (*vwbc*) farklı şekilde düzenlenmiştir (Viana ve ark, 2010). *vwbc*, promotör bölgesi içerisinde ekspresyonu için gerekli olan, korunmuş bir oktanükleotit sekansı içermektedir (Harraghy ve ark, 2008). Bu dizi, her *vwbs* geninin promotör bölgesinde eksiktir ve bunun yokluğu, *saeRS* aracılı düzenleme için gerekli olmaktadır (SaPI tarafından taşınan *vwb* genleri, global regülatör *saeRS*'nin yokluğunda büyük ölçüde aşağı regüle edilirken, kromozomal genler etkilenmemektedir) (Viana ve ark, 2010). Sonuç olarak, KPS tarafından oluşturulan plazmanın pıhtılaşma yeteneği, kendilerine kromozomal olarak kodlanmış iki faktör olan, *coa* ve *vWbp* ile protrombin aktivasyonunun moleküler mekanizmalarına dayanmaktadır.

2.1.2. Stafilokokkal İnfeksiyonlarda Koagulazların Rolü

Plazma pıhtılaşması, stafilokokların KPS ve KNS türlerine sınıflandırılması için temel sağlamıştır. Koagulaz farklı virülans özellikleri ile de ilişkilidir ve eski çalışmalarda da koagulazların Stafilokok infeksiyonlarının patogeneze katkısı vurgulanmıştır (Chopman ve ark, 1934; Smith ve ark, 1947; Ekstedt ve Yotis, 1960). Bunun yanında yapılan *in vivo* deneylerin sonuçları tartışmalıdır; *coa*'nın olmaması, subkutan infeksiyon veya mastitisin fare modellerinde (Phonimdaeng ve ark, 1990) veya enfektif endokarditin sıçan modelinde *S. aureus* virülansını etkilememektedir (Baddour, 1994; Moreillon ve ark, 1995). Buna karşılık, farelerin intravenöz olarak *S. aureus* aşılmasından sonra, *coa* titresini ile pulmoner bakteri yükü arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur. İnfeksiyondan 7 gün sonra akciğerden geri kazanılan canlı bakteri sayısı, doğal fenotip suş, *coa* delesyon mutantından önemli ölçüde daha yüksek gözlemlenmiştir (Sawai ve ark, 1997). Bununla birlikte, sahadaki buluş, kanın pıhtılaşmasına neden olan ikinci salgılanan bir faktör olarak *vWbp*'nin keşfi ile gelmiştir (Bjerketorp ve ark, 2004). Rekombinant *S. aureus* suşlarını kullanan Cheng ve meslektaşları,

tek başına *coa* veya *vwb*'nin silinmesinin sadece virülansta orta derecede bir düşüşe yol açtığını, oysa *coa-vwb* çift mutantının apse veya ölümcül olma yeteneğinde, farelerde sepsiste büyük bir azalma sergilediğini göstermiştir (Cheng ve ark, 2010). Bu nedenle, apse oluşumu için kombine *coa* ve *vWbp* gereklidir. Stafilocok infeksiyonu patojenitesinde ilk adım; cerrahi yaralar ve tıbbi cihazlar dahil olmak üzere çeşitli yollardan dokuların ve/veya kan dolaşımının bakteriyel istilası ile temsil edilmektedir (Lowy, 1998). Daha sonra bakteri hızla yayılır ve cerrahatli lezyonlara neden olmaktadır. Stafilocoklar, organizmayı bağışıklık sistemi hücrelerinden koruyan yalancı kapsüller içindeki lezyon merkezinde topluluklar halinde büyürler. Son olarak, apse boyutlarında büyür ve yırtılır. Patojenlerin kan damarlarına girmesini ve infekte olmayan bölgelere yayılmasını sağlamaktadır (Cheng ve ark, 2009). Histokimyasal boyama, protrombin ve fibrin ile yalancı kapsüller içindeki *coa* birlikte tanımlanmış ve apse lezyonlarının çevresinde, *coa*, *vWbp*, protrombin ve ayrıca fibrinojen/fibrin birlikte lokalize edilmiştir. Bu nedenle, *coa* ve *vWbp*, yalancı kapsüller içerisinde stafilocok topluluklarının kurulmasına ve daha sonra apse gelişimine çok önemli katkı sağlamaktadır. Apse lezyonlarının oluşumu koagulaz spesifik antikorlarla inhibe edilebildiğinden, bu virülans faktörlerinin antistafilocok aşılarını tasarladıkları düşünülmüştür (Cheng ve ark, 2010).

Özetle, Stafilocokkal *coa* ve *vWbp*, memeli koagülasyonunu patojenik bir belirleyici olarak kabul etmektedir. Protrombinin enzimatik olmayan aktivasyonu ile bu koagulazlar fibrinin polimerleşmesini tetiklemektedirler. Bakterilerin fibrin birikimi ve çapraz bağlanmasının, tipik olarak infeksiyon yükünü azaltan hayvan doğal immun savunmasını temsil ettiği gözlemlenmiştir. Paradoksal olarak, *S. aureus*, plazma pıhtılaşmasını indüklemek için koagulaz uygular ve bu da bakterilerin konakçı immun sisteminin bakterisit aktivitesinden kaçmasına izin vermektedir. Bu nedenle, koagulazlar sepsis ve endokarditin yanı sıra, apse patogenezi ve infeksiyon kalıcılığını destekleyen ana virülans stratejileri arasındadır (McAdow ve ark, 2012). Stafilocok koagulazları (*Coa*, *vWbp*), protrombinin aktivasyonu yoluyla kanın pıhtılaşmasına neden olan salgı proteinleridir. Plazma stafilocokları pıhtılaşma yeteneklerine bağlı olarak, koagulaz pozitif veya koagulaz negatif olanlara bölünebilirler. Plazmayı koagüle etme yeteneği, bu bakterilerin tanısında ilk adımdır, çünkü *coa* ve *vWbp* salgılanması, stafilocokların konakçı savunma sisteminin üstesinden gelmesini sağlayan ana virülans stratejileri arasındadır. Protrombin koagulazlarının nonenzimatik aktivasyonu, fibrin polimerizasyonunu tetikler, bu da bakterilerin pıhtıdaki çapraz bağlanmasıyla sonuçlanır, bu da bakterilerin konakçı bağışıklık sisteminin bakterisit aktivitesinden kaçmasına izin vermektedir. Ek *vWbp*'nin geliştirilmesi, belirli konakçı

plazmanın koagülasyon kinetiğini artırır, bu sadece stafilokok suşlarının konakçı tercihini değil aynı zamanda bu bakterilerin virülansındaki koagülazların önemini göstermektedir.

2.2. Stafilokokkal Hemolizin

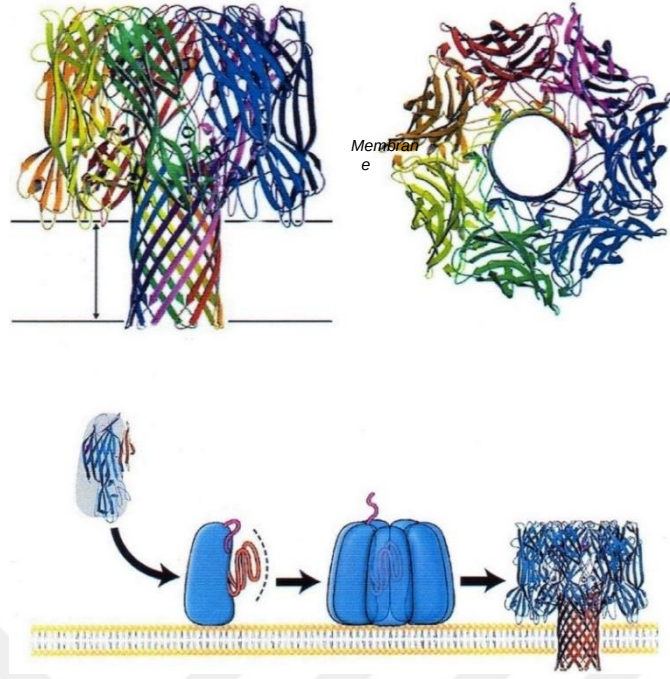
2.2.1. Stafilokokkal α -hemolizin

S. aureus ve diğer Koagülaz Pozitif Stafilokoklar (KPS) tarafından salgılanan birkaç sitolitik toksin arasındaki ana bileşik α -hemolizindir (α -toksin, Hla). α -hemolizin, son otuz yılda büyük ölçüde ve kapsamlı bir şekilde incelenmektedir (Freer ve Arbuthnott, 1983; Bhakdi ve Trantum-Jensen, 1991; Dinges ve ark, 2000; Berube ve Vubek, 2013). Toksin, kanlı agarda, çok çeşitli memeli eritrositlerinde (tavşan, koyun, öküz) toksik etkiler uygulayan geniş bir tam hemoliz bölgesi oluşturmaktadır (Hebert ve Hancock, 1985). Tavşanlarda, LD50'nin (2 μ g / kg vücut ağırlığı) öldürücü olduğu gözlenmiştir. LD50, herhangi bir hayvan türünde test edilen en düşük toksik dozu temsil etmektedir (Arbuthnott, 1983). Toksin, cilt hücrelerinin nekrozunun ve ölümcül infeksiyonun nedeni olarak, hem insanlarda hem de hayvanlarda nörotoksik etki olarak, çeşitli hücre tipleri üzerinde sitotoksik etkiler uyguladığı kabul edilmiştir. α -hemolizin, *S. aureus*'ta tek kopya kromozomal *hla* geni tarafından kodlanmaktadır, *S. aureus* suşları arasında korunmaktadır ve 1984'te klonlanmıştır (Gray ve Kehoe, 1984). *hla* lokusunu kodlayan 319 amino asit proteini vardır. İlk 26 bölme N-terminali bir sinyal peptidi oluşturmaktadır. Olgun protein, molekül ağırlığı yaklaşık 33 kDa ve yaklaşık 8.5 pI olan 293 bölmeden oluşmaktadır. Olgun protein tamamen β -tabakalarından oluşmaktadır ve β -fiç (barrel) gözenek oluşturuşu sitotoksin sınıfının prototipi olarak kabul edilmektedir (Bhakdi ve Trantum-Jensen, 1991; Parker ve Feil, 20005; Prevost ve ark, 2005). Birçok küresel düzenleyici sistem *hla*'nın kontrolünü sağlamaktadır (Recsei ve ark, 1986). Aksesuar gen regülatörü, *agr* lokusu, düzenleyici bir RNA molekülü (RNAIII) ile birlikte (Novick ve ark, 1993; Lina ve ark 1998) bir çekirdek algılama sistemi ile *hla* ekspresyonunun kontrolünden sorumludur (Peng ve ark, 1988). Aksesuar gen regülatörü *hla*'nın ekspresyonunu ve salgılanmasını artırırken, toplam α -toksinin sadece %1'i hücre ile ilişkili kalmaktadır. ekspresyon seviyeleri aynı zamanda hem *Sae* hem de *Sar* düzenleyici sistemleri tarafından ayarlanabilmektedir (McNiven ve Arbunott, 1972; Novick ve ark, 1993; Toita ve Kamio, 1997; Lina ve ark, 1998; Lyon ve ark, 2002; Koenig ve ark, 2004).

α -toksin hidrofilitir; yedi monomer toplanarak hedef hücrenin zarına silindirik bir heptamer oluşturmaktadır (Gouan ve ark, 1994; Valeva ve ark, 1997). Bu oligomerik form 1-3 nm gözenekler oluşturarak ökaryotik hücreleri parçalayabilmektedir (Freer ve ark, 1968; Belmonte ve ark, 1987), eritrositleri parçalama yeteneğinde tanımlayıcı bir özelliğidir. Monomerlerde ve sonuç olarak oligomerlerde üç alan iyi bilinmektedir; Membran üzerinde duran kapak; konakçı zarının dış bölümünün üzerine yerleştirilmiş kenar; ve membranı delerek β gözeneğini oluşturan kök (şekil 1) (Montaya ve Gouaux, 2003). Monomerlerin hücre zarına bağlanması ve birleşmesi arkasında iki farklı yol bulunmaktadır (Hildebrand ve ark, 1991). Düşük konsantrasyonda, hücre yüzeyi reseptörünün monomerleri bağlaması, yüksek konsantrasyonda α -toksinin membran lipidlerine bağlanması spesifik değildir.

Tablo 1. *Staphylococcus* hemolizinin ifade edilen farklı özellikleri (Suttorp ve ark, 1985; Jonas ve ark, 1994; Berube ve Bubek, 2013)

Hemolizin	Duyarlı Eritrositler	Sıcak-Soğuk Olgusu	Substrat	Aktivite
Alfa Hemolizin	Tavşan,Koyun, Öküz	-	ADAM10, Lipidler	Dermonekrotik, Ölümcül, Lösetoksik
Beta Hemolizin	Koyun, Öküz, İnsan	+	Sfingomiyelin	Düşük Öldürücü
Gama Hemolizin	Tavşan, İnsan, Koyun	-	?	Ölümcül
Delta Hemolizin	İnsan, Tavşan, Koyun, Maymun, At	-	Fosfatidilinositol	Hafif Dermonekrotik, Ölümcül, Lösetoksik



Şekil 1. Membrana dik olarak ve yedi kat simetri eksenini boyunca görülen α -hemolizinin yapısı (A) alfa-hemolizinin monomer düzeneğinin mekanizması (B) (Montaya ve Gouaux, 2003).

Song ve arkadaşları (1996) X-ışını kırınımı analizi ile monomerlerin hücre zarına nüfuz ettiğini, iki tabakalı olarak difuze olduğunu tespit etmişlerdir ve Valeva ve arkadaşları tarafından onaylanan, heptamerik 1-2 nm gözenek oluşturduğunu bulmuşlardır (Valeva ve ark, 1997). Toksinin, çeşitli hücre tiplerinde zarlar boyunca iyon iletimi için beklenmeyen gözeneklerin oluşması nedeniyle konakçı üzerinde çeşitli etkileri oluşmaktadır (Bhakdi ve Tranum-Jensen, 1991). Elde edilen gözenek K^+ ve diğer küçük moleküllerin hızlı bir şekilde dışarı akmasını ve molekül ağırlığı 1 olan Na^+ , Ca^+ ve diğer küçük moleküllerin akışını sağlamaktadır ve bunun sonucunda eritrositler lize olmaktadır. İnsan eritrositleri, tavşan eritrositleriyle karşılaştırıldığında daha az miktarda lize olmaktadır. α -toksin birçok hayvan sisteminde de dermonekrotik, nörotoksik ve öldürücü etkiye sahiptir. Fibroblastlar ise tam tersi olarak, düşük doz α -toksine maruz kaldıklarında hasarlarını onarabilmektedirler. Sonuç olarak; ölümcül hastalık, hemoliz ve dermonekroz, α -toksinle ilişkili ana belirtilerdir (Burnet, 1929), ancak toksinlerin ve çok çeşitli konakçı hücreleri arasında karmaşık bir etkileşim olarak tanımlanmıştır (Tablo 1) (Suttorp ve ark, 1985; Jonas ve ark, 1994; Berube ve Bubeck, 2013)

Etkilerin seviyesi ve tipi, α -toksin için bir hücre zar reseptörünün varlığı hakkında bir hipotez sunmaktadır (Cassidy ve Harshman, 1976; Hildebrand ve ark, 1991; Valeva ve ark, 2006) Ancak, önerilen modeller veya deneysel sonuçlar, hücre tipini ve tür spesifikliğini açıklayamamıştır. Son olarak, Wilke ve Bubeck (Wilke ve Bubeck, 2010) bir disintegrin ve

metaloпротеаз 10 (ADAM10)'un α -toksin için aday bir protein reseptörü olduğunu bildirmiştir. ADAM10, *Hla* ile etkileşime girer ve toksin monomerlerini bir sitolitik gözeneğe birleştiren olaylar dizisini başlatmak için gereklidir. *Hla*'nın ökaryotik hücelere bağlanması için ADAM10 gerekmektedir. ADAM10, konakçı hücrelerin zarından *Hla* ile çekilmektedir. ADAM10, toksin bağlanması ve oligomerizasyon için gereklidir (Cassidy ve Harhsaman, 1976). *hla* aracılı sitotoksistide, çoğunlukla düşük toksin konsantrasyonlarında ADAM10'a ihtiyaç duyulmaktadır (Wilke ve Bubek, 2010). α -toksin türü özgülüğünün, tavşan eritrositlerinde ADAM10 ekspresyonu ile bağlantılı olduğu, ancak insan kırmızı hücre yüzeyinde olmadığı gösterilmiştir.

2.2.2 Stafilokokkal β -Hemolizin

β -hemolizin Glenny ve Stevens tarafından tanımlanmıştır (Glenny ve Stevens, 1935; Pontieri, 2018). α -hemolizinden farklı olarak, β -toksin koyun, öküz ve insan üzerinde yüksek derecede hemolitik etkiler göstermektedir, fakat kobaylarda, farelerde ve tavşan eritrositlerinde ne dermonekrotik ne de öldürücü etkiler gözlenmemiştir (Tablo 2). Agar üzerindeki toksin, geniş bir hemoliz alanı oluşturmaktadır (Hebert ve Hancock, 1985). Bu toksini kodlayan gen Projan ve arkadaşları tarafından sekanslanmıştır (Projan ve ark, 1989). *Hlb* olarak adlandırılır, tamamen kromozomaldır ve 4 kb Karyofanon latum L *Cla*I ile kavranmış DNA fragmanı üzerinde bulunmaktadır. Protein, 39.000 moleküler ağırlığa sahip 330 amino asitten oluşmaktadır, ancak oluşumu sırasında ilk 34 amino asit tarafından temsil edilen sinyal peptidi ortadan kaldırılmaktadır. Elde edilen peptit, 35,000 molekül ağırlığında ve pH 9'un üzerinde izoelektrik noktasına sahip olan olgun proteindir. β -hemolizin, çok sayıda *S. aureus* suşu, özellikle hayvan izolatları ve bir veteriner hastalığı yanı sıra ortaya çıkan bir zoonotik insan patojeni olan *S. pseudintermedius* gibi diğer KPS tarafından üretilmektedir. Protein sfingomiyelinaz aktivitesi göstermektedir, litik aktivite sfingomiyelin ve lizofosfatidilkolin ile sınırlıdır (Doery ve ark, 1965). Farklı eritrositlerde bulunan farklı sfingomiyelin içeriği, çeşitli hemolitik etkileri açıklamaktadır. 37°C'de inkübasyondan sonra 10°C'nin altındaki ikinci bir inkübasyonun, hemolizi arttırdığı gözleminden sonra toksinin “sıcak-soğuk” hemolizin olarak tanımlandığını ve kolonilerin etrafındaki α -hemolitik bandın tamamen β hemolitik olmasını sağladığı; bir açıklama olarak, düşük sıcaklığın toksin tarafından zarı faz ayrılmasına ve iki tabakalı çökmeye izin verdiği düşünülmektedir (Low ve Freer, 1977).

2.2.3 Stafilokokkal γ -Hemolizin

İlk olarak Smith ve Price (Smith ve Price, 1938) tarafından tanımlanan γ -Hemolizin, çeşitli stafilokok kültür sıvılarından izole edilen PVL (Panton-Valentine Leukocycin), LukED ve LukGH'i (Panton ve Valentine, 1932; Graduet ve Price, 1938; Marinagave ark, 2003; Ventura ve ark, 2010) kapsayan iki bileşenli bir sitotoksin grubunun bir üyesidir. Toksin, Woodin tarafından tarif edildiği gibi S bileşeninde (yavaş elüsyon) ve F bileşeninde (hızlı elüsyon) iyon değişim kolonu elüsyonu ile ayırt edilen iki ilişkisiz ve suda çözünür peptit tarafından meydana gelmektedir (Woodin, 1959). γ -Hemolizin, *S. aureus* suşlarının neredeyse tamamı tarafından üretilmektedir. γ -hemolizin, özellikle nötrofiller (10 ng / mL'de eylem) ve makrofajlar ve birçok memeli eritrositleri üzerinde sitolitik aktivite uygulamaktadır (Prevost ve ark, 1995a; Tomita ve Kamio, 1997; Vandenesch ve ark, 2012). Agar toksik aktiviteyi inhibe ettiği için γ -hemolizinin hemolitik etkileri kanlı agar plakaları üzerinde saptanamamaktadır (Prevost ve ark, 1995a, Prevost ve ark, 1995b). γ -Toksin, *hlg* lokusu, iki S bileşeni, *HlgA* ve *HlgC* ve bir F bileşeni, *HlgB* tarafından kodlanmaktadır. Üçgen bir kümede, sırayla *hlgA*, *hlgC* ve *hlgB* (Cooney ve ark, 1993) 4.5 kb *ScaI* ile kavranmış bir kromozom parçası üzerinde bulunmaktadır. Hemolitik ve lökotosik aktivite, bu DNA fragmanını içeren bir klondan elde edilen ekstraktlarla gösterilmektedir. *hlgA* ayrı olarak ifade edilirken, *hlgC* ve *hlgB* tek bir *mRNA* üzerine kopyalanmaktadır. Daha önce, *HlgB* ve *HlgC* sırasıyla gama-hemolizinin γ_1 ve γ_2 bileşenleri olarak adlandırılmıştı; *HlgB* ve *HlgC*'nin birlikte γ -hemolizini (sırasıyla F ve S bileşenleri) oluşturduğu bilinmektedir.

2.3. Stafilokokkal Panton-Valentine Lökosidin (PVL)

Staphylococcus aureus bir dizi molekül üretmektedir, bu moleküllerden bazıları bakterilerin konakçı bağışıklık tepkilerini "aldatmasını" sağlayan moleküllerdir. Bu moleküller virulens faöktörleridir. Virülans faktörleri arasında gözenek oluşturuçu sitotoksinler bulunmaktadır, sitoplazma zarında gözenekler oluşturarak farklı memeli hücrelerinin parçalanmasına neden olabilmektedirler. Fagositler (nötrofiller, monositler ve makrofajlar) ve/veya lenfositler de dahil olmak üzere lökositlerin yok olmasına neden olan sitotoksinlere lökotosinler denir. Lökositotoksik aktivite, infekte olan bakterilerin

infeksiyonun ilk aşamalarında konakçı organizmanın içinde hayatta kalmasını sağlamaktadır. Bu lökotoksinlerden biri Panton-Valentine lökosididir (PVL) (Aman ve ark, 2010).

PVL ilk olarak 1894 yılında van de Velde tarafından, *S. aureus* tarafından üretilen ve lökosit lizisine neden olan "madde lökosit" veya lökosit olarak tanımlanmıştır (Lo ve Wang, 2011). Panton-Valentine lökosidin ismi Sir Philip Noel Panton ve Francis Valentine'den gelmektedir, 1932'de PVL'yi hemolizinlerden ayırmışlardır ve PVL varlığı ile cildin ve yumuşak dokuların ciddi infeksiyonları arasında bir ilişki olduğunu göstermişlerdir (Panton ve Valentine, 1932; Lo ve Wang, 2011).

PVL, Stafilokokkal sinergohymenotropic (SHT) toksin ailesine ait bir çift bileşenli sitotoksindir. *Staphylococcus* genomu üzerinde bulunan ve bir profaj üzerinde taşınan iki bitişik ve birlikte kopyalanan gen tarafından kodlanmaktadır. Bu genlerin ürünleri, nötrofiller, monositler ve makrofajlar dahil olmak üzere memeli lökositlerinin zarı boyunca gözenekler oluşturan ve salgılanan iki protein 'LukS-PV ve LukF-PV'dir. Oluşan gözenekler hücre içeriğinin dışarı çıkmasına neden olarak lizise yol açmaktadır. Ek olarak, düşük (sublitik) konsantrasyonlarda PVL toksininin pro-enflamatuvar faktörlerin üretimini arttırmak için nötrofilleri uyarabildiği gösterilmiştir (Helbin ve ark, 2012; El Haddan be Moineau, 2013). PVL, insanlarda topluma bağlı metisiline dirençli *S. aureus* (CA-MRSA) suşlarının çoğunluğu tarafından üretilmektedir (Deleo ve ark, 2010; Graves ve ark, 2010; Shallcross ve ark, 2013) ve ayrıca PVL pozitif MRSA suşlarının hayvanlardaki infeksiyonlarına dair raporlar bulunmaktadır (Rankin ve ark, 2005). PVL'nin *S. aureus* virülansındaki rolü büyük ilgi görmesine ve yoğun araştırmaların gerçekleştirilmesine rağmen, hayvanlarda gerçekleşen infeksiyonlarındaki patojenik potansiyeli ile ilgili çok fazla bilgi bulunmamaktadır (Villaruz ve ark, 2009). Son olarak, Löffler ve ark. (Löffler ve ark, 2010) kesin bir açıklama sağlamıştır. PVL'nin insan ve tavşan nötrofillerinin hızlı bir aktivasyonuna ve apoptozuna neden olduğunu keşfettiler, ancak bu etkiyi fare ve maymun nötrofillerinde gözlemlememişlerdir. Bu nedenle, bu yazarlar PVL aktivitesini açıklamak için murin ve primat (insan olmayan) infeksiyon modellerini araştırmışlardır.

2.4. Stafilokok Türlerinde Antibiyotik Direnci

Antibiyotik direnci, hem insan hem de hayvan sağlığı için önemli olan küresel bir hayvan ve halk sağlığı sorunudur. Sorun, yanlış kullanım ve antimikrobiyallerin aşırı kullanımı ile giderek hızlanmıştır, aşağıdakiler dahil olmak üzere birçok faktör tarafından antibiyotik dirençliliğinde

değişimler gözlenmektedir; bunlar genetik değişiklikler yoluyla zaman içinde doğal antimikrobiyal direnç geliştirmek için bakterilerin içsel özellikleri; uygun antibiyotik kullanımı (aşırı reçete, eksik tedavi süreci veya yetersiz dozlama), tarımda antimikrobiyal ajanların kullanımı (büyüme artırıcı veya profilaksi amacıyla); mutasyon ve transfer edilebilir genetik materyaller (plazmid, transpozonlar ve integron) olarak sayılabilir (Meervenne ve ark, 2012; Castro-Sánchez ve ark, 2016).

ABD'de antimikrobiyal direnç, iki milyondan fazla bakteriyel enfeksiyona ve 23.000 insan kaybına sebep olmuştur (CDC, 2013) Ayrıca, Avrupa Birliği'nde ilaca dirençli bakteriler yüzünden gerçekleşen ölümler 25.000, ekonomik maliyeti her yıl 1,5 milyar ABD dolarından fazladır (EMA ve ECDC, 2009). *S. aureus*, insanlarda ve çeşitli hayvan türlerinde yaygın bir komensal ve patojenik bakteri olarak kabul edilmektedir (Sung ve ark, 2008; Sakwinska ve ark, 2011). Hayvancılıktaki çeşitli enfeksiyonlara *S. aureus* neden olabilmektedir, en önemlisi sığır ve küçükbaş hayvanlarda meme içi enfeksiyonlardır, süt çiftçileri için büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Hunter, 1984; Manser, 1986; Vanderhaeghen ve ark, 2010). İlk metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) olgusu, 1960'ların başlarında metisilin klinik uygulamasının başlamasından kısa bir süre sonra, 1961'de İngiltere'de bildirilmiştir. Çok geçmeden tüm dünyada hastane enfeksiyonu kontrolüne meydan okuyan ciddi bir sorun haline geldi (Ayliffe, 1997). *S.aureus*'un metisiline direnci, beta-laktam antibiyotikler için düşük bir afiteye sahip olan penisilin bağlayıcı protein 2a'yı (*PBP2a*) kodlayan *mecA* geni aracılık etmektedir (Stryjewski ve Corey, 2014). MRSA'nın hayvanlardan izolasyonu, mastitik ineklerden süte saptanmasının ardından ilk olarak 1972'de bildirilmiştir (Devriese ve ark, 1972). Son yıllarda ise veteriner hekimlikte giderek daha acil bir sorun haline gelmiştir, atlar, sığırlar, evcil hayvanlar ve egzotik türleri içeren çeşitli türlerde enfeksiyonlar hem sağlıklı taşıyıcılar hem de enfeksiyon vakası olarak bildirilmiştir. (Lee, 2003; Strommenger ve ark, 2006; Anderson ve ark, 2008; Persoons ve ark, 2009; Weese, 2010). Mastitis, keçilerinde yüksek ekonomik kayıplar sebebi ile ciddi bir sorundur (Leitner ve ark, 2007). *Staphylococcus* cinsi, özellikle *S. aureus*, % 4-40'ı arasında değişen izolasyon sıklığı olan süt keçilerinde mastitisin en önemli bulaşma nedenidir (White ve Hinckley, 1999; Ameh ve Tari, 1999; McDougall ve ark, 2001; Contreras ve ark, 2007; Hall ve Rycroft, 2007; Leitner ve ark, 2007).

Metisilin direnci, stafilokok kromozomal kaseti üzerinde bulunan ve penisilin bağlayıcı protein 2A (*PBP2A*) veya *PBP2A_{LGA}*'yı kodlayan *mecA* veya *mecC* geni ile sağlanmaktadır (Kim ve ark, 2012). Her iki enzim de β laktamlar için düşük bir afinite göstermektedir, böylece bu antibiyotik kategorisine direnç göstermektedir (Hartman ve Tomasz, 1984; Turner ve ark, 2019).

Vankomisin, MRSA infeksiyonlarını tedavi eden ilk ilaçlardan biridir (Sorrell ve ark, 1982; Pakyz ve ark, 2008; Mermel ve ark, 2019)

2.4.1. Stafilokok Türlerinde Metisilin Direnci

S. aureus'un (SA) metisiline direnci, β -laktamaz dirençli yarı sentetik penisilinler piyasaya sürüldükten sonra ilk olarak 1961'de tanımlanmıştır (Barber, 1961). 1960'larda Avrupa hastanelerindeki salgınların ilk raporundan sonra, metisilin direnci 1980'lerde dünya çapında bir sorun haline gelmiştir ve günümüzde çok sayıda hastane infeksiyonunun sebebi olmaktadır (Chambers, 1997). Bakteriyel epidemiyolojiye moleküler yöntemlerin uygulanması, araştırmacıların metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) dolaşımının her birinin belirli bir genetik arka plana sahip epidemik klonlara bağlı olduğunu belirlemesine izin vermiştir.

Metisiline karşı ana direnç mekanizması, beta-laktam molekülleri için düşük afinite ile penisilin bağlayıcı proteinlerin (PBP) sentezini destekleyen '*mecA*' adı verilen spesifik bir genin varlığından kaynaklanmaktadır. Moleküler ağırlıklarına göre ve serin proteazlara benzer kimyasal aktiviteye sahip olarak sınıflandırılan PBP'ler olarak bilinen enzim grubu, bakteri hücre duvarının peptidoglikana çapraz bağlanmasına izin veren transpeptidasyon reaksiyonlarını katalize etmekten sorumlu gruptur. Hem penisilinler hem de sefalosporinler, PBP'leri rekabetçi bir şekilde inhibe ederek peptidoglikan oluşumuna müdahale etmektedir. β -laktamlar kovalent olarak PBP'lere bağlanır ve oldukça stabil kompleksler oluşturmaktadır. Sınırlı PBP'ler artık hücre duvarı sentezi için gerekli reaksiyonları katalize edemez duruma gelmektedir.

Stafilokok suşları *mecA* genini (veya homologu, *mecC* genini) barındırabilmektedir. Bu gen, Stafilokokkal kromozom kaset *mec* (*SCCmec*) adı verilen bir mobil genetik eleman üzerinde taşınmaktadır. *mecA* ifadesi, beta laktam antimikrobiyalleri için azalmış bir afiniteye sahip ek bir 76-kDa penisilin bağlayıcı protein (*PBP2a*) kodlamaktadır (Chambers, 1997).

PBP2a ve doğal *PBP2*, β -laktam antibiyotiklerin varlığına rağmen hücre duvarı sentezine izin verilmesi için birlikte çalışmaktadırlar, böylece penisilinler, sefalosporinler ve karbapenemlere karşı etkili bir şekilde direnç sağlamaktadırlar. SCC, *S. aureus*'un kromozomuna çok spesifik bir yerde (*attBscC*) entegre edilmiştir. SCC, *S. aureus*'un kromozomunda çok spesifik bir yerde (*attBscC*) bulunmaktadır (Llarrull ve ark, 2009).

SCCmec kompleksi tarafından kodlananlara kıyasla çok daha seyrek olan diğer metisilin direnci tipleri, β -laktamazların aşırı üretiminden veya istisnai olarak normal *PBP* genlerinin mutasyonundan kaynaklanmaktadır (McDaugal ve Thornsberry, 1986; Tomasz ve ark, 1989).

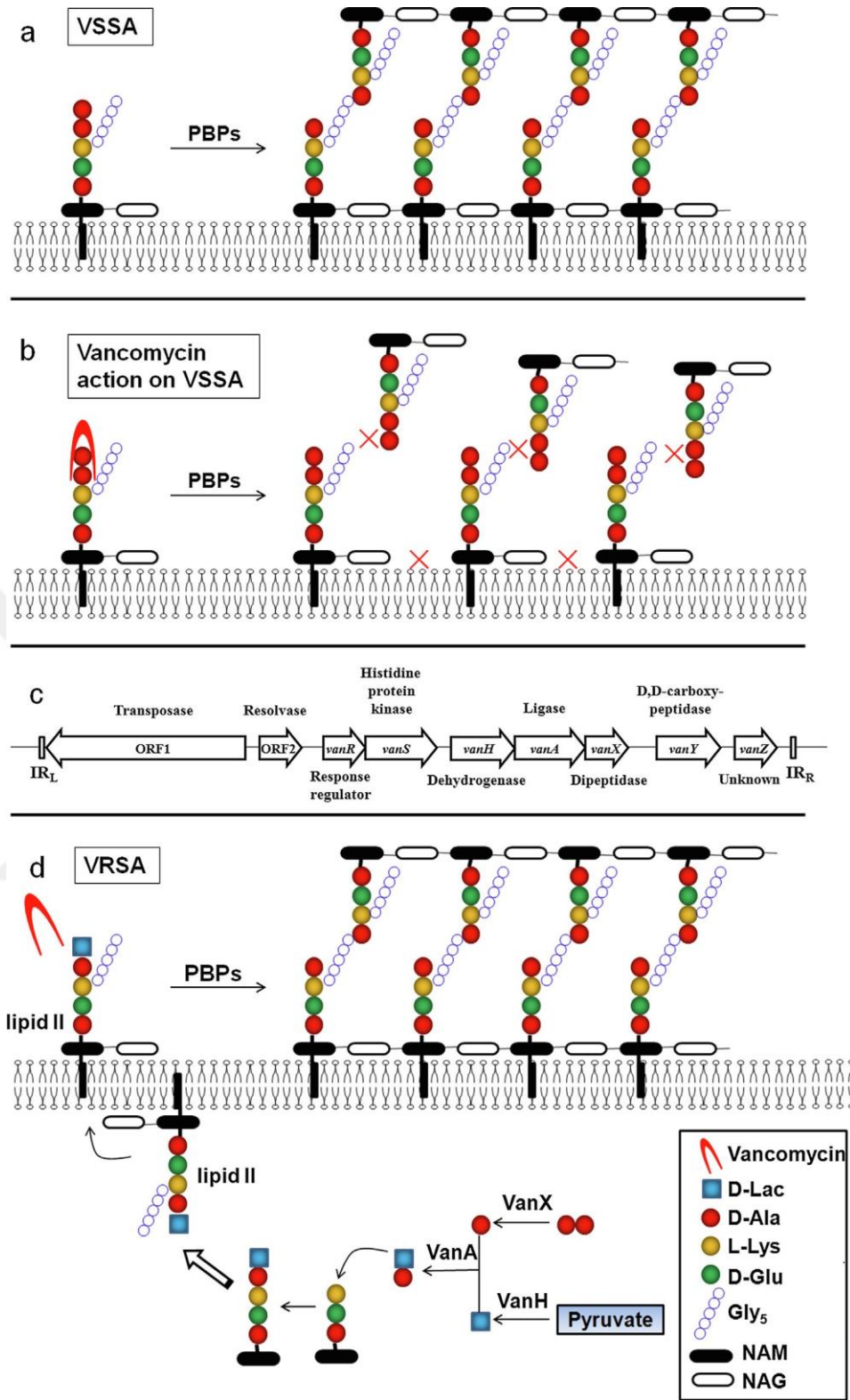
Bakteriyel dünya, çevreye uyum sağlama yeteneğinde her zaman şaşırtıcıdır. *SCCmec* kompleksinin aracılık ettiği β -laktam direnci, sadece antibiyotik basıncı temelinde açıklanamayan çok yönlü bir mekanizmadır. Bununla birlikte, bu direnç özelliği β -laktamaz dirençli yarı sentetik penisilinin klinik kullanımından sadece iki yıl sonra tanımlanmıştır. *SCCmec*'in *Staphylococcus sciuri*'den bir *mecA* homolog geniyle (bu mikroorganizma tarafından 84 kDa PBP kodlayan) ortaya çıktığını öne süren de Lencastre ve arkadaşları tarafından bu tür bir direncin kaynağının büyüleyici bir açıklamasını ileri sürmüşlerdir. Bulgu, SA izolatlarının *mecA*'sının 200'den fazla epidemiyolojik olarak ilgisiz *S. sciuri* suşu ile güçlü bir hibridizasyon verdiğini gösteren moleküler çalışmalara dayanmaktadır (de Lencastre ve ark, 2007). *S. sciuri*'deki β -laktam direnç mekanizmasının, 1949'dan beri veteriner hekimlik uygulamasında profilaktik olarak kullanılan seçici penisilin basıncının ardından başladığı varsayılmaktadır (Llarrull ve ark, 2009). Bu mikroorganizma, uygun gen komplekslerinde bulunmayan β -laktamaz üretme kabiliyetine sahip olmadığından, hayatta kalma yolunun ilaçların hedefini değiştirmek olduğu düşünülmektedir. Son zamanlarda, *Staphylococcus fleurettii* genomunun *mecA* lokusunun, *mecA* içeren *SCCmec* bölgesi ile aynı diziye sahip olduğunu gösterilmiştir. Bu sonuçlar daha önce yayınlanmış olanlarla uyum sağlamıştır, çünkü *S. sciuri*, *S. vitulinus* ve *S. fleurettii* ortak bir atadan evrimleşmişlerdir, ayrıca *S. fleurettii*'nin *mecA* gen homologlarının atalarından geldiğini ve yakın zamanda edinilmediğini göstermektedir (Tsubakishita ve ark, 2010).

2.4.2. Stafilokok Türlerinde Vankomisin Direnci

Vankomisin en eski antibiyotiklerden biridir ve yaklaşık 60 yıldır klinik kullanımdadır. Eli Lilly'nin organik kimyagerlerinden Dr. Kornield, 1957'de Borneo'nun derin ormanlarında *Streptomyces orientalis*'ten vankomisini izole etmiştir (Rubinstein ve Keynan, 2014). Glikopeptit antibiyotik olan Vankomisin 1958 yılında Gram-pozitif bakterilerin tedavisi için klinik olarak tanıtılmıştır. Bu maddenin kullanımı, hem koagülaz-negatif stafilokoklarda hem de *S. aureus*'ta metisilin direncinin yükselen prevalansı nedeniyle son 20 yılda büyük ölçüde artmıştır (Ena ve ark, 1993). Vankomisin, *Staphylococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Pneumococcus* sp., *Listeria* sp., *Corynebacterium* sp. ve *Clostridia* sp. gibi Gram pozitif bakterilere karşı aktiftir, vankomisin genellikle MRSA'nın neden olduğu infeksiyonlar ve yarı sentetik penisilin veya sefalosporin alerjisi olan hastaların tedavisi için kullanılır (Rubinstein ve Keynan, 2014). Vankomisin bu infeksiyonlar için tercih edilen ilaç olmaya devam etmektedir.

Vankomisin, duyarlı bakterilerde uygun hücre duvarı sentezini keserek bakterisidal etkisini göstermektedir. Çoğu bakteriyel membran, hücre içi yüksek ozmolarite nedeniyle hücreleri şişlik ve patlamadan koruyan bir hücre duvarı yapısı ile kaplanmaktadır. Yayılma sırasında, peptidoglikan içeren hücre duvarı yapısının büyütülmesi gerekmektedir. Bunu yapmak için, öncü lipid II, penisilin bağlama proteinleri (PBP'ler) tarafından transglikosilasyon ve transpeptidasyon yoluyla yeni ortaya çıkan peptidoglikana eklenirler (Şekil 2a). Vankomisinin hidrofilik molekülü, öncü lipid II'nin terminal *D*-alanil-*D*-alanin (*D*-Ala-*D*-Ala) kısımları ile hidrojen bağı etkileşimleri oluşturabilmektedir. Vankomisinin bağlanması, öncül maddenin büyüyen peptidoglikan zincirine ve sonrasında gerçekleşen transpeptidasyona dahil edilmesini önlemektedir, böylece hücre çeperi ayrışmasına ve bakteriyel lizise yol açan konformasyonel değişikliklere neden olmaktadır (Şekil 2b) (Hu ve ark, 2016). Bununla birlikte, vankomisinin karmaşık yapısı, Gram negatif bakterilerin dış zarından nüfuz etmesini engeller ve Gram negatif bakteriler üzerinde sınırlı bakterisidal etki göstermektedir.

Bakterilerdeki vankomisin direncine patojenlerde (*E. faecalis*, *E. faecium*, *S. aureus* ve *Clostridium difficile* gibi) bulunan glikopeptid üreten aktinomisetler (*Amiclotopsis orientalis*, *Actinoplanes teichomyceticus*, and *Streptomyces toyocaensis*) aracılık etmektedir (Patel ve ark, 2000; Domingo ve ark, 2008; Xu ve ark, 2010; Ammam ve ark, 2012;) Vankomisin direnci, *D*-alanil-*D*-laktat *D*-Ala-*D*-Lac) veya *D*-alanil-*D*-serin sentezi için anahtar enzimi kodlayan ligaz van geni homologlarının DNA sekansına dayanarak birkaç gen kümesinde sınıflandırılmaktadır (*D*-Ala-*D*-Ser).



Şekil 2. Vankomisine dirençli *Staphylococcus aureus*'un direnç mekanizması

(a) Normal peptidoglikan sentezinin şematik diyagramı. (b) Vankomisin etkisinin şematik diyagramı. (c) *vanA* kümesinin organizasyonu. (d) Vankomisine dirençli *S. aureus*'un direnç mekanizması. *D*-Ala: *D*-Alanin; *D*-lak: *D*-laktat; L-Lys: L-Lizin; *D*-Glu: *D*-glutamat; Gly₅: Pentaglisin; NAM: N-asetilmuramik asit; NAG: N-asetilglukosamin (Cong Y ve ark, 2020)

vanA, *vanB*, *vanD*, *vanF*, *vanI*, *vanM*, *vanC*, *vanE*, *vanG*, *vanL* ve *vanN* fenotiplerine cevap veren, vankomisine direnç sağlayan en az 11 *van* geni kümesi tanımlanmıştır (Boyd ve ark, 2008; Xu ve ark, 2010; Lebreton ve ark, 2011; Kruse ve ark, 2014). Bu *van* kümelerinin organizasyonu Şekil 2’de gösterilmektedir. *D*-Ala'yı kodlayan genler: *vanA*, *vanB*, *vanD*, *van F*, *vanI* ve *vanM* gibi *D*-Lac ligazları genellikle > 256 mg/ml MIC’li yüksek seviyeli vankomisin direnciyle sonuçlanmaktadır. *D*-Ala'yı kodlayan genlerden: *vanC*, *vanE*, *vanG*, *vanL* ve *vanN* dahil olmak üzere *D*-Ser ligazları genellikle 8-16 mg / ml MIC’lerle düşük seviyede dirençle sonuçlanmaktadır (Hollenbeck ve Rice, 2012)

Vankomisin, hücre duvarı disakarit-pentapeptit öncüllerinin terminal *D*-alanil- *D*-alaninine geri döndürülemez bir şekilde bağlanarak, burada bakteri hücre duvarının üretimini engelleyerek etki etmektedir. Enterokoklar, terminal alanin yerine vankomisin için büyük oranda azaltılmış bir laktat ile değiştirerek vankomisin direnci geliştirmiştir (Bugg ve ark, 1991). Vankomisine dirençli, *Koagulaz Negatif Stafilokoklar*, bu değiştirilmiş hücre duvarı öncüllerinin üretildiğini, ancak gözlemlenen direnç derecesini hesaba katmayacak kadar küçük miktarlarda üretildiğini göstermiştir (Billot-Klein ve ark, 1996). Yüksek dirençli *Koagulaz Negatif Stafilokoklardan* hücre duvarı peptidoglikanlarının analizi, duyarlı suşlara kıyasla değişmiş çapraz bağların varlığını göstermiştir (Bugg ve ark, 1991). Bu değiştirilmiş çapraz bağların, hedef peptitlere vankomisin bağlanmasını inhibe edebileceği öne sürülmüştür, ancak bu hipotez henüz kanıtlanmamıştır. *Koagulaz Negatif Stafilokoklarda* Vankomisin direncinin çok faktörlü olduğu düşünülmektedir, ancak kesin mekanizmalar aydınlatılmayı beklemektedir.

2.5. Stafilokokkal Enterotoksinler

Stafilokoklar hayatı tehdit eden bakteriyemi vakaları, yara infeksiyonları, piyojenik lezyonlar ve mastitis de dahil olmak üzere dünya çapında insan ve hayvan infeksiyonlarının nedenidir. Kronik bozukluklardan muzdarip bağışıklığı baskılanmış hastalarda Stafilokok hastalıkları genellikle daha şiddetli seyre sahiptir (Wertheim ve ark, 2005). Enterotoksinler; bazı stafilokok türleri tarafından üretilen, insan ve hayvanların bağışıklık tepkilerini kesintiye uğratan Stafilokokkal gıda zehirlenmesinin (SFP) etken maddelerinden biri olarak kabul edilmektedir. Süt hayvanlarının *S. aureus* tarafından yapılan infeksiyonları, süt ve gıda endüstrisi için önemli bir yük olmaya devam etmektedir (De Buyser ve ark, 2001) *S. aureus* tarafından üretilen enterotoksinler iyi karakterize edilmiş olmasına rağmen *Staphylococcus*

(CNS) cinsinin koagulaz negatif türlerinin enterotoksijenik potansiyeli hakkında daha az şey bilinmektedir.

S. aureus aynı zamanda en yaygın gıda kaynaklı hastalıklardan biri olan SFP'ye sebep olan bir bakteridir (Hennekinne ve ark, 2012). On yıllar boyunca *S. aureus*, enterotoksin üretebilen *Staphylococcus* cinsinin tek temsilcisi olarak kabul edilmiştir. Bugüne kadar 23 farklı *S. aureus* enterotoksini tanımlanmıştır (Thomas ve ark, 2007; Ortega ve ark, 2010; Wilson ve ark, 2011). CNS'nin çoğu insan ve hayvanlarla orantılı bir ilişki kurabildiği için CNS'nin patojenik olmadığı kabul edilmiştir (Fitzgerald ve Penades, 2008; Otto, 2010).

CNS grubu genellikle pozitif gıda florası olarak kabul edilmiştir, bu nedenle endüstride yaygın olarak uygulanmıştır. Fermantasyon süreçleri ve ürünlerin duyuşal karakteristikleri üzerindeki olumlu etkileri nedeniyle sıklıkla et ve peynir başlangıç kültürünün bir bileşeni olarak kullanılmışlardır (Hugas ve Monfort, 1997; Irlinger, 2008). Bunların yanı sıra *S. chromogenes*, *S. haemolyticus* ve *S. saprophyticus* (Crass ve Bergdoll, 1986; Da Cunha ve ark, 2006; Mazzariol ve ark, 2012; Otto, 2009; Piette ve Verschraegen, 2009; Ziebuhr, 2001) gibi hastane türlerinin yanı sıra *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. xylosus* (Taponen ve ark, 2006; Unal ve Cinar, 2012) hayvan infeksiyonlarında katılımı hakkında daha fazla ilişki ortaya çıkmıştır. Orijinal olarak *S. aureus*'ta tanımlanan ve karakterize edilen bir dizi virülans faktörü de CNS genomlarında tespit edilmiştir. Bunlar; Stafilokokkal enterotoksinler (SE), hemolizin α , β , δ ve γ , lökositidinler, eksofoliyatif toksinler A ve B ve antibiyotik direnç belirleyicileri vb. (Irlinger, 2008; Park ve ark, 2011; Podkowik ve ark, 2012).

Bugüne kadar, 60'larda keşfedilen beş klasik ve antijenik olarak farklı SE'ye (SEA'dan SEE'ye) ek olarak, 18 yeni SE veya SEL türü tanımlanmıştır (SEG-SEIU, SEIV2, SEIX) (Thomas ve ark, 2007; Ortega ve ark, 2010; Wilson ve ark, 2011; Hennekinne ve ark, 2012). SE'ler ve SELLer, 22 ila 29 kDa arasında değişen moleküler ağırlığa sahip suda çözünür, küresel ve yapısal olarak stabil proteinlerdir. SE'lerin ortak özelliği, pepsin veya tripsin gibi çoğu proteolitik enzime karşı yüksek stabilite ve direnç göstermeleridir ve bu gastrointestinal sistemdeki aktivitelerinin korunmasını sağlamaktadır (Bergdoll, 1983). Süper antijenite, SE'lerin ana özelliklerinden biridir. Diğer antijenlerin aksine, bunların antijen sunan hücreler (APCs) tarafından işlenmesi gerekmemektedir. Çoğu, APCs'ler üzerinde MHC II moleküllerinin peptit bağlayıcı oluğunun dışına ve T hücreleri üzerinde spesifik beta zincir V β dizileri taşıyan T hücresi reseptörlerine (TCRs) bağlanmaktadır. Bağlanma, APCs ve T hücrelerinin yaygın proliferasyonunu aktive etmektedir, bu da kronik bir yanıtta proinflamatuvar sitokinlerin ve immunomodülatör sitokinlerin akut kontrolsüz bir şekilde

salınmasına neden olmaktadır (McCormick ve ark, 2001). T hücre reseptörlerine (TCR'ler) bağlanmaları spesifik bir özellik değildir. Çoğu SAg için, bağlanma TCR-zinciri üzerinde değişken bir yerde gerçekleşmektedir; dolayısıyla SE'ler birçok farklı lenfosit T klonu ile etkileşime girebilmektedir (Johnson ve ark, 1991; Proft ve Fraser, 2003). Bu kitlesel olarak aktive edilen T hücreleri, anormal derecede büyük miktarda sitokin salgılar ve klonal olarak çoğalır. İnterlökin-2 (IL-2), interferon- γ (IFN- γ) ve tümör nekroz faktörü (TNF- α) gibi yüksek proinflamatuvar sitokin konsantrasyonları, yüksek ateş, kılcallığın hızlı başlaması ile karakterize edilen hastalığın gelişmesine neden olabilir. Sızıntı ve çoklu organ disfonksiyonu, toksik şok sendromu olarak tanımlanmaktadır. Serbest bırakılan sitokinlerin ani olması ve büyüklüğü hastanın ciddiyetini ve sonucunu belirlemektedir (Fraser ve Proft, 2008). Klonal proliferasyonu takiben, çoğu T hücresi aktivasyona bağlı hücre ölümüne uğrar, bu da bir klonal T hücresi delesyonuna ve hayatta kalan T hücrelerinin anergi haline gelmesine neden olur. Son çalışmalar bu T hücrelerinin fenotipik ve işlevsel olarak benzer immunosüpresif düzenleyici T hücreleri olduğunu göstermiştir (Taylor ve Llewelyn, 2010). Her ne kadar stafilokok infeksiyonlarının immunosüpresif etkisi genel olarak tüm organizma için geçerli olmasa da, patojenin konağın lokal kolonizasyonunu kolaylaştırabileceği düşünülmektedir (Proft ve Fraser, 2003; Fraser ve Proft, 2008). Son çalışmalar SAGs tarafından uzun süreli uyarıma yanıt veren T hücresi çoğalmasının tepkilerini baskılayabilen, insanlarda, kemirgenlerde ve sığırlarda CD4⁺ CD25⁺ düzenleyici T hücrelerinin gelişimini indüklediğini göstermiştir (Seo ve ark, 2007). Bu, SAG'ların neden olduğu immunomodülasyonun stafilokok hastalığında önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir.

Çiftlik hayvanları, özellikle sütleri, enterotoksijenik CNS rezervuarı gibi görünmektedir. Valle ve arkadaşları (1990) *S. chromogenes*, *S. warneri*, *S. sciuri*, *S. saprophyticus* ve *S. lentus* dahil olmak üzere sağlıklı keçiden gelen KNS türlerinin % 22'si enterotoksinleri, ağırlıklı olarak SEC'i, kendisi veya diğer toksinlerle birlikte salgılayabilmiştir. KNS halen en yaygın mastitis patojenleri olmaya devam etmektedir (Bergonier ve ark, 2003; Taponen ve ark, 2006; Ünal ve Yıldırım, 2010). *S. aureus*'a benzer şekilde, KNS'in enterotoksijenik potansiyeli ruminant mastitisinin patogenezinde dikkate alınmıştır. Koyun, keçi ve inek mastitis vakalarının sütünden izole edilen KNS suşlarından Orden ve arkadaşları (1992), SEC ve TSST-1'i saptamak için hem çift sandviç enzime bağlı immunosorban deneyi (ELISA) hem de Western blot kullanmıştır. İki *S. xylosus* suşunun SEC ürettiği bulunmuştur. Sığır mastitinden izole edilen stafilokoklarla ilgili başka bir çalışmada, enterotoksijenik KNS bulunmamıştır (Orden ve ark, 1992). Subklinik ve klinik sığır mastitis vakalarıyla ilişkili 102 CNS suşunun taranmasında SE kodlayan hiçbir gen tespit edilmemiştir

(Nemati ve ark, 2008). Başka bir çalışmada, sığır meme infeksiyonları ile ilişkili 263 CNS izolatında 18 SE ve *tst-1* geninin varlığı kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır (Park ve ark, 2011). Bu çalışmada 82 izolatın (% 31) SAg ile ilişkili en az bir geni barındırdığını ortaya konmuştur. Dikkat çekici bir şekilde *S. xylosus*'un (11/24) neredeyse yarısı ve tüm *S. hyicus* izolatları enterotoksin genleri pozitif saptanmıştır. SE genlerinin varlığı diğer virülans faktörlerini kodlayan genlerle birlikte, 18 farklı stafilokok türünü temsil eden subklinik mastitli inek ve koyunlardan 121 KNS koleksiyonunda araştırılmıştır (Ünal ve Çınar, 2012). 46 izolatta (% 38) bir veya daha fazla SE geni tespit edilmiştir, *seh* ve *sej* en yaygın SE genleri olarak tespit edilmiştir.

2.6. Stafilokokların Moleküler İdentifikasyonu ve Genotiplendirilmesi

Stafilokok türleri, insan ve hayvanların cilt ve mukoza zarlarının yanı sıra toprak, kum ve su gibi çeşitli ortamlarda yaygın olarak bulunmaktadır. Şimdiye kadar tarif edilen 45 tür ve 21 alt türün yalnızca yarısı insan örneklerinden kültürlenmiştir. *S. aureus*, cinsin klinik olarak en çok rastlanan türüdür, ancak *Koagulaz Negatif Stafilokoklar* (KNS), insan hastalığının etiyolojik ajanları olarak giderek daha fazla tanınmaktadır. KNS, tipik olarak immun sistemi baskılanmış hastaları ve implante tıbbi cihazlara sahip olanları etkileyen, hastane kaynaklı infeksiyonların ana nedeni olarak tanımlanmıştır. KNS patojenik potansiyelinin daha iyi anlaşılması için tür seviyelerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bununla birlikte, *S. aureus* ve KNS'nin ortaya çıkan klinik önemi, alt türler düzeyinde de doğru tanımlama elde etmeyi zorunlu kılmaktadır. Tür seviyesindeki bakteriyel tiplendirme, özellikle antibiyotik dirençli organizmaların ve nozokomiyal veya pandemik infeksiyonlara dahil olanların, bakteriyel hastalıkların teşhisi, tedavisi ve epidemiyolojik sürveyansı için oldukça önemlidir. Tür tiplendirme, ayrıca bakteri popülasyonu dinamiklerini belirleme çalışmasında kullanılmaktadır. Son yirmi yılda, moleküler yöntemler, bakteriyel teşhis alanındaki fenotipik deneylerin aşamalı olarak yerini almıştır ve mevcut genotipleme yöntemleri, üç ana kategoriye ayrılmıştır:

- (1) bakterileri büyüklüğüne göre sınıflandıran DNA bantlama modeli bazlı yöntemler genomik DNA'nın amplifikasyonu ve/veya enzimatik sindirimi ile oluşturulan fragmanlar;
- (2) DNA dizilerinin polimorfizmini inceleyen DNA dizisine dayalı yöntemler;
- (3) Nükleotidik prob kullanan DNA hibridizasyonu bazlı yöntemler.

Burada amaç, söz konusu yöntemlerin stafilocok tanısında uygulamalarını açıklamak ve karşılaştırmaktır (Krawczyk ve Kur, 2018).

2.6.1. Stafilocokların Moleküler İdentifikasyon Yöntemleri

Stafilocokların tanımlanması ve filogenetik çalışması için birkaç polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) sekanslama bazlı metot geliştirilmiştir. Bazı genler, örneğin, *16S rDNA* (Gribaldo ve ark, 1997; Takahashi ve ark, 1997; Becker ve ark, 2004; Onni ve ark, 2011), *hsp60* (Goh ve ark, 1996; Kwokk ve ark, 1999; Barros ve ark, 2007; Santos ve ark, 2008; Onni ve ark, 2012), *sodA* (Poyart ve ark, 2001; Sivadon ve ark, 2005), *rpoB* (Drancourt ve Raoult, 2002; Mellmann ve ark, 2006), *tuf* (Martineau ve ark, 2001; Kontos ve ark, 2003; Heikens ve ark, 2005; Ghebremedhin ve ark, 2008; Bergeron ve ark, 2011; Hwang ve ark, 2011), *gap* (Yugeros ve ark, 2000; Yugeros ve ark, 2001; Layer ve ark, 2007; Ghebremedhin ve ark, 2008), *dnaJ* (Shah ve ark, 2007; Hauschild ve Stepanovic, 2008), *nuc* (Brakstad ve ark, 1992; Barski ve ark, 1996; Hirotaki ve ark, 2011), ve *16S–23S* bölge sekansı (Jensen ve ark, 1993; Forsman ve ark, 1997; Saruta ve ark, 1997; Mendoza ve ark, 1998; Bes ve ark, 2000; Couto ve ark, 2001) moleküler hedefler olarak değerlendirilmiştir. Çok sayıda çalışma genotipleme yöntemlerinin fenotipik yöntemlerden üstün olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, bazı genlerin dizileri yakından ilişkili *Staphylococcus* türlerini ayırt etmek için yeterli değildir ve veritabanları sadece sınırlı sayıda türü içermektedir. Stafilocokkal tanımlama için kullanılan yöntemler Tablo 2'de özetlenmiştir.

Tablo 2 Stafilocokkal tanımlama için kullanılan yöntemler

Yöntem	Olasılıklar	Kaynaklar
<i>16S rDNA</i> sekansı	<i>16S rDNA</i> 'nın PCR-RFLP'si PCR ardından doğrudan sekanslama	(Gribaldo ve ark, 1997; Takahashi ve ark, 1997; Becker ve ark, 2004; Onni ve ark, 2011)
<i>Hsp60</i> gen sekansı	PCR ardından doğrudan sekanslama <i>Hsp60</i> geninin PCR-RFLP'si	(Goh ve ark, 1996; Kwokk ve ark, 1999; Barros ve ark, 2007; Santos ve ark, 2008; Onni ve ark, 2012)
<i>sodA</i> gen sekansı	PCR ardından doğrudan sekanslama	(Poyart ve ark, 2001; Sivadon ve ark, 2005)
Yöntem	Olasılıklar	Kaynaklar
<i>rpoB</i> gen sekansı	PCR ardından doğrudan sekanslama	(Drancourt ve Raoult, 2002; Mellmann ve ark, 2006)
<i>gap</i> gen sekansı	<i>gap</i> geninin PCR-RFLP'si Terminal kısıtlama fragman uzunluğu polimorfizmi (T-RFLP) PCR ardından doğrudan sekanslama	(Ghebremedhin ve ark, 2008; Yugeros ve ark, 2000; Yugeros ve ark, 2001; Layer ve ark, 2007)
<i>dnaJ</i> gen sekansı	<i>dnaJ</i> geninin PCR-RFLP'si PCR ve ardından doğrudan sekanslama	(Shah ve ark, 2007; Hauschild ve Stepanovic, 2008)

Internal transcribed
spacer PCR (ITS-PCR)

Korunmuş primerler ile tek PCR PCR-
RFLP

(Jensen ve ark, 1993; Bes ve ark, 2000;
Mendoza ve ark, 1998; Forsman ve ark,
1997; Saruta vve ark, 1997; Couto ve ark,
2001)

nuc multiplex PCR

(Hirota ve ark, 2011; Brakstad ve ark,
1992; Barski ve ark, 1996)

2.6.2. 16S rDNA Dizisine Dayalı Tür İdentifikasyonu

Mikrobiyal organizmaların sınıflandırılması için bir araç olarak, korunmuş makromoleküllerin genlerinin karşılaştırmalı DNA dizisi analizi mikrobiyolojide yaygın hale gelmiştir. En yararlı taksonomik marker molekülleri ve en çok araştırılan, daha büyük rDNA'lar ve kodlama genleridir, özellikle 16S rDNA'lar ve daha az ölçüde 23S rDNA'lardır. Açık veritabanlarında mevcut olan 16S rDNA dizi verilerinin önemli miktarda olması, bu genin birçok çalışmada en çok tercih edilen seçenek olduğu anlamına gelmektedir. Bu genin varlığı Stafilocokların tanımlanması için geniş bir şekilde incelenmiştir (Gribaldo ve ark, 1997; Takahashi ve ark, 1997; Becker ve ark, 2004; Onni ve ark, 2011)ve bu cins içinde çok olağan bir gen olduğu için kullanılan dizilerin tüm alt türlerin ayırt edilmesi için yeterince spesifik olmadığı belirlenmiştir (Becker ve ark, 2004). Buna karşılık, 16S rDNA'nın 5' ucunun hemen hemen her Stafilocok türünün tanımlanması için yeterli bilgi içerdiği tespit edilmiştir (Gribaldo ve ark, 1997). Mikroorganizmaların Ribozomal Farklılaşmasının (RIDOM) projesinin bir parçası olarak, 81 tipi için 16S rDNA'nın 5' ucunun her iki şeridinin dizilmesiyle ve geçerli olarak tarif edilen tüm stafilocok alt türlerini içeren referans suşlarının oluşturulmasıyla yeni bir ribozomal gen dizisi veritabanı oluşturulmuştur (Becker ve ark, 2004). Bununla birlikte, 16S rDNA 5' ucunun yeni belirlenmiş dizilerinin analizleri, hemen hemen tüm stafilocok türlerinin ve birkaç istisna dışında alt türlerin tanımlanması için uygun bilgiler içerdiğini ortaya konmuştur. Düşen maliyetlerle birlikte yüksek verimli dizilimin artan uygulanabilirliği, 16S rDNA diziliminin, bakteri tiplendirme alanında genel olarak biyokimyasal ve fenotipik işlemlere umut verici, hızlı bir alternatif olduğunu göstermektedir.

2.6.3. tuf Gen Dizilerine Dayalı Tür İdentifikasyonu

Uzatma faktörü Tu (EF-Tu)'yu şifreleyen *tuf* geni, peptid zincir oluşumunda rol oynar ve bakteriyel genomun temel bir bileşenidir. Bu gerçek onu teşhis amaçlı bir seçim hedefi haline getirmektedir. Martineau ve arkadaşları (Martineau ve ark, 2001), *S. aureus*, *S.*

epidermidis, *S. haemolyticus*, *S. hominis* ve *S. saprophyticus*'u hedef alan beş türe özgü prob ile kombinasyon halinde *tuf* bazlı bir PCR testi geliştirmiştir. En yaygın stafilocok patojenleri dahil olmak üzere 11 farklı stafilocok türünden *tuf* geninin yayınlanan nükleotit sekansı temelinde, Kontos ve arkadaşları (Kontos ve ark, 2003), *tuf* geninin bir kısmı için (370 bp) PCR-RFLP gerçekleştirmiş ve bu yöntemin söz konusu stafilocok türlerinin tanımlanması için güvenilir ve tekrarlanabilir olduğunu göstermiştir. Heikens ve meslektaşları (Heikens ve ark, 2005) tarafından elde edilen 16S rRNA ve *tuf* sekansı bazlı ilişkiler, daha önce yayınlanmış olan filogenetik ağaçlara (Heikens ve ark, 2005) uyum göstermiştir. Hem 16S rRNA'sından hem de *tuf* dizisinden elde edilen ağaçlar, *S. sciuri*'nin en uzak *Staphylococcus* türü olduğunu göstermektedir (Heikens ve ark, 2005). Ayrıca, *tuf* sekansından türetilmiş ağaç, *S. warneri*'nin, *S. capitis*'i içeren *S. epidermidis* grubu ile ilişkili olduğunu göstermektedir. *tuf* türevli veriler, 16S rRNA türevli verilerden türüçi dizilerinde daha sık ayrışma göstermiştir. Görünüşe göre, 16S rDNA geni, *tuf* geninden daha yüksek oranda korunmuştur. *tuf* sekanslarının ikili olarak karşılaştırılmasında, %92.6 benzerlik, 16S rDNA sekanslarında %95.9 benzerlikten daha düşük olduğu ortaya konmuştur (Heikens ve ark, 2005). Bu sonuçlar, yakından ilişkili *Staphylococcus* türlerinin farklılaşmasında, *tuf*'un, 16S rDNA geninden daha ayırt edici bir hedef gen teşkil ettiğini göstermektedir. Bu, dejenere olmayan oligonükleotit primerlerin kullanılabileceği gerçeğiyle birlikte, gerekli olan ampikonun (660 bp) küçük boyutundan gelen *tuf* sonuçlarının kullanımında ana ilgi noktasını temsil etmektedir; bu iki koşul diğer birçok hedef tarafından aynı anda gerçekleştirilememiştir (Bergeron ve ark, 2011). *tuf* geni böylece *Staphylococcus* türlerinin doğru tanımlanması için güvenilir bir moleküler araç olarak ortaya çıkmıştır (Heikens ve ark, 2005; Ghebremedhin ve ark, 2008; Hwang ve ark, 2011).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Örnekleme

Araştırmamızda, Stafilokokkal mastitislerin tespiti amacıyla CMT yapılarak subklinik mastitisli olduğu belirlenen keçilerden toplanan 110 süt örneği soğuk zincir altında ADÜ Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarına getirilmiştir. İzolasyon yapılana kadar +4°C’de muhafaza edilen subklinik mastitisli süt örnekleri araştırma materyalini oluşturmaktadır.

3.1.2. Kullanılan Solüsyonlar, Besiyerleri, Ayıraçlar

3.1.2.1. Gram boyama

Kristal viyole, distile su, lügol çözeltisi, %95 ethanol, sulu fuksin kullanılmıştır.

3.1.2.2. Besiyerleri

3.1.2.2.1. Blood agar (Merck® 1. 10886)

Blood Agar	40 g
Distile su	1000 ml

Karışımın pH'sı 7.2–7.4'e ayarlanmış, onbeş dakika otoklav edildikten sonra, 50°C'ye kadar soğutulup, içine % 7 oranında steril koyun kanı ilave edildi.

3.1.2.2.2. Trypton soya agar (TSA) (Merck 105458)

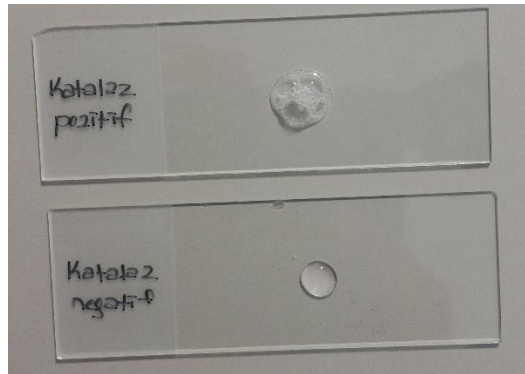
Trypton Soya Agar (TSA)	40 g
Distile su	1000 ml

Karışımın pH'sı 7.2 ± 0.2 ayarlandı, ayarlanarak otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. Otoklav sonrasında 45-50°C'ye soğutulup petrilere döküldü.

3.1.2.3. Lam katalaz testi

Besiyerlerinde üreyen birkaç koloni seçilerek öze yardımıyla temiz bir lama alınıp, birkaç damla %3'lük H_2O_2 ile karıştırılmıştır. Katalaz enzimi bulunduran koloniler H_2O_2 'yi su ve oksijene ayrıştırır, bunun sonucunda ortamdaki oksijen çıkışı kabarcık oluşumu ile gözlenmektedir (Winn ve ark, 2006).

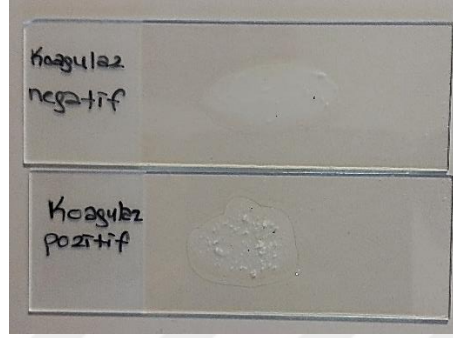
Bu işlem sonucunda kabarcık oluşumu gözlenen koloniler katalaz pozitif olarak değerlendirildi.



Resim 1. Katalaz pozitif ve katalaz negatif örnek görünümü

3.1.2.4. Lam koagulaz testi

Lam koagulaz testi için 10-15 µl tavşan plazmasına öze yardımıyla birkaç koloni eklenip karıştırıldı ve 10 saniye içerisinde bir çökelme olup olmadığı incelendi, çökelme olan örnekler koagulaz pozitif olarak değerlendirildi (UMS, 2015).



Resim 2. Lam koagulaz testinde pozitif ve negatif örnek görünümü

3.1.2.5. BD Phoenix™ ID/AST broth ve AST indikatör

TSA'da saflaştırılmış her bir örnek için 1 adet BD Phoenix™ AST broth (8 mL), 1 adet BD Phoenix AST broth (4.5 mL), 1 damla BD Phoenix AST indikatörü kullanıldı.



Resim 3. ID/AST Broth ve AST indikatörü

3.1.2.6. Solüsyonlar

3.1.2.6.1. 50X TAE (Tris, Asetik Asit, EDTA) elektroforez solüsyonu (Thermo Fisher

Scientific®)

1X TAE Kullanma Solüsyonu

Tris Base	40 mM
Asetik Asit	20 mM
EDTA	1 mM

1X TAE Kullanma Solüsyonu Hazırlanışı

50X TAE	10 ml
Distile su	490 ml

3.1.2.6.2. 6X DNA loading dye (Thermo Fisher Scientific®)

Tris-HCl 10 mM, bromfenol mavisi %0,003, xilen cyanol FF % 0,03, gliserol %60, EDTA 60 mM .

3.1.3. BD Phoenix™ M50 otomatize identifikasyon sistemi

BD Phoenix, son jenerasyon kültür ve antibiyogram sistemidir. Bu çalışmada TSA’da üreyen saf kolonilerin antibiyogramlarının ve identifikasyonlarının yapılması için BD Phoenix™ M50 otomatize identifikasyon sistemi cihazına yüklendi ve sonuçları kaydedildi.

3.1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

3.1.4.1. DNA ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu Thermo Scientific™ Genomic DNA Purification ekstraksiyon kiti kullanılarak üretici firmanın önerdiği şekilde yapıldı.

3.1.4.2. ExPrime taq premix (2X) (GeNet Bio®)

ExPrime Taq DNA Polymerase 1 ünite/10 µl, 2X reaksiyon buffer, 4 mM MgCl₂, her bir dATP, dCTP, dGTP, dTTP’den 0,5 mM, enzim stabilizatörü, sediment, loading dye, pH 9,0.

3.1.4.3. Primerler

Tablo 3. Stafilokok izolatlarının genotiplendirilmesinde kullanılan primerler

Gen	Primer Seti Sekansı (5'/3') (bp)	Ürün	Kaynaklar
16S rRNA	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG CCGTCAATTCMTTTRAGTTT	527	Hwang ve ark, 2011
coa	ATAGAGATGCTGGTACAGG GCTTCCGATTGTTTCGATGC	627,7 10,91 0	Kalorey ve ark, 2007
nuc	GCGATTGATGGTGATACGGTT AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	279	Brakstad ve ark, 1992
tuf	GCCAGTTGAGGACGTATTCT CCATTTTCAGTACCTTCTGGTAA	412	Hwang ve ark, 2011
PVL	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAAGC	433	(Elsayed ve ark, 2015)
CLFA	GGC TTC AGT GCT TGT AGG TTT TCA GGG TCA ATA TAA GC	980	(Elsayed ve ark, 2015)
Hla	CTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTG CTTTCCAGCCTACTTTTTTATCAGT	209	(Elsayed ve ark, 2015)
Hlb	GTGCACTTACTGACAATAGTGC GTTGATGAGTAGCTACCTTCAGT	309	(Elsayed ve ark, 2015)
Ý-hlg	CCAATCCGTTATTAGAAAATGC CCATAGACGTAGCCACGGAT	937	(Moore ve Lindsay, 2001)
BAP	CCCTATATCGAAAGGTGTAGAATTG GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC	971	(Vancraeynest ve ark, 2004)
Enterotoksinler			
Enterotoxin A	TTGGAAACGGTTAAAACGAA GAACCTTCCCATCAAAAACA	120	(Johnson ve ark, 1991; Cunha ve ark, 2006)
Enterotoxin B	TCGCATCAAACCTGACAAACG GCAGGTACTCTATAAGTGCC	478	(Johnson ve ark, 1991; Cunha ve ark,

Enterotoxin C	GACATAAAAGCTAGGAATTT AAATCGGATTAACATTATCC	257	2006) (Johnson ve ark, 1991; Cunha ve ark, 2006)
Enterotoxin D	CTAGTTTGGTAATATCTCCT TAATGCTATATCTTATAGGG	317	(Johnson ve ark, 1991; Cunha ve ark, 2006)
Enterotoxin E	CAAAGAAATGCTTTAAGCAATCTTAGGCCAC CTTACCGCCAAAGCTG	170	(Johnson ve ark, 1991; Cunha ve ark, 2006)
Enterotoxin G	AATTATGTGAATGCTCAACCCGATC AAACTTATATGGAACAAAAGGTACTAGTTC	642	(Johnson ve ark, 1991)

Tablo 3. Devamı

Enterotoxin H	CAATCACATCATATGCGAAAGCAG CATCTACCCAAACATTAGCACC	375	(Johnson ve ark, 1991; Cunha ve ark, 2006)
Toxic shock syndrome toxin	ATGGCAGCATCAGCTTGATA TTTCCAATAACCACCCGTTT	350	(Johnson ve ark, 1991; Cunha ve ark, 2006)
mecA	GGGATCATAGCGTCATTATTC AACGATTGTGACACGATAGCC	527	(Poulsen ve ark, 2003)
mecC	GCTCCTAATGCTAATGCA GCTCCTAATGCTAATGCA	138	(Cunha ve ark, 2011)
vanA	CATGAATAGAATAAAAAGTTGGAATA CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA	1030	(Clark ve ark, 1993)
vanB	GTGACAAACCGGAGGCGAGGA CCGCCATCCTCCTGCAAAAAA	433	(Clark ve ark, 1993)
vanC	GAAAGACAACAGGAAGACCGC ATCGCATCACAAGCACCAATC	796	(Clark ve ark, 1993)

3.1.4.4. Agaroz jel

Agaroz jel hazırlanmasında (Biomax®) marka agaroz kullanıldı.

3.1.4.5. Marker

Marker olarak GeneRuler 100 bp'lik DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific®) kullanıldı.

3.1.4.6. Ethidium Bromür (AppliChem®)

Görüntüleme için jelin boyanmasında elektroforez işleminden önce % 1' lik Ethidium Bromür 50 ml 1X TAE ile hazırlanan %1.5' lik agaroz jelin içerisine 3 µl miktarında eklenerek kullanıldı.

3.1.4.7. PCR Ürünü Saflaştırılması

PCR sonrası elde edilen ürünlerin saflaştırılması işleminde ExoSAP (GML®) kullanıldı.

3.1.4.8. Sekans PCR Ürünü Saflaştırılması

Sekans PCR işleminden elde edilen ürünlerin saflaştırılmasında Sephadex (GML®) kullanılmıştır. Karışım, 1 gr Sephadex'e steril distile su eklenerek toplam hacim 15 ml olacak şekilde hazırlanmıştır.

3.1.4.9. Kullanılan Cihazlar

3.1.4.9.1. Santrifüj Cihazı

Santrifüj işlemleri için 24 örnek kapasiteli Mikro 200R (Hettich®) santrifüj cihazı kullanıldı.

3.1.4.9.2. Termal Döngüleme Cihazı

PCR işlemleri için 96 örnek kapasiteli Applied Biosystems SimpliAmp™ PCR System thermal cycler (ABD) 96 örnek kapasiteli termal döngüleme cihazı kullanılarak yapıldı.

3.1.4.9.3. Elektroforez Cihazı

Biorad® marka elektroforez tankı kullanıldı, güç kaynağı olarak Thermo Fisher Scientific® EC250-90 kullanıldı.

3.1.4.9.4. Görüntüleme Cihazı

Vilber Lourmat® Infinity VX2 1100 marka görüntüleme cihazı kullanıldı.

3.1.4.9.5. Saflaştırılmış PCR Ürünü Ölçüm Cihazı

PCR ürünlerinin saflaştırma işleminden sonra DNA miktarlarının ölçülmesi amacıyla Nanodrop (MAESTROGEN®) marka spektrofotometrik cihaz kullanıldı.

3.1.4.9.6. DNA Sekans Cihazı

Saflaştırılan sekans PCR ürünlerinin DNA sekans analizleri için Genetic Analyzer 310 (ABI PRISM ®) cihazı kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1 Örneklem

Aydın ilinde yer alan, keçi yetiştiriciliği yapan çiftliklerden 2019 Eylül ve 2020 Şubat ayları arasında araştırmanın materyalini California Mastitis Testi ile subklinik mastitis teşhisi konulan hayvanlardan alınan sütler oluşturmaktadır. Süt numuneleri alınırken meme başları %70'lik alkolle temizlendikten sonra ilk 2 sağımlık süt başka bir kaba sağıldı daha sonra süt numunesi steril tüplere 10 ml olacak şekilde örneklem tamamlandı. Numunelerin alındığı hayvanlar sağımlık döneminde ve son 1 ayda antimikrobiyel tedavi yapılmamış, en az bir doğum

yapmış kıl keçilerinden oluşmaktadır. Alınan numuneler soğuk zincir altında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilimdalı Laboratuvarına getirildi. Numuneler analizler yapılncaya kadar +4°'de saklandı.

3.2.2. Stafilokok İzolasyonu

Anabilim dalımızın laboratuvarına getirilen subklinik mastitisli süt örnekleri oda ısısına getirilerek vortekslenmiştir. Süt örnekleri kanlı agar agara ekilerek 37°C de 24 saat inkubasyona bırakılmıştır. İnkubasyon sonucunda agarda oluşan kolonilerin üremeleri, morfolojileri ve saflık dereceleri kontrol edildi. Saf kültürler Gram boyama metodu ile boyandı. Gram pozitif koklara katalaz testi uygulandı ve katalaz pozitif olan suşlar koagulaz testine tabii tutuldu. Koagulaz testi sonucunda izolatlar Koagulaz pozitif ve Koagulaz Negatif olarak iki grup altında kayıt altına alındı. Bu izolatlar Triptik Soy Agar petrilere pasajlanarak 37°C de 18 saat inkubasyona bırakıldı. (Holt ve ark, 1994).

3.2.3. Gram Boyama

Kanlı agarda üreyen koloniler Gram boyama tekniği ile boyandı. Temiz bir lam üzerine fizyolojik tuzlu su damlatılarak morfolojik olarak *Staphylococcus* sp. kolonilerine benzeyen koloniler alınarak lamda homojenize edildi. Hazırlanan lam oda ısısında kurutuldu ardından ateşte fikze edildikten sonra 2 dakika kristal viyole çözeltisi ile muamele edildi, sonrasında distile su ile lam yıkandı. Preparatın üzerine lugol çözeltisi eklenerek kaplandı ve 1 dakika bekletildi. Preparat distile su ile yıkandı. Preparatın üzerine %95'lik etanol karışımı eklenerek 10-15 saniye beklendi. Preparat distile suyla yıkandı. Ardından preparatın üzerine sulu fuksin çözeltisi eklendi ve 30 saniye beklendi. Son olarak preparat bol distile su ile yıkandı. Preparat kurutma kâğıdı ile kurutuldu. Işık mikroskopunda 100'lük büyütmeyle incelendi. Mor renkte görülen mikroorganizmalar (Gram (+)), katalaz testine tabi tutuldu katalaz pozitif görülen koklara koagulaz testi de uygulanarak Stafilokokların konvansiyonel

identifikasyonu yapıldıktan sonra BD Phoenix™ cihazında bakteriyel identifikasyon ve antibiyogram yapılması için kaydedildi.

3.2.4. Otomatize İdentifikasyon Cihazına Yükleme

Gram boyama yapıldıktan sonra mikroskop altında Gram pozitif kok olarak görülen koloniler Tryptic Soy agara saflaştırılma amacıyla pasajlandı. TSA'ya ekilen koloniler 37°C etüvde 24 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonucunda TSA'da oluşan saf kolonilerin BD Phoneix™ 50 otomatize identifikasyon cihazına yüklenerek identifikasyon ve antibiyogramları yapıldı.

3.2.5. Bakteriyel İzolatların BD Phoenix™ ile İdentifikasyonu

Bu yöntem seçilmiş antimikrobiyal ajanları içeren birçok aerobik ve fakültatif anaerobik Gram pozitif ve negatif bakterinin hızlı tanımlanması ve duyarlılık testi için kullanılmaktadır. Gram boyama işlemi yapıldıktan sonra mikroskop altında Gram pozitif kok olarak görülen koloniler Tryptic Soy agara saflaştırılma amacıyla ekildi. TSA'ya ekilen koloniler 37°C etüvde 24 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonucunda TSA'da oluşan saf kolonilerin BD Phoneix™ 50 otomatize identifikasyon cihazına yüklenerek identifikasyon ve antibiyogramları yapıldı.

Tryptic soy agarda saflaştırılmış 24 saatlik taze kültürler cam tüplerde hazır bulunan ID broth ile McFarland 0.5 koloni yoğunluğuna göre süspansiyon hazırlandı. Gram pozitif bakteriyel izolatlar için BD Phoenix PMIC/ID87 panel kiti kullanıldı. Her bir örnek için ayrı ayrı hazırlanmış olan ID Broth süspansiyon tüpleri ve her örnek için ayrı paneller kullanılarak bakteri teşhisi için cihaza yerleştirildi. Cihazdan elde edilen biyokimyasal identifikasyon verileri değerlendirmeye alındı.

3.2.6. BD Phoenix™ ile Teşhis Edilen Bakteriyel Türlerin Antibiyotik Duyarlılığının Belirlenmesi

Otomatize cihaz ile bakteriyel identifikasyonu yapılan izolatların BD Phoenix™ PMIC/ID87 kiti kullanılarak antibiyotik duyarlılık testleri yapıldı. Triyptic soy agarda saflaştırılmış 24 saatlik taze kültürler cam tüplerde hazır bulunan AST Broth ile McFarland 0.5 koloni yoğunluğuna göre süspansiyon hazırlandı. Minimal İnhibitör Konsantrasyon değerleri ölçüldü. Cihaz ile yapılan antibiyogram duyarlılık profilinde;

Amoksisilin-Klavulanik asit

Ampisilin

Sefoksitin

Siprofloksasin

Klindamisin

Daptomisin

Eritromisin

Fosfomisin w/G6P

Fusidik Asit

Gentamisin

Levofloksasin

Linezolid

Nitrofurantoin

Oksasilin

Penisilin G

Kuinopristin-dalfopristin

Rifampin

Streptomsin-Syn

Teikoplanin

Tetrasiklin

Tigesiklin

Tobramisin

Trimethoprim-Sulfametoksazol

Vankomisin, antibiyotikleri kullanılmıştır. Bu antibiyotik türleri BD Phoenix™ kitlerinin paketleri içerisinde Gram pozitif (PMIC/ID87) bakteri teşhisi ve antibiyotik duyarlılıkları için panellerde mevcut bulunmaktadır. Bakteri süspansiyonlarını içeren paneller cihaza yerleştirilip bakteri teşhisi yapıldığı gibi antibiyogramlarının tespiti de yapıp elektronik sistem üzerinden duyarlılık sonuçları alınmıştır.

3.3. DNA Ekstraksiyonu

Staphylococcus sp. olarak identifiye edilen izolatlardan PCR’da kullanılmak üzere total DNA ekstraksiyonu, Thermo Scientific™ Genomic DNA Purification ekstraksiyon kiti kullanılarak üretici firmanın önerdiği şekilde aşağıda belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

Thermo Scientific™ Genomic DNA Purification Kit Prosedürü:

Bir öze dolusu koloni steril ependorf tüpleri içerisinde 400 µl lizis solüsyonu ile süspanse edilip, 65°C’de 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyonun ardından süspansiyona 600 µl kloroform eklenip, 10.000 rpm’de 2 dk santrifüj edildikten sonra üstte bulunan süpernatant atılmıştır. Ependorfta kalan pelet üzerine 800 µl presipitasyon solüsyonu ilave edilerek oda sıcaklığında (21±1°C) 1-2 dakika karıştırma işleminden sonra 10.000 rpm’de 2 dakika santrifüj (Hettich, Mikro 200R, Almanya) edilmiştir. Santrifüjün ardından DNA içeren pelet 1,2 M NaCl solüsyonunda çözündürülmüş ve üzerine 300 µl etanol eklendikten sonra 10 dakika -20°C’de bekletilmiştir. Bekleme süresi bitiminde 10.000 rpm’de 3 dakika santrifüj işlemi uygulanmış ve sonrasında %70’lik etanol ile yıkama işlemi yapılmıştır. Son olarak ependorf içerisindeki DNA içeriği 100 µl steril distile suda çözündürülmüştür.

3.4. *Staphylococcus* sp. İzolatlarının PCR ile Virulens Genlerinin Tespiti

3.4.1. 16S rRNA Geninin PCR yöntemi ile tespiti

Tablo 4. 16S rRNA geni için kullanılan primer (Hwang ve ark, 2011)

PCR	Gen	Primer Seti Sekansı (5’/3’)	Ürün (bp)	Kaynaklar
Konvansiyonel	16S rRNA	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG CCGTCAATTCMTTTRAGTTT	527	Hwang ve ark, 2011

16S rRNA geninin araştırılması için hazırlanan primer miksin karışım oranları Hwang ve arkadaşlarının 2011 yılında yapmış olduğu çalışmada belirtildiği şekilde oluşturulmuştur. Primer miksi hazırlanırken, 100 pmol olarak bulunan 16S rRNA forward ve reverse primerleri sulandırılıp 10 pmol yoğunluğuna getirildi. 16S rRNA primerine spesifik ürünlerin aranması amacıyla yapılan PCR reaksiyonlarında PCR amplifikasyonu bir örnek için toplam 25 µl

hacimde mastermiks hazırlanarak gerçekleştirildi. Hazırlanmış olan mastermiksler her bir örnek için ayrı pcr tüplerine 21 µl aktarıldı. Her bir örnek DNA'sı ilgili tüplere 4'er µl eklendi. Tüpler daha sonra Applied Biosystems SimpliAmp™ PCR System thermal cycler (ABD) cihazına yüklendi. Mastermiks hazırlanmasında kullanılanmış olduğumuz malzemeler ve hacimleri (Tablo 5) belirtilmiştir.

Tablo 5. 16S rRNA geni için mastermiks hazırlama oranları

Malzeme (Ticari)	Kullanılan Hacim Master Mix
GeNetBio ExPrime Taq Premix (2X) G-5000	12,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 µl
Forward Primermiks (10 pmol)	1 µl
Reverse Primermiks (10 pmol)	1 µl
Kalıp DNA	4 µl
ddH ₂ O	5,75 µl
TOPLAM	25 µl

Bu amplifikasyon işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı (Tablo 6) belirtilmiştir. İşlem sonunda elde edilen ampikonlar agaroz jel elektroforez aşamasına kadar 4°C'de muhafaza edildi.

Tablo 6. 16S rRNA geni PCR işlemlerine ait ısı döngü ve süre diyagramı (Hwang ve ark, 2011)

Basamak	Sıcaklık	Süresi	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyon	94°C	4 dk	1
Denatürasyon	94°C	30 sn	
Bağlanma	57.5°C	30 sn	35
Uzama	72°C	40 sn	
Son Uzama	70°C	10 dk	1
Bekletme	4°C	∞ dk	1

16S *rRNA* geni araştırılması için uygulanan PCR işlemi ısı döngüleri Hwang ve arkadaşlarının (2011) yaptığı çalışmada belirttiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.4.2. *nuc* Geninin PCR Yöntemi ile Tespiti

Tablo 7. *nuc* geni için kullanılan primer (Brakstad ve ark, 1992)

PCR	Gen	Primer Seti Sekansı (5'/3')	Ürün (bp)	Kaynaklar
Konvansiyonel	<i>nuc</i>	GCGATTGATGGTGATACGGTT AGCCAAGCCTTGACGAACTAAA GC	279	Brakstad ve ark, 1992

nuc geninin araştırılması için hazırlanan primer miksin karışım oranları Brakstad ve arkadaşlarının 1992 yılında yapmış olduğu çalışmada belirtildiği şekilde oluşturulmuştur. Primer miksi hazırlanırken, 100 pmol olarak bulunan *nuc* forward ve reverse primerleri sulandırılıp 10 pmol yoğunluğuna getirildi. *nuc* primerine spesifik ürünlerin aranması amacıyla yapılan PCR reaksiyonlarında PCR amplifikasyonu bir örnek için toplam 25 µl hacimde mastermiks hazırlanarak gerçekleştirildi. Hazırlanmış olan mastermiksler her bir örnek için ayrı pcr tüplerine 21 µl aktarıldı. Her bir örnek DNA'sı ilgili tüplere 4'er µl eklendi. Tüpler daha sonra gene cihazına yüklendi. Mastermiks hazırlanmasında kullanılanmış olduğumuz malzemeler ve hacimleri Tablo 8'de belirtilmiştir.

Tablo 8. *nuc* geni için mastermiks hazırlama oranları (Brakstad ve ark, 1992)

Malzeme (Ticari)	Kullanılan Hacim Master Mix
GeNetBio ExPrime Taq Premix (2X) G-5000	12,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 µl
Forward Primermiks (10 pmol)	1 µl
Reverse Primermiks (10 pmol)	1 µl
Kalıp DNA	4 µl
ddH ₂ O	5,75 µl
TOPLAM	25 µl

Bu amplifikasyon işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı Tablo 9’da belirtilmiştir. İşlem sonunda elde edilen ampikonlar agaroz jel elektroforez aşamasına kadar 4°C’de muhafaza edildi.

Tablo 9. *nuc* geni PCR işlemlerine ait ısı döngü ve süre diyagramı (Brakstad ve ark, 1992)

Basamak	Sıcaklık	Süresi	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyon	94°C	4 dk	1
Denatürasyon	94°C	30 sn	
Bağlanma	57.5°C	30 sn	35
Uzama	72°C	40 sn	
Son Uzama	70°C	10 dk	1
Bekletme	4°C	∞ dk	1

nuc geni araştırılması için uygulanan PCR işlemi ısı döngüleri Brakstad ve arkadaşlarının (1992) belirttiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.4.3. *coa* Geninin PCR Yöntemi ile Tespiti

Tablo 10. *coa* geni için kullanılan primer (Kalorey ve ark, 2007)

PCR	Gen	Primer Seti Sekansı (5’/3’)	Ürün (bp)	Kaynaklar
Konvensiyonel	<i>coa</i>	ATAGAGATGCTGGTACAGG GCTTCCGATTGTTTCGATGC	627,710 ,910	Kalorey ve ark, 2007

coa geninin araştırılması için hazırlanan primer miksin karışım oranları Kalorey ve arkadaşlarının 2007 yılında yapmış olduğu çalışmada belirtildiği şekilde oluşturulmuştur. Primer miksi hazırlanırken, 100 pmol olarak bulunan *coa* forward ve reverse primerleri forward ve reverse olarak sulandırılıp 10 pmol yoğunluğuna getirildi. *coa* primerine spesifik ürünlerin aranması amacıyla yapılan PCR reaksiyonlarında PCR amplifikasyonu bir örnek için toplam 25 µl hacimde mastermiks hazırlanarak gerçekleştirildi. Hazırlanmış olan mastermiksler her bir örnek için ayrı pcr tüplerine 22 µl aktarıldı. Her bir örnek DNA’sı ilgili tüplere 3’er µl eklendi. Tüpler daha sonra Applied Biosystems SimpliAmp™ PCR System thermal cycler (ABD) cihazına yüklendi. Mastermiks hazırlanmasında kullanılanmış olduğumuz malzemeler ve hacimleri Tablo 11’de belirtilmiştir.

Tablo 11. *coa* geni için mastermiks hazırlama oranları

Malzeme (Ticari)	Kullanılan Hacim Master Mix
GeNetBio ExPrime Taq Premix (2X) G-5000	12,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 µl
Forward Primermiks (10 pmol)	1 µl
Reverse Primermiks (10 pmol)	1 µl
Kalıp DNA	3 µl
ddH ₂ O	6 µl
TOPLAM	25 µl

Bu amplifikasyon işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı Tablo 12’de belirtilmiştir. İşlem sonunda elde edilen ampliconlar agaroz jel elektroforez aşamasına kadar 4°C’de muhafaza edildi.

Tablo 12. *coa* geni PCR işlemlerine ait ısı döngü ve süre diyagramı (Kalorey ve ark, 2007)

Basamak	Sıcaklık	Süresi	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyon	95°C	2 dk	1
Denatürasyon	95°C	30 sn	
Bağlanma	58°C	2 sn	30
Uzama	72°C	4 dk	
Son Uzama	72°C	4 dk	1
Bekletme	4°C	∞ dk	1

coa geni araştırılması için uygulanan PCR işlemi ısı döngüleri PCR Kalorey ve arkadaşlarının 2007 yılında belirttiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.4.4. *tuf* Geninin PCR Yöntemi ile Tespiti

Tablo 13. *tuf* geni için kullanılan primer (Hwang ve ark, 2011)

PCR	Gen	Primer Seti Sekansı (5’/3’)	Ürün (bp)	Kaynaklar
-----	-----	-----------------------------	-----------	-----------

Konvansiyonel	<i>tuf</i>	GCCAGTTGAGGACGTATTCT CCATTCAGTACCTTCTGGTAA	412	Hwang ve ark, 2011
---------------	------------	---	-----	-----------------------

tuf geninin araştırılması için hazırlanan primer miksin karışım oranları Hwang ve arkadaşlarının 2011 yılında yapmış olduğu çalışmada belirtildiği şekilde oluşturulmuştur. Primer miksi hazırlanırken, 100 pmol olarak bulunan *tuf* forward ve reverse primerleri forward ve reverse olarak sulandırılıp 10 pmol yoğunluğuna getirildi. *tuf* primerine spesifik ürünlerin aranması amacıyla yapılan PCR reaksiyonlarında PCR amplifikasyonu bir örnek için toplam 25 µl hacimde mastermiks hazırlanarak gerçekleştirildi. Hazırlanmış olan mastermiksler her bir örnek için ayrı pcr tüplerine 22 µl aktarıldı. Her bir örnek DNA'sı ilgili tüplere 3'er µl eklendi. Tüpler daha sonra Applied Biosystems SimpliAmp™ PCR System thermal cycler (ABD) cihazına yüklendi. Mastermiks hazırlanmasında kullanılanmış olduğumuz malzemeler ve hacimleri Tablo 14'de belirtilmiştir.

Tablo 14. *tuf* geni için mastermiks hazırlama oranları

Malzeme (Ticari)	Kullanılan Hacim Master Mix
GeNetBio ExPrime Taq Premix (2X) G-5000	12,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 µl
Forward Primermiks (10 pmol)	1 µl
Reverse Primermiks (10 pmol)	1 µl
Kalıp DNA	3 µl
ddH ₂ O	6 µl
TOPLAM	25 µl

Bu amplifikasyon işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı Tablo 15'de belirtilmiştir. İşlem sonunda elde edilen ampikonlar agaroz jel elektroforez aşamasına kadar 4°C'de muhafaza edildi.

Tablo 15. *tuf* geni PCR işlemlerine ait ısı döngü ve süre diyagramı (Hwang ve ark, 2011)

Basamak	Sıcaklık	Süresi	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyon	95°C	15 dk	1
Denatürasyon	95°C	30 sn	
Bağlanma	56°C	30 sn	35

Uzama	72°C	45 sn	
Son Uzama	72°C	10 dk	1
Bekletme	4°C	∞ dk	1

tuf geni araştırılması için uygulanan PCR işlemi ısı döngüleri PCR Hwang ve arkadaşlarının 2011 yılında belirttiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.5. *Staphylococcus* sp. Türlerinin Enterotoksin Genlerinin Tespiti

Araştırmamızda *Staphylococcus* sp. olarak identifiye edilmiş mikroorganizmalar tarafından üretilen enterotoksinlerin sentezinden sorumlu olan *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, genlerinin varlığı araştırıldı. *Staphylococcus* sp. olarak tanımlandığımız suşların, enterotoksin genlerinin tespiti Johnson ve ark. (1991) ile Cunha ve arkadaşlarının (2006) yapmış olduğu çalışma dizayn edilerek set 1 (Enterotoksin A-B-C-D-E) multipleks PCR yöntemi ile Enterotoksin G v H konvansiyonel PCR yöntemi ile yapıldı. Kullanılan primerler Tablo 16’da belirtilmiştir.

Tablo 16. Enterotoksin A-B-C-D-E-G-H geni için kullanılan primerler (Johnson ve ark, 1991; Cunha ve ark, 2006)

Gen	Primer Seti Sekansı (5’/3’)	bp	Kaynaklar
Enterotoksin A	TTGGAAACGGTTAAAACGAA GAACCTTCCCATCAAAAACA	120	(Johnson ve ark, 1991; Cunha ve ark, 2006)
Enterotoksin B	TCGCATCAAACCTGACAAACG GCAGGTACTCTATAAGTGCC	478	(Johnson ve ark, 1991; Cunha ve ark, 2006)
Enterotoksin C	GACATAAAAGCTAGGAATTT AAATCGGATTAACATTATCC	257	(Johnson ve ark, 1991; Cunha ve ark, 2006)
Enterotoksin D	CTAGTTTGGTAATATCTCCT TAATGCTATATCTTATAGGG	317	(Johnson ve ark, 1991; Cunha ve ark, 2006)
Enterotoksin E	CAAAGAAATGCTTTAAGCAATCTTAGG CCACCTTACCGCCAAAGCTG	170	(Johnson ve ark, 1991; Cunha ve ark, 2006)
Enterotoksin G	AATTATGTGAATGCTCAACCCGATC AAACTTATATGGAACAAAAGGTACTAG TTC	642	(Johnson ve ark, 1991; Cunha ve ark, 2006)
Enterotoksin H	CAATCACATCATATGCGAAAGCAG CATCTACCCAAACATTAGCACC	375	(Johnson ve ark, 1991; Cunha ve

Enterotoksin A-B-C-D-E-G-H geninin araştırılması için hazırlanan primer miksin karışım oranları Johnson ve arkadaşlarının 1991 yılında yaptığı çalışma ile Cunha ve arkadaşlarının 2006 yılında yapmış olduğu çalışmada belirtildiği şekilde dizayn edilmiştir. Primer miksi hazırlanırken, 100 pmol olarak bulunan bulunan Enterotoksin A-B-C-D-E forward ve reverse primerleri forward ve reverse olarak sulandırılıp 10 pmol yoğunluğuna getirildi. Enterotoksin G ve H primerleri forward ve reverse olarak sulandırılıp 20 pmol yoğunluğuna getirildi ve primer miksleri hazırlandı Enterotoksin A-B-C-D-E-G-H primerlerine spesifik ürünlerin aranması amacıyla yapılan PCR reaksiyonlarında PCR amplifikasyonu bir örnek için toplam 25 µl hacimde mastermiks hazırlanarak gerçekleştirildi. Hazırlanmış olan mastermikslere her bir örnek için ayrı PCR tüplerine 22 µl aktarıldı. Her bir örnek DNA'sı ilgili tüplere 3'er µl eklendi. Tüpler daha sonra Applied Biosystems SimpliAmp™ PCR System thermal cycler (ABD) cihazına yüklendi. Mastermiks hazırlanmasında kullanılanmış olduğumuz malzemeler ve hacimleri Set I için Tablo 18'de Enterotoksin G ve H için Tablo 19'da belirtilmiştir.

Staphylococcus sp. Enterotoksin genleri için oluşturulan PCR seti (Set I) Tablo 17'de belirtilmiştir.

Tablo 17. *Staphylococcus* sp. Enterotoksin genleri için oluşturulan Set I PCR miksi

Set 1
<i>sea</i>
<i>seb</i>
<i>sec</i>
<i>sed</i>
<i>see</i>

Tablo 18. Enterotoksin A-B-C-D-E (Set I) genleri için mastermiks hazırlama oranları

Malzeme (Ticari)	Kullanılan Hacim Master Mix
GeNetBio ExPrime Taq Premix (2X) G-5000	12,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 µl
Forward Primermiks (10 pmol)	1 µl
Reverse Primermiks (10 pmol)	1 µl
Kalıp DNA	3 µl

ddH ₂ O	4,75 µl
TOPLAM	25 µl

Tablo 19. Enterotoksin G ve H genleri için mastermiks hazırlama oranları

Malzeme (Ticari)	Kullanılan Hacim Master Mix
GeNetBio ExPrime Taq Premix (2X) G-5000	12,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 µl
Forward Primermiks (20 pmol)	1 µl
Reverse Primermiks (20 pmol)	1 µl
Kalıp DNA	3 µl
ddH ₂ O	6,75 µl
TOPLAM	25 µl

Bu amplifikasyon işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramları Set I için Tablo20’de Enterotoksin G ve H için tablo 21’de belirtilmiştir. İşlem sonunda elde edilen ampliconlar agaroz jel elektroforez aşamasına kadar 4°C’de muhafaza edildi.

Tablo 20. Enterotoksin A-B-C-D-E (Set I) genleri PCR işlemlerine ait ısı döngü ve süre diyagramı (Johnson ve ark, 1991; Cunha ve ark, 2006)

Basamak	Sıcaklık	Süresi	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyon	94°C	5 dk	1
Denatürasyon	94°C	2 dk	
Bağlanma	57°C	2 dk	35
Uzama	72°C	1 dk	
Son Uzama	72°C	7 dk	1
Bekletme	4°C	∞ dk	1

Tablo 21. Enterotoksin G ve H genleri PCR işlemlerine ait ısı döngü ve süre diyagramı (Johnson ve ark, 1991; Cunha ve ark, 2006)

Basamak	Sıcaklık	Süresi	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyon	95°C	5 dk	1

Denatürasyon	95°C	30 sn	
Bağlanma	57°C	30 sn	35
Uzama	72°C	1,5 dk	
Son Uzama	72°C	5 dk	1
Bekletme	4°C	∞ dk	1

Enterotoksin A-B-C-D-E-G-H genlerinin araştırılması için uygulanan multipleks ve konvansiyonel PCR işlemi ısı döngüleri Johnson ve arkadaşlarının 1991 yılında belirttiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.6. *Staphylococcus* sp. İzolatlarında Toksik Şok Sendrom Toksin Geninin Varlığının Belirlenmesi

Tablo 22. *TSST* geni için kullanılan primer (Johnson ve ark 1991; Cunha ve ark 2006)

PCR	Gen	Primer Seti Sekansı (5'/3')	Ürün (bp)	Kaynaklar
Konvansiyonel	<i>TSST</i>	ATGGCAGCATCAGCTTGATA TTTCCAATAACCACCCGTTT	350	Johnson ve ark 1991; Cunha ve ark, 2006

TSST geninin araştırılması için hazırlanan primer miksin karışım oranları Johnson ve arkadaşlarının 1991 yılında yapmış olduğu çalışmada belirtildiği şekilde oluşturulmuştur. Primer miksi hazırlanırken, 100 pmol olarak bulunan *tsst* forward ve reverse primerleri forward ve reverse olarak sulandırılıp 50 pmol yoğunluğuna getirildi. *tsst* primerine spesifik ürünlerin aranması amacıyla yapılan PCR reaksiyonlarında PCR amplifikasyonu bir örnek için toplam 25 µl hacimde mastermiks hazırlanarak gerçekleştirildi. Hazırlanmış olan mastermiksler her bir örnek için ayrı pcr tüplerine 20 µl aktarıldı. Her bir örnek DNA'sı ilgili tüplere 5'er µl eklendi. Tüpler daha sonra Applied Biosystems SimpliAmp™ PCR System thermal cycler (ABD) cihazına yüklendi. Mastermiks hazırlanmasında kullanılanmış olduğumuz malzemeler ve hacimleri Tablo 23'de belirtilmiştir.

Tablo 23. *TSST* geni için mastermiks hazırlama oranları

Malzeme (Ticari)	Kullanılan Hacim Master Mix
GeNetBio ExPrime Taq Premix (2X) G-5000	12,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 µl
Forward Primermiks (10 pmol)	1 µl
Reverse Primermiks (10 pmol)	1 µl
Kalıp DNA	5 µl
ddH ₂ O	4,75 µl
TOPLAM	25 µl

Bu amplifikasyon işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı Tablo 24’de belirtilmiştir. İşlem sonunda elde edilen ampliconlar agaroz jel elektroforez aşamasına kadar 4°C’de muhafaza edildi.

Tablo 24. *TSST* geni PCR işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı (Johnson ve ark 1991; Cunha ve ark 2006)

Basamak	Sıcaklık	Süresi	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyon	94°C	5 dk	1
Denatürasyon	94°C	2 dk	
Bağlanma	57°C	2 dk	37
Uzama	72°C	1 dk	
Son Uzama	72°C	7 dk	1
Bekletme	4°C	∞ dk	1

TSST geni araştırılması için uygulanan PCR işlemi ısı döngüleri Johnson ve arkadaşlarının 1991 yılında yaptığı çalışma ile Cunha ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptığı çalışmada belirttiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.7. *Staphylococcus* sp. İzolatlarının PVL, CLFA, *Hla*, *Hlb*, *Y-hlg*, BAP Virulens Genlerinin Belirlenmesi

Stafilokok suşlarının virulens genlerinin belirlenmesi amacıyla PVL, CLFA, *Hla*, *Hlb* *Y-hlg* genleri ve BAP proteinine spesifik primerler kullanılarak multipleks PCR işlemi yapıldı. Multipleks PCR işleminde kullanılan primerler (Tablo 25) gösterilmiştir.

Tablo 25. Stafilokok izolatlarının virulens genlerinin belirlenmesinde kullanılan primerler (Elsayed ve ark, 2015; Moore ve Lindsay, 2001; Vancraeynest ve ark, 2004)

Gen	Primer Seti Sekansı (5'/3')	(bp)	Literatür
PVL	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC	433	(Elsayed ve ark, 2015)
CLFA	GGC TTC AGT GCT TGT AGG TTT TCA GGG TCA ATA TAA GC	980	(Elsayed ve ark, 2015)
<i>Hla</i>	CTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTG CTTTCCAGCCTACTTTTTTATCAGT	209	(Elsayed ve ark, 2015)
<i>Hlb</i>	GTGCACTTACTGACAATAGTGC GTTGATGAGTAGCTACCTTCAGT	309	(Elsayed ve ark, 2015)
<i>Ý-hlg</i>	CCAATCCGTTATTAGAAAATGC CCATAGACGTAGCCACGGAT	937	(Moore ve Lindsay, 2001)
BAP	CCCTATATCGAAAGGTGTAGAATTG GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC	971	(Vancraeynest ve ark, 2004)

PVL, CLFA, *Hla*, *Hlb* *Ý-hlg*, BAP genlerinin araştırılması için hazırlanan primer miksin karışım oranları Elsayed ve arkadaşlarının 2015 yılında yapmış olduğu çalışmada belirtildiği şekilde oluşturulmuştur. Primer miksi hazırlanırken, 100 pmol olarak bulunan PVL, CLFA, *Hla*, *Hlb* *Ý-hlg*, BAP forward ve reverse primerleri forward ve reverse olarak sulandırılıp 50 pmol yoğunluğuna getirildi. PVL, CLFA, *Hla*, *Hlb* *Ý-hlg*, BAP primerine spesifik ürünlerin aranması amacıyla yapılan PCR reaksiyonlarında PCR amplifikasyonu bir örnek için toplam 25 µl hacimde mastermiks hazırlanarak gerçekleştirildi. Hazırlanmış olan mastermikslere her bir örnek için ayrı pcr tüplerine 23 µl aktarıldı. Her bir örnek DNA'sı ilgili tüplere 2'er µl eklendi. Tüpler daha sonra Applied Biosystems SimpliAmp™ PCR System thermal cycler (ABD) cihazına yüklendi. Mastermiks hazırlanmasında kullanılanmış olduğumuz malzemeler ve hacimleri Tablo 26'da belirtilmiştir.

Tablo 26. PVL, CLFA, *Hla*, *Hlb* *Ý-hlg*, BAP genleri için mastermiks hazırlama oranları

Malzeme (Ticari)	Kullanılan Hacim Master Mix
GeNetBio ExPrime Taq Premix (2X) G-5000	12,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1 µl
Forward Primermiks (50 pmol)	1 µl

Reverse Primermiks (50 pmol)	1 µl
Kalıp DNA	2 µl
ddH ₂ O	7,5 µl
TOPLAM	25 µl

Bu amplifikasyon işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı Tablo 27’de belirtilmiştir. İşlem sonunda elde edilen ampikonlar agaroz jel elektroforez aşamasına kadar 4°C’de muhafaza edildi.

Tablo 27. PVL, CLFA, *Hla*, *Hlb* *Y-hlg*, BAP genlerinin multipleks PCR işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı

Basamak	Sıcaklık	Süresi	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyon	94°C	10 dk	1
Denatürasyon	94°C	45 sn	
Bağlanma	55°C	30 sn	35
Uzama	72°C	30 sn	
Son Uzama	72°C	10 dk	1
Bekletme	4°C	∞ dk	1

3.8. *Staphylococcus* sp. İzolatlarının Antimikrobiyel Direnç Genlerinin Belirlenmesi

Stafilokok izolatlarının antimikrobiyel direnç kodlayan genlerinden *mecA* saptanması PCR ile gerçekleştirilmiştir. PCR işleminde kullanılan antimikrobiyel direnç genleri primerleri ile uzama dereceleri (annealing-T) Tablo 28 ve Tablo 29’da gösterilmektedir. PCR protokolleri ilgili literatürlerde belirtilen şekillerde uygulanmıştır.

3.8.1. *Staphylococcus* sp. İzolatlarının *mecA* Direnç Geninin Belirlenmesi

Tablo 28. *mecA* direnç geninin belirlenmesinde kullanılan primerler (Poulsen ve ark, 2003)

Hedef Gen	Primer İsmi	Primer Seti Sekansı (5'/3')	Ürün (bp) ve T (° C)	Literatür
<i>mecA</i>	mecA1	GGGATCATAGCGTCATTATTC	527 (61)	Poulsen ve ark,
	mecA2	AACGATTGTGACACGATAGCC		2003

mecA geninin araştırılması için hazırlanan primer miksin karışım oranları Poulsen ve arkadaşları 2003 yılında yapmış olduğu çalışmada belirtildiği şekilde dizayn edilmiştir. Primer miksi hazırlanırken, 100 pmol olarak bulunan *mecA* forward ve reverse primerleri forward ve reverse olarak sulandırılıp 20 pmol yoğunluğuna getirildi. *mecA* primerine spesifik ürünlerin aranması amacıyla yapılan PCR reaksiyonlarında PCR amplifikasyonu bir örnek için toplam 25 µl hacimde mastermiks hazırlanarak gerçekleştirildi. Hazırlanmış olan mastermikslere her bir örnek için ayrı pcr tüplerine 22 µl aktarıldı. Her bir örnek DNA'sı ilgili tüplere 3'er µl eklendi. Tüpler daha sonra Applied Biosystems SimpliAmp™ PCR System thermal cycler cihazına (ABD) yüklendi. Mastermiks hazırlanmasında kullanılan malzemeler ve hacimleri Tablo 29'da belirtilmiştir.

Tablo 29. *mecA* geni için mastermiks hazırlama oranları

Malzeme (Ticari)	Kullanılan Hacim Master Mix
GeNetBio ExPrime Taq Premix (2X) G-5000	12,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 µl
Forward Primermiks (50 pmol)	1 µl
Reverse Primermiks (50 pmol)	1 µl
Kalıp DNA	3 µl
ddH ₂ O	6,75 µl
TOPLAM	25 µl

Bu amplifikasyon işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı Tablo 30'da belirtilmiştir. İşlem sonunda elde edilen ampikonlar agaroz jel elektroforez aşamasına kadar 4°C'de muhafaza edildi.

Tablo 30. *mecA* geni PCR işlemlerine ait ısı döngü ve süre diyagramı (Poulsen ve ark, 2003)

Basamak	Sıcaklık	Süresi	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyon	94°C	5 dk	1
Denatürasyon	94°C	2 dk	
Bağlanma	57°C	2 dk	35
Uzama	72°C	1 dk	
Son Uzama	72°C	7 dk	1
Bekletme	4°C	∞ dk	1

3.8.2. *Staphylococcus* sp. İzolatlarının *mecC* Direnç Geninin Belirlenmesi

Tablo 31. *mecC* direnç geninin belirlenmesinde kullanılan primerler (Cuny ve ark, 2011)

Hedef Gen	Primer İsmi	Primer Seti Sekansı (5'/3')	Ürün (bp) ve T (° C)	Literatür
<i>mecC</i>	mecC1	GCTCCTAATGCTAATGCA	138 (50)	Cuny ve ark,
	mecC2	GCTCCTAATGCTAATGCA		2011

mecC geninin araştırılması için hazırlanan primer miksin karışım oranları Cuny ve ark, 2011 yılında yapmış olduğu çalışmada belirtildiği şekilde oluşturulmuştur. Primer miksi hazırlanırken, 100 pmol olarak bulunan *mecC* forward ve reverse primerleri forward ve reverse olarak sulandırılıp 50 pmol yoğunluğuna getirildi. *mecC* primerine spesifik ürünlerin aranması amacıyla yapılan PCR reaksiyonlarında PCR amplifikasyonu bir örnek için toplam 25 µl hacimde mastermiks hazırlanarak gerçekleştirildi. Hazırlanmış olan mastermiksler her bir örnek için ayrı pcr tüplerine 22 µl aktarıldı. Her bir örnek DNA'sı ilgili tüplere 3'er µl eklendi. Tüpler daha sonra Applied Biosystems SimpliAmp™ PCR System thermal cycler cihazına (ABD) yüklendi. Mastermiks hazırlanmasında kullanılanmış olduğumuz malzemeler ve hacimleri (Tablo 32) de belirtilmiştir.

Tablo 32. *mecC* geni için mastermiks hazırlama oranları

Malzeme (Ticari)	Kullanılan Hacim Master Mix
GeNetBio ExPrime Taq Premix (2X) G-	12,5 µl

5000	
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 µl
Forward Primermiks (50 pmol)	1 µl
Reverse Primermiks (50 pmol)	1 µl
Kalıp DNA	3 µl
ddH ₂ O	6,75 µl
TOPLAM	25 µl

Bu amplifikasyon işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı Tablo 33’de belirtilmiştir. İşlem sonunda elde edilen ampliconlar agaroz jel elektroforez aşamasına kadar 4°C’de muhafaza edildi.

Tablo 33. *mecC* geni PCR işlemlerine ait ısı döngü ve süre diyagramı

Basamak	Sıcaklık	Süresi	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyon	95°C	5 dk	1
Denatürasyon	94°C	30sn	
Bağlanma	50°C	1 dk	35
Uzama	72°C	1 dk	
Son Uzama	72°C	7 dk	1
Bekletme	4°C	∞ dk	1

mecC geni araştırılması için uygulanan PCR işlemi ısı döngüleri Cuny ve arkadaşlarının 2011 yılında belirttiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.9. *Staphylococcus* sp. İzolatlarının *vanA-vanB-vanC* Direnç Geninin Belirlenmesi

Araştırmamızda *Staphylococcus* sp. olarak tanımlanmış mikroorganizmalar tarafından üretilen vankomisine direnç genlerinin sentezinden sorumlu olan *vanA-vanB-vanC* genlerinin varlığı araştırıldı. *Staphylococcus* sp. olarak tanımlandığımız suşların, vankomisine direnç genlerinin tespiti Clark ve arkadaşları (1993) tarafından önerilen yöntem baz alınarak multipleks PCR yöntemi yapıldı. Kullanılan primerler Tablo 34’de belirtilmiştir.

Tablo 34. Stafilokok izolatlarının *vanA-vanB-vanC* antimikrobiyel direnç genlerinin belirlenmesinde kullanılan primerler (Clark ve ark, 1993)

Hedef Gen	Primer İsmi	Primer Seti Sekansı (5'/3')	Ürün (bp) ve T (° C)	Literatür
<i>vanA</i>	vanA1	CATGAATAGAATAAAAAGTTGGAATA	1030 (58)	Clark ve ark, 1993
	vanA2	CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA		
<i>vanB</i>	vanB1	GTGACAAACCGGAGGCGAGGA	433 (58)	Clark ve ark, 1993
	vanB2	CCGCCATCCTCCTGCAAAAAA		
<i>vanC</i>	vanC1	GAAAGACAACAGGAAGACCGC	796 (58)	Clark ve ark, 1993
	vanC2	ATCGCATCACAAGCACCAATC		

VanA, *vanB* ve *vanC* genlerinin araştırılması için hazırlanan primer miksin karışım oranları Clark ve arkadaşlarının 1993 yılında yapmış olduğu çalışmada belirtildiği şekilde oluşturulmuştur. Primer miksi hazırlanırken, 100 pmol olarak bulunan *vanA*, *vanB*, *vanC* forward ve reverse primerleri forward ve reverse olarak sulandırılıp 50 pmol yoğunluğuna getirildi. *vanA*, *vanB*, *vanC* primerlerine spesifik ürünlerin aranması amacıyla yapılan PCR reaksiyonlarında PCR amplifikasyonu bir örnek için toplam 25 µl hacimde mastermiks hazırlanarak gerçekleştirildi. Hazırlanmış olan mastermiksler her bir örnek için ayrı pcr tüplerine 20 µl aktarıldı. Her bir örnek DNA'sı ilgili tüplere 5'er µl eklendi. Tüpler daha sonra Applied Biosystems SimpliAmp™ PCR System thermal cycler (ABD) cihazına yüklendi. Mastermiks hazırlanmasında kullanılanmış olduğumuz malzemeler ve hacimleri Tablo 35'de belirtilmiştir.

Tablo 35. *vanA*, *vanB*, *vanC* genleri için mastermiks hazırlama oranları

Malzeme (Ticari)	Kullanılan Hacim Master Mix
GeNetBio ExPrime Taq Premix (2X) G-5000	12,5 µl
Forward Primermiks (50 pmol)	2 µl
Reverse Primermiks (50 pmol)	2 µl
Kalıp DNA	5 µl
ddH2O	3,5 µl
TOPLAM	25 µl

Bu amplifikasyon işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı (Tablo 36) belirtilmiştir. İşlem sonunda elde edilen ampikonlar agaroz jel elektroforez aşamasına kadar 4°C’de muhafaza edildi.

Tablo 36. *vanA*, *vanB*, *vanC* geni PCR işlemlerine ait ısı döngü ve süre diyagramı (Clark ve ark, 1993)

Basamak	Sıcaklık	Süresi	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyon	95°C	5 dk	1
Denatürasyon	95°C	30sn	
Bağlanma	52°C	30sn	35
Uzama	72°C	30sn	
Son Uzama	72°C	5 dk	1
Bekletme	4°C	∞ dk	1

vanA, *vanB*, *vanC* geni araştırılması için uygulanan PCR işlemi ısı döngüleri Clark ve arkadaşlarının 1993 yılında belirttiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.10. PCR Ürünlerinin Elektroforez Tankına Yüklenmesi ve Görüntülenmesi

PCR işleminden sonra elde ettiğimiz ürünlerden pipet yardımıyla 10’ar µl alınıp, 3 µl 6X loading dye solüsyonu ile karıştırıldı. Oluşturulan karışımın tamamı alınarak, %2’lik agaroz jelde bulunan uygun pozisyondaki kuyucuğa yüklendiktendi. Elektroforez tankının kapağı kapatıldı, elektrotlar uygun pozisyonda bağlandı sonrasında 80V 500A akımda 30 dakika ve sonrasında 40V 500A akımda 60 dakika yürütüldü. Elektroforez işlemi sonrasında elde edilen jel, dikkatli bir şekilde elektroforez tankından çıkarıldı. Yürütme işlemi sonundaki jel, bilgisayara bağlı durumdaki transilluminatör cihazındaki odacığa yerleştirildi. UV ışığı altında fotoğraflandıktan sonra, bant büyüklükleri her PCR için ayrı değerlendirildi.

3.11. Stafilokok Türlerinin Sekans Analizleri

Stafilokok türleri ilk önce *tuf* geni bölgesi PCR ürünleri kullanılarak tiplendirilmeye tabii tutulmuştur. PCR işleminden sonra elde edilen ürün saflaştırılması için steril PCR tüplerine 2 µl ExoSAP dağıtılmış üzerine 5 µl PCR ürünü ilave edilerek 7 µl toplam hacim elde edilmiştir. Daha sonra elde edilen karışım, termal döngüleme cihazına yüklenmiştir. Saflaştırılmış PCR ürünleri, BigDye Terminator, 3.1. versiyonu ile sekans PCR reaksiyonlarına hazırlanacaklardır. Sekans PCR miski 1 µl BigDye Ready Reaction mix, 5 µl BigDye sekans buffer (5x), 1,6 µl 1-pmol primer, 2,9 µl deiyonize saf su ve 1 µl purifiye PCR ürünü olacak şekilde toplam hacim 10 µl olarak hazırlanmıştır. PCR sekansı kondüsyonları 25 siklus 96 °C de 10 saniye, 50°C de 5 saniye, 60°C de 4 dakika şeklindedir. Sekans PCR işleminden sonra elde edilen saf ürünler, Anabilim Dalımız Moleküler Laboratuvarında bulunan ABI Prism 310 genetik analizör cihazının standart protokolleri doğrultusunda sekans işlemine tabi tutulmuştur. Sekans sonrasında ABI Prism 310 genetik analizör cihazının software programları ve Genbank verileri karşılaştırılarak Stafilokok türlerinin tiplendirilmeleri yapılmıştır. *tuf* gen bölgesi ile tiplendirilemeyen Stafilokok suşları için 16S *rRNA* bölgesi spesifik primerler ile gerçekleştirilen PCR ürünleri ile sekans işlemi gerçekleştirilmiştir (Hwang ve ark, 2011).

3.11.1. DNA Sekans Sonuçlarının Elektronik Ortamda Karşılaştırılması

Saflaştırılan sekans PCR ürünleri ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer cihazı ile sekanslandıktan sonra elde edilen sonuçlar, NCBI Blast® nükleotid dizileri ile elektronik ortamda karşılaştırılarak benzerlik oranları yüzde olarak saptanmıştır.

4. BULGULAR

Bu çalışmada subklinik mastitis problemi gösterdiği belirlenen hayvanlardan steril koşullarda toplanan 110 süt örneği Adnan Menderes Üniversitesi Mikrobiyoloji laboratuvarına getirilerek *Staphylococcus* sp. varlığı yönünden biyokimyasal identifikasyonları yapıldıktan sonra BD Phoneix™ 50 otomatize identifikasyon cihazı ile identifikasyonları ve antibiyogram duyarlılık test sonuçları alınmıştır, izolatların tanımlanmasının ardından genotipik olarak doğrulanması, virulens genlerinin, enterotoksin genlerinin ve antibiyotik direnç genlerinin varlığının araştırılması amacı ile PCR analizleri gerçekleştirilmiştir.

4.1. İzolasyon ve İdentifikasyon

Çalışmamızda 110 mastitisli süt örneği Kanlı Agara ekildi ve 37°C’de 24 saat inkübasyondan sonra 93 petride üreme tespit edilmiş olup 17 petride bakteriyel üreme tespit edilmemiştir. İnkübasyon sonrası üreyen koloniler saflaştırıldı. Saflaştırılan kolonilerin hepsine Gram boyama yapıldı. Gram pozitif kok görünümünde olan 41 koloni belirlenmiştir. Belirlenen kolonilere katalaz ve koagulaz testi uygulandı. Katalaz ve koagulaz testleri pozitif olan 26 (%23.63) izolat tanımlandı. Bu izolatların identifikasyonu ve antibiyogramları yapılması için BD Phoneix™ 50 otomatize identifikasyon cihazına yüklendi.

4.2. BD Phoneix™ 50 Otomatize İdentifikasyon Cihazı ile İdentifikasyon

Araştırmamızda incelenen süt örneklerinden 41 adet Gram pozitif kok izole edilmiştir. İzole edilen Gram pozitif kokların BD Phoneix™ 50 otomatize identifikasyon cihazına yüklenmesi sonucunda; 5 (%19.23) *Staphylococcus pettenkoferi*, 5 (% 19.23) *Staphylococcus epidermidis*, 5 (% 19.23) *Staphylococcus equorum*, 3 (%11.53) *Staphylococcus warneri*, 3 (% 11.53) *Staphylococcus caprae*, 2 (% 7.69) *Staphyococcus capitis*, 1 (%3.84) *Staphylococcus aureus*, 1 (% 3.84) *Staphylococcus simulans*, 1 (% 3.84) *Staphylococcus hominis* ve 15 (%13.8) *Streptococcus sp.* tanımlanmıştır.

Tablo 37. CLSI standardına göre Gram pozitif bakteriler için MİK değerleri (CLSI, 2012)

Antibiyotikler		µg/ml	MİK değerleri		
			S	I	R
Amoksisilin-Klavulanik asit	AMC	2/1-8/4	≤4/2		≥8/4
Ampisilin	AM	2-8	≤8	16	≥32
Sefoksitin	FOX	2-8	≤4		≥8
Siprofloksasin	CIP	1-4	≤1	2	≥4
Klindamisin	CC	0,25-1	≤0,5	1-2	≥4

Daptomisin	DAP	0,25-4	≤ 1		
Eritromisin	E	0,25-2	$\leq 0,5$	1-4	≥ 8
Fosfomisin	FF	16-64	≤ 64	128	≥ 256
Fusidik Asit	FA	0,5-8	≤ 1		≥ 2
Gentamisin	GM	1-4	≤ 4	8	≥ 16
Levofloksasin	LVX	1-4	≤ 1		≥ 2
Linezolid	LZD	0,5-4	≤ 4		≥ 8
Nitrofurantoin	FM	16-64	≤ 16		≥ 32
Oksasilin	OX	0,25-2	≤ 2		≥ 4
Penisilin G	P	0,0625-0,25	$\leq 0,12$		$\geq 0,25$
Kinupristin-dalfopristin	SYN	0,5-2	≤ 1	2-4	≥ 4
Rifampin	RA	0,25-1	≤ 1	2	≥ 4
Teikoplanin	TEC	0,5-4	≤ 8	16	≥ 32
Tetrasiklin	TE	0,5-2	$\leq 40,5$	8	≥ 16
Tigesiklin	TGC	0,25-1	≤ 1		
Tobramisin	NN	1-4	$\leq 0,5/9,5$		
Trimetoprim-Sulfometoksazol	SXT	0,5/9,5-2/38	≤ 2	4-8	≥ 16
Vankomisin	VA	0,5-4	≤ 4	8-16	≥ 32

Tablo 38. İdentifiye edilen Stafilocok türlerinin antibiyogram duyarlılıkları

İdentifiye edilen bakteriler	AMC	AM	FOX	CIP	CC	DAP	E	FF	FA	GM	LVX	LZD	FM	OX	P	SYN	RA	TEC	TE	TGC	NN	SXT	VA
<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus warneri</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus capitis</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus equorum</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S
<i>Staphylococcus warneri</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus equorum</i>	S	R	S	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus caprae</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus warneri</i>	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S
<i>Staphylococcus equorum</i>	S	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus equorum</i>	S	R	S	S	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	I	S	S	R	S	S	S	S
<i>Staphylococcus caprae</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	R	R	S	S	R	R	I	S	R	S	S	R	R	R	R	R	I	R	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus simulans</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus equorum</i>	S	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus capitis</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S
<i>Staphylococcus caprae</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S
<i>Staphylococcus hominis</i>	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	R	S	S	S

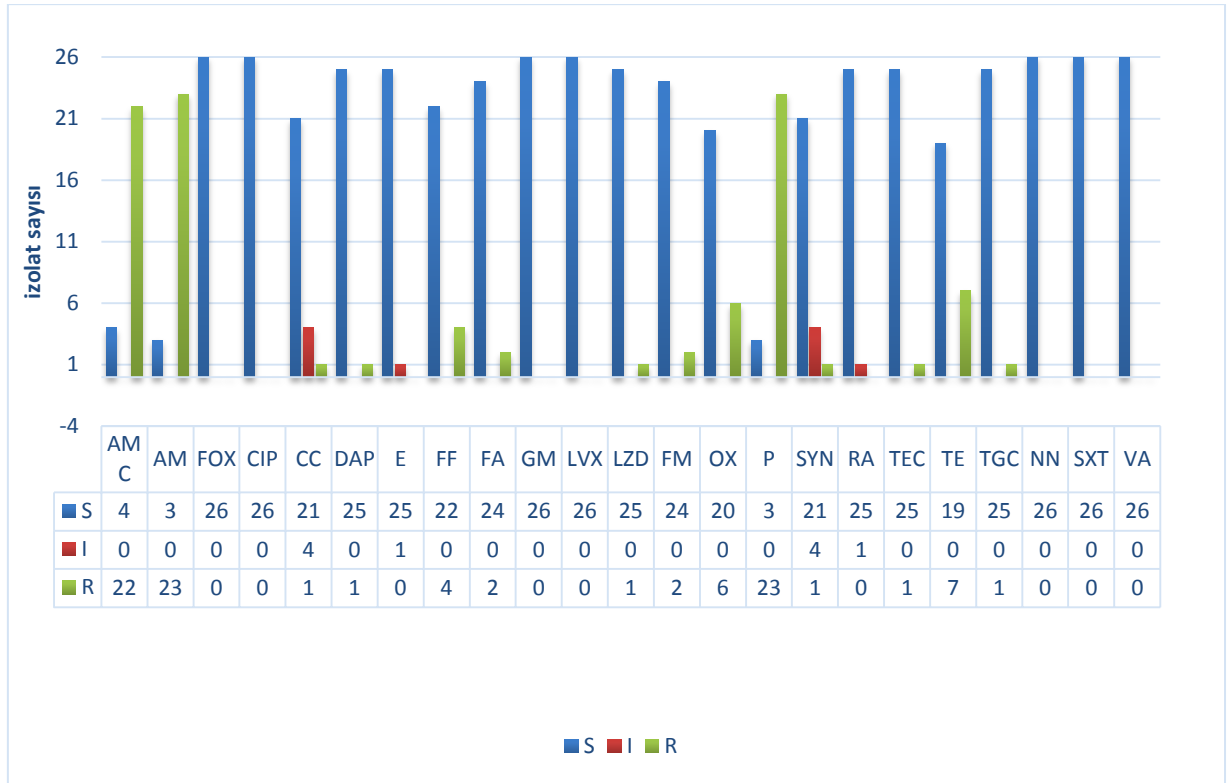
Tablo 39. Stafilokok izolatlarının tür bazında (n=26) antibiyotik duyarlılık yüzdeleri

	AMC	AM	FOX	CIP	CC	DAP	E	FF	FA	GM	LVX	LZD
<i>S. pettenkoferi</i> n=5	S= %80 I=%0 R=%20	S=%0 I=%0 R=%100	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%80 I=%0 R=%20	S=%80 I=%0 R=%20	S=%80 I=%20 R=%0	S=%80 I=%0 R=%20	S=%80 I=%0 R=%20	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%80 I=%0 R=%20
<i>S. aureus</i> n=1	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0
<i>S. warneri</i> n=3	S=%100 I=%0 R=%0	S=%0 I=%0 R=%100	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%66,67 I=%0 R=%33,33	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0
<i>S. epidermidis</i> n=5	S=%60 I=%0 R=%40	S=%40 I=%0 R=%60	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0
<i>S. equorum</i> n=5	S=%100 I=%0 R=%0	S=%0 I=%0 R=%100	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%20 I=%80 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%80 I=%0 R=%20	S=%80 I=%0 R=%20	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0
<i>S. caprae</i> n=3	S=%100 I=%0 R=%0	S=%0 I=%0 R=%100	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0
<i>S. capitis</i> n=2	S=%100 I=%0 R=%0	S=%0 I=%0 R=%100	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0
<i>S. simulans</i> n=1	S=%100 I=%0 R=%0	S=%0 I=%0 R=%100	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0
<i>S. hominis</i> n=1	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0

Tablo 39. Devamı

	FM	OX	P	SYN	RA	TEC	TE	TGC	NN	SXT	VA
<i>S. pettenkoferi</i> <i>n=5</i>	S=%60 I=%0 R=%40	S=%60 I=%0 R=%40	S=%20 I=%0 R=%80	S=%80 I=%0 R=%20	S=%80 I=%20 R=%0	S=%80 I=%0 R=%20	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0
<i>S. aureus</i> <i>n=1</i>	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%0 I=%0 R=%100	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0
<i>S. warneri</i> <i>n=3</i>	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%0 I=%0 R=%100	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%66,67 I=%0 R=%33,33	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0
<i>S. epidermidis</i> <i>n=5</i>	S=%100 I=%0 R=%0	S=%40 I=%0 R=%60	S=%20 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%80 I=%0 R=%20	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0
<i>S. equorum</i> <i>n=5</i>	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%0 I=%0 R=%100	S=%20 I=%80 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%60 I=%0 R=%40	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0
<i>S. caprae</i> <i>n=3</i>	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%33,33 I=%0 R=%66,69	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0
<i>S. capitis</i> <i>n=2</i>	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%0 I=%0 R=%100	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%50 I=%0 R=%50	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0
<i>S. simulans</i> <i>n=1</i>	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%0 I=%0 R=%100	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0
<i>S. hominis</i> <i>n=1</i>	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0	S=%100 I=%0 R=%0

S: Duyarlı, I: Ora derece duyarlı, R: Dirençli



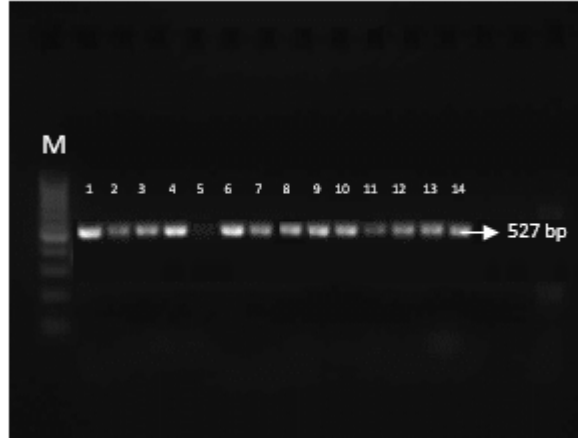
Şekil 3. İdentifiye edilmiş izolatların BD Phoneix™ 50 cihazına göre antibiyotik duyarlılık grafiği

4.3. Genotipik İdentifikasyon

BD Phoenix M50 cihazının tanımlamış olduğu izolatlar kayıt altına alındı. Bu izolatların genotipik olarak tanımlanması için Stafilokok türlerinde bulunan *16S rRNA*, *nuc*, *tuf*, *coa* geninin varlığı PCR analizleri ile incelendi.

4.3.1. 16S rRNA Geni Tespiti

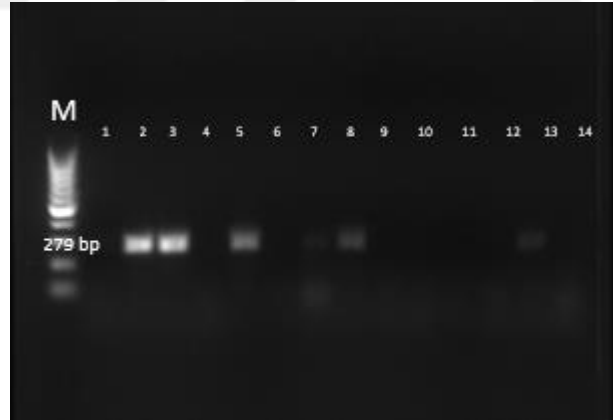
Stafilokok türlerine spesifik *16S rRNA* geni tespitinde kullanılan primer ile yapılan PCR işlemi sonunda 26 izolatta 527 bp aralığında bant oluşumu görülmüştür. 26 izolatın tümünde (%100) *16S rRNA* geni bulunduğu tespit edildi.



Resim 4. 16S rRNA geninin jel elektroforez görüntüsü
M: Marker 100bp DNA ladder 1-14 nolu örnekler: Pozitif

4.3.2. *nuc* Geni Tespiti

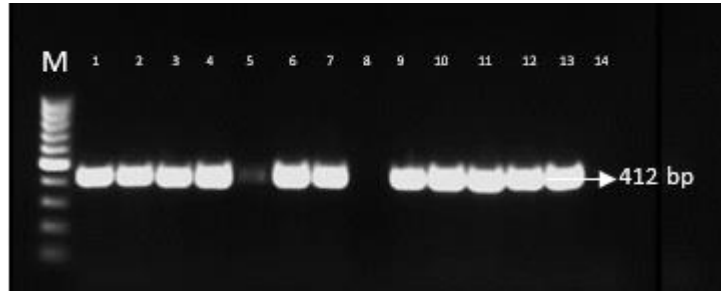
nuc genine spesifik primer ile yapılan PCR işlemi sonucunda, 26 izolatın 11 (%42.30)'inde *nuc* geni tespit edilmiştir. *nuc* geni varlığı için 279 bp aralığında bant oluşumu görülmüştür. İzolatların jel elektroforez görüntüsü Resim 5'de gösterilmiştir.



Resim 5. *nuc* geninin jel elektroforez görüntüsü
M: Marker 100bp DNA ladder 2-3-5-7-8-13 nolu örnekler: Pozitif.

4.3.3. *tuf* Geni Tespiti

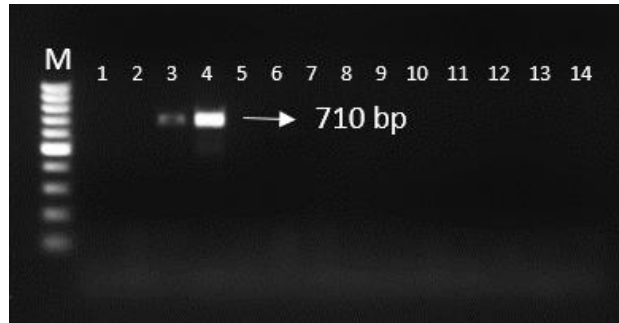
tuf genine spesifik primer ile yapılmış olan PCR işlemi sonucunda, 26 izolatın 24 (%92.30) 'ünde *tuf* geni tespit edilmiştir. *tuf* geni varlığı için 412 bp aralığında bant oluşumu görülmüştür. İzolatların jel elektroforez görüntüsü Resim 6'da gösterilmiştir.



Resim 6. *tuf* geninin jel elektroforez görüntüsü
M: Marker 100bp DNA ladder 1-7, 9-13 nolu örnekler: Pozitif, 8 nolu örnek: Negatif.

4.3.4. *coa* Geni Tespiti

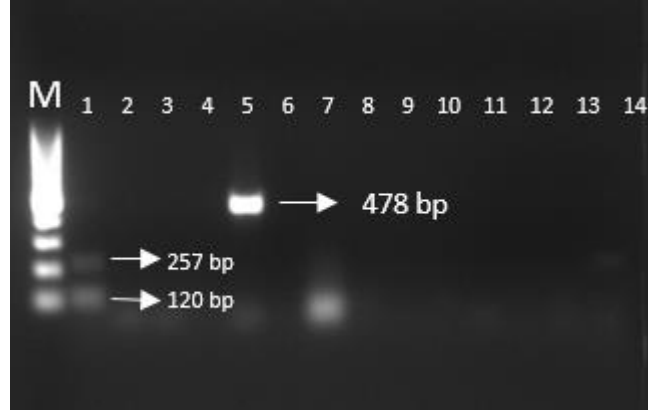
coa genine spesifik primer ile yapılan PCR işlemi sonucunda, 26 izolatın 5 (%19.23)'inde *coa* geni tespit edilmiştir. *coa* geninin varlığı için hedef bölgeler 627, 710, 910 bp aralığında olduğu bildirilmiştir. Yapılan PCR analizi sonucunda pozitif örneklerde gözlemlenen bant aralığı 710 bp'dır. İzolatların jel elektroforez görüntüsü Resim 7'de gösterilmiştir.



Resim 7. *coa* geninin jel elektroforez görüntüsü
M: Marker 100bp DNA ladder 3 ve 4 Nolu örnek: Pozitif; 1,2,5-14 Nolu örnek: Negatif

4.3.5. Enterotoksin A-B-C-D-E Genlerinin Tespiti

entA, *entB*, *entC*, *entD*, *entE* genlerine spesifik primerler ile yapılan multipleks PCR işlemi sonucunda, 26 izolatın; 1 (%3.84)'inde 120 bp uzunluğunda *entA* geni, 8 (%30.70)'inde 478 bp uzunluğunda *entB* geni, 3 (%11.53)'ünde 257 bp uzunluğunda *entC* geni varlığı tespit edilmiştir. Hiçbir izolatta *entE* *entD* geni tespit edilememiştir. İzolatların jel elektroforez görüntüsü Resim 8'de gösterilmiştir.



Resim 8. *entA-B-C-D-E* (SetI) genlerinin jel elektroforez görüntüsü
M: marker 1 Nolu örnek: *entA* ve *entC* geni: Pozitif, 5 Nolu örnek: *entB* geni: Pozitif

4.3.6. Enterotoksin G ve H Genlerinin Tespiti

entG ve *entH* genlerine spesifik primerler ile yapılmış olan PCR işlemleri sonucunda izolatlarda enterotoksin G ve H geni tespit edilememiştir.

4.3.7. *mecA* Geni Tespiti

mecA genine spesifik primerler ile yapılan PCR işlemi sonucunda izolatlarda *mecA* geni tespit edilmemiştir.

4.3.8. *mecC* Geni Tespiti

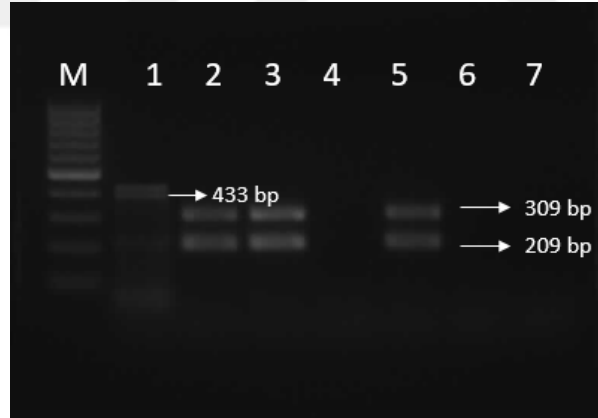
mecC genine spesifik primerler ile yapmış olduğumuz PCR işlemi sonucunda *mecC* geni tespit edilmemiştir.



Resim 9. *mecC* geni jel elektroforez görüntüsü
M: 100bp DNA ladder 1: Pozitif kontrol

4.3.9. PVL, *Hla*, *Hlb* Virulens Genlerinin Tespiti

PVL, *Hla*, *Hlb* genlerine spesifik primerler ile yapılan multipleks PCR işlemi sonucunda, 26 izolattın; 1 (%3.84)'inde 433 bp uzunluğunda *PVL* geni, 14 (%53.84)'inde 209 bp uzunluğunda *Hla* geni, 9(%34.61)'unde 309 bp uzunluğunda *Hlb* geni varlığı tespit edilmiştir. İzolatların jel elektroforez görüntüsü Resim 10'da gösterilmiştir.

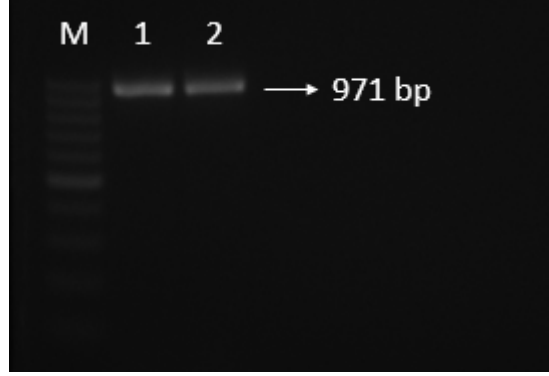


Resim 10. PVL, *Hla*, *Hlb* genleri jel elektroforez görüntüsü
M:Marker 100bp DNA ladder. 1 Nolu örnek: PVL ve *Hla* gen: Pozitif. 2,3 ve 5 Nolu örnek *hla* ve *hlb* gen: Pozitif, 4,6,7 Nolu örnek: PVL, *Hla* ve *Hlb* gen: Negatif

4.3.10. CLFA, BAP, γ -Hlg Genlerinin Tespiti

CLFA, *BAP*, γ -*Hlg* genlerine spesifik primer ile yapmış olduğumuz PCR işlemi sonucunda, 26 izolattın 2 (%7.69)'sinde BAP geni tespit edilmiştir. CLFA ve γ -*Hlg* geni tespit

edilmemiştir. BAP geninin varlığı için hedef bölge 971 bp uzunluğundaydı. İzolatların jel elektroforez görüntüsü Resim 11’de gösterilmiştir.



Resim 11. BAP geni jel elektroforez görüntüsü
M:Marker 100bp DNA ladder 1 ve 2 Nolu örnek: BAP gen: pozitif

4.3.11. TSST Geni Tespiti

tsst genine spesifik primer ile yapılan PCR işlemi sonucunda, 26 izolatın 6 (%23.07)’sında *tsst* geni tespit edilmiştir. *tsst* geninin varlığı için hedef bölge 350 bp uzunluğundaydı. İzolatların jel elektroforez görüntüsü Resim 12’de gösterilmiştir.



Resim 12. *tsst* geninin jel elektroforez görüntüsü
M: 100bp DNA ladder 1,2,3,4 Nolu örnek: Pozitif 5,6,7 Nolu örnek: Negatif

4.3.12. *vanA-B-C* Genlerinin Tespiti

vanA, *vanB*, *vanC* genlerine spesifik primerler ile yapmış olduğumuz PCR işlemi sonucunda *vanA*, *vanB*, *vanC* genleri tespit edilmemiştir.

Tablo 40. Genotipik identifikasyonu yapılan örneklerin PCR sonuçları

Örnek No.	<i>coa</i>	<i>nuc</i>	<i>tuf</i>	PVL	CLFA	<i>Hla</i>	<i>Hlb</i>	<i>Y-hlg</i>	BAP	EntA	EntB	EntC	EntD	EntE	EntG	EntH	TSST	<i>mecA</i>	<i>mecC</i>	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>	<i>vanC</i>
1k	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
3b	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3K	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8H	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
17	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19B	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29M	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30B	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30K	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
52	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
55	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
62	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
85	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
87	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
89	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
90	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
91	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
95	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

4.4. Sekans Bulguları

Araştırmamızda, mastitisli keçi sütlerinden izole ettiğimiz 16S rRNA PCR pozitif 26 örneğin Sanger sekans yöntemi ile tiplendirilmeleri yapılmıştır.

26 örneğin 6 (23,07%)'sı *Staphylococcus aureus* [Erişim Numarası (Accession Number) KY007579,1; AP023034,1; JN092619,1], 4 (%15,38)'ü *Staphylococcus succinus* [(Erişim Numarası MG819549,1; KX959978,1)], 4 (% 15,38)'ü *Staphylococcus caprae* [(Erişim Numarası CPO53957,1)], 3 (%7,69)'ü *S. chromogenes* [(Erişim Numarası CPO046028,1)], 3 (% 7,69)'ü *Staphylococcus devriesei* (Erişim Numarası JX966457,1)], 1 (%3,84)'i *Staphylococcus xylosus* [(Erişim Numarası KC534469,1)], 1 (%3,84)'i *Staphylococcus jettensis* [(Erişim Numarası JN092113,2)] olarak tiplendirilmiştir. Geriye kalan 4 (%15,38) örnek ise Sanger sekans yöntemi ile tiplendirilememiştir (Tablo 41).

Tablo 41. 16S rRNA Sekans sonuçları

Örnek No.	16S rRNA Sekans sonucu	(%) Benzerlik oranı	Erişim Numarası (Accession Number)
1k	Tiplendirilemedi		
3b	<i>S. aureus</i>	93,06(%)	KY007579
3K	<i>S. aureus</i>	98,23(%)	KY007579
8H	<i>S. devriesei</i>	99,37(%)	JX966457
12	<i>S. aureus</i>	93,06(%)	KY007579
17	<i>S. chromogenes</i>	99,05(%)	CPO046028
19B	<i>S. succinus</i>	99,36(%)	MG819549
25	Tiplendirilemedi		
29M	<i>S. succinus</i>	99,37(%)	KX95997
30B	<i>S. devriesei</i>	97(%)	JX966457
30K	<i>S. devriesei</i>	97(%)	JX966457
42	<i>S. succinus</i>	96,54(%)	KX95997
44	<i>S. xylosus</i>	98(%)	KC534469
48	Tiplendirilemedi		
52	<i>S. caprae</i>	98(%)	CPO53957
54	Tiplendirilemedi		
55	<i>S. caprae</i>	98(%)	CPO53957
62	<i>S. chromogenes</i>	97(%)	CPO046028
85	<i>S. aureus</i>	97(%)	AP023034
87	<i>S. aureus</i>	97(%)	KY007579,1
89	<i>S. succinus</i>	98(%)	KX959978,1
90	<i>S. caprae</i>	97(%)	CPO53957,1
91	<i>S. chromogenes</i>	96,54(%)	AY126159,1
95	<i>S. caprae</i>	97,80(%)	CPO53957,1
96	<i>S. aureus</i>	99,37(%)	JN092619,1
100	<i>S. jettensis</i>	99,04(%)	JN092113,2

Yapılan çalışma sonucu identifikasyonu yapılan 26 izolatın BD Phoenix M50 İdentifikasyon cihazı ve 16S rRNA Sekans sonuçları karşılaştırılmıştır (Tablo 42).

Tablo 42. BD Phoenix M50 İdentifikasyon Sonucu ve 16S rRNA Sekans sonuçlarının karşılaştırılması

Örnek No.	BD Phoenix M50 İdentifikasyon Sonucu	16S rRNA Sekans Sonucu
1k	<i>S. pettenkoferi</i>	Tiplendirilemedi
3b	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>
3K	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>
8H	<i>S. aureus</i>	<i>S. devriesei</i>
12	<i>S. warneri</i>	<i>S. aureus</i>
17	<i>S. capitis</i>	<i>S. chromogenes</i>
19B	<i>S. equorum</i>	<i>S. succinus</i>
25	<i>S. warneri</i>	Tiplendirilemedi
29M	<i>S. equorum</i>	<i>S. succinus</i>
30B	<i>S. caprae</i>	<i>S. devriesei</i>
30K	<i>S. warneri</i>	<i>S. devriesei</i>
42	<i>S. equorum</i>	<i>S. succinus</i>
44	<i>S. equorum</i>	<i>S. xylosus</i>
48	<i>S. caprae</i>	Tiplendirilemedi
52	<i>S. pettenkoferi</i>	<i>S. caprae</i>
54	<i>S. pettenkoferi</i>	Tiplendirilemedi
55	<i>S. pettenkoferi</i>	<i>S. caprae</i>
62	<i>S. simulans</i>	<i>S. chromogenes</i>
85	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>
87	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>
89	<i>S. equorum</i>	<i>S. succinus</i>
90	<i>S. pettenkoferi</i>	<i>S. caprae</i>
91	<i>S. capitis</i>	<i>S. chromogenes</i>
95	<i>S. caprae</i>	<i>S. caprae</i>
96	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>
100	<i>S. hominis</i>	<i>S. jettensis</i>

Örneklere cins düzeyinde bakıldığında *Staphylococcus* türlerini %100 oranında doğru tanımlandığı saptanmıştır. Ancak tür yönünde incelendiğinde sonuçlar birbiri ile uyuşmamaktadır. Genoma dayalı kesin tiplendirmeleri almak için Sanger sekans yöntemi kullanılarak moleküler tiplendirme ile elde edilen sonuçların fenotipik testlerle yapılan bir ön tanımlamaya göre daha uygun bir yöntem olabileceği sonucuna varılmıştır.

5. TARTIŞMA

Mastitis sütçü hayvanlarda; süt kalitesi, süt verimi ve hayvan refahını negatif olarak etkilemesi sebebiyle ekonomik açıdan göz ardı edilmemesi gereken bir hastalıktır. Ticari işletmelerde genel nedenlerden ötürü sürüden eliminasyon oranı ortalama %31.5 olup, bunun % 79.5'i bakım besleme ve hijyen yetersizliklerinden köken almaktadır. Sağlık problemlerinin %34'ünü de mastitis meydana getirmektedir (Kurt ve ark, 2019). Mastitisle alakalı uzun süreler araştırmalar gerçekleştirilmesine rağmen bu hastalık günümüzde hala meydana gelmektedir. Mastitis etiyolojisinde birçok mikrobiyel etkenin rol oynadığı bilinse de Stafilocokların en sık izole edilen ajanlar olduğu saptanmıştır. Özellikle subklinik mastitisler, *Koagulaz Negatif Stafilocok* sıklığının yüksek olduğu dünya çapında görülmektedir. Ülkemizde teşhis edilen mastitisin, %78.6'sının subklinik olarak meydana geldiği bildirilmiştir (Saydan, 2017). KNS'ler ise ülkemizde %43.9 oranında subklinik olgulardan identifiye edilmektedir. Başlıca yaygın KNS türleri *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. xylosus*, *S. hyicus* ve *S. simulans*'tır (Hadimli ve ark, 2014).

Keçilerde mastitise yol açan bakteriyel türleri majör olarak *Staphylococcus* cinsi oluşturmaktadır. Klinik aşamalarda önceleri saprofit ve non patojen kontaminant tür olarak değerlendirilen *Koagulaz Negatif Stafilocoklar* ise, son 30 yıl zarfında çok önemli infeksiyon kaynağı olarak literatürde yer bulmuştur (Saydan, 2017).

Subklinik mastitis (SCM), süt keçisi sürülerindeki en zorlu hastalıklardan biridir çünkü üretim kaybı, süt kalitesinin ve hijyenin düşürülmesi, artan ikame maliyeti ve önemli veteriner giderleri ile ilişkilendirilmiştir. Çeşitli sistemler altında yetiştirilen keçilerde subklinik mastitis vakalarından çeşitli çevresel ve bulaşıcı patojenler izole edilmiştir. *Koagulaz Negatif Stafilocoklar* ve *S. aureus* sıklıkla subklinik mastitis vakalarından izole edilirken, Streptokok türleri, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae* üyeleri, *Mycoplasma* türleri ve diğer patojenler daha düşük oranda ortaya çıkmaktadır. Keçi sürülerinden farklı patojenlerin izolasyon sıklığı, sürülerin genel hijyenik durumu ve bakım-besleme şemalarıyla güçlü bir şekilde ilişkilidir. Sürü yönetim sisteminden bağımsız olarak, hijyenik uygulamaların yetersizliği, meme patojenleri ile çevresel kontaminasyonda ve meme içi infeksiyon oluşmasında çok önemli bir rol oynamaktadır. *Koagulaz Negatif Stafilocoklar* arasında *S. epidermidis*, daha sonra *S. xylosus*, *S. chromogenes* ve *S. simulans* daha sık izole edilmektedir. Keçilerde *S. caprae* en yaygın türlerden biridir ve onu diğer türler izlemektedir. Ek olarak, KNS arasında *S. epidermidis*, *S. caprae*'nın tersine, hem koyunlarda hem de

keçilerde genellikle en yüksek ortalama somatik hücre sayısı değerleri ile ilişkilidir. Subklinik infeksiyondan izole edilen KNS suşlarının %60 ila 80'inden fazlası hemolitik toksin üretmektedir (Krishnamoorthy ve ark, 2016). Araştırmamız sonucunda izole edilmiş Stafilokok türleri, dominant olarak koagulaz negatif karakterde olup *S. equorum* (%19), *S. pettenkoferi* (%19), *S. epidermidis* (%19), *S. warneri* (%12), *S. caprae* (%12), *S. capitis* (%7), *S. simulans* (%4), *S. hominis* (%4) ve *S. aureus* (%4) olarak belirlenmiştir. *S. aureus*, etkili bir patojen etken olmakla beraber, subklinik mastitis hastalığında daha çok Koagulaz Negatif Stafilokoklar kendini göstermektedir (Resch ve ark, 2008). Araştırmamızda sadece 1 adet *S. aureus* izole edilmesi, bu bilgiyi doğrular nitelikte saptanmıştır. Bu çalışmada *Koagulaz Negatif Stafilokokların* daha yüksek oranda bulunmasının nedeninin, keçilerin hijyenik olmayan çevresel koşullarda barındırılmasından kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir.

Araştırmamızda toplam 110 adet süt örneğinin 26 (%23.6)'sinden *Staphylococcus* sp. (5 *S. equorum* (%19), 5 *S. pettenkoferi* (%19), 5 *S. epidermidis* (%19), 3 *S. warneri* (%12), 3 *S. caprae* (%12), 2 *S. capitis* (%7), 1 *S. simulans* (%4), 1 *S. hominis* (%4) ve 1 *S. aureus* (%4)), 15 (%13.8) *Streptococcus* sp., 13 (%12) *Bacillus* sp., 10 (%9) *Lactobacillus* sp., 7 (%6.3) *Shigella* sp., 7 (%6.3) *Escherichia coli*, 7 (%6.3) *Corynebacterium* sp., 5 (%4.5) *Klebsiella* sp. ve 3 (%2.7) *Flavobacterium* sp. izole ve identifiye edilmiştir. Geriye kalan 17 (%15.5) örnekte ise bakteriyel üreme görülmemiştir.

Elazığ ilinde mezbahada kesilen mastitisli 89 hayvana ait 133 meme lobu ve mastitisli 40 keçiye ait 67 meme lobu bakteriyolojik olarak incelenmiş ve sonuç olarak koyunlarda %24.06 *S. aureus*, %10.53 *E. coli*, %7.52 *Actinomyces pyogenes*, %7.52 *Streptococcus uberis*, %6.01 *Streptococcus dysgalactiae*, %5.26 *Streptococcus agalactiae*, %3.76 *Staphylococcus epidermidis*, %3.76 *Mannheimia haemolytica* izole ve identifiye edilmiştir. Keçilerde %25.37 *S. aureus*, %8.96 *E. coli*, %7.46 *Staphylococcus epidermidis*, %7.46 *Streptococcus agalactiae*, %7.46 *A. pyogenes*, %5.97 *Streptococcus dysgalactiae*, %2.99 *S. uberis*, %2.99 *M. haemolytica* izole ve identifiye edilmiştir (Gülcü ve Öngör, 2002).

Bu çalışmada 110 süt örneğinin 93'ünden (% 84.5) bakteri izolatu elde edilmiştir. Bu 93 izolatu 26'sı (%23.6) Stafilokok türü olarak belirlenmiştir. Ayrıca izole edilen organizmalar arasında KNS en yaygın mikroorganizma olarak saptanmıştır. Benzer şekilde White ve Hinckley (1999), keçi mastitisinde en yaygın etkenlerin hemolitik olmayan *Staphylococcus* sp. (n = 406, %38.2), *S. aureus* (n = 117, %11.0), *S. agalactiae* (n = 43, % 4.1), *E. coli* (n = 17, %1.6) ve *Pseudomonas* sp. (n = 13, %1.2) olarak bildirmiştir. Aydın ve arkadaşları (2009), klinik olarak sağlıklı meme yarısından elde edilen 700 süt örneğinde 60 örnekte subklinik mastitis tespit etmiştir. KNS'nin izole edilen baskın organizmalar (%50) olduğunu

ve bunu *Streptococcus* sp. (%15), *S. aureus* (%11.7) ve diğer patojenlerin (%23.3) izlediğini belirtmiştir. İlhan ve arkadaşları (2011) ise 148 keçiden elde edilen süt örnekleri üzerinde bir çalışmada klasik bakteriyolojik kültür yöntemlerini kullanmıştır. 148 örneğin 69'unda (% 46.6) bakteriyolojik izolasyon tespit etmişlerdir. Süt örneklerinden izole edilen bakteri suşlarında 42 adet (% 60.8) KNS, 11 adet (%15.9) *S. aureus*, 11 adet (%15.9) *E. coli*, 2 adet (%2.9) *Corynebacterium* sp., 1 adet (%1.4) *Streptococcus* sp., 1 adet (%1.4) *C. pseudotuberculosis* ve 1 adet (%1.4) *Aeromonas* sp. saptamışlardır. Subklinik mastitisli hayvanlardan keçi sütünde en sık izole edilen bakterinin KNS olduğu sonucuna varılmıştır. Islam ve arkadaşları (2011) ayrıca KNS'nin keçi mastitisinde (n = 52, %57.78) izole edilen en yaygın mikroorganizma olduğunu ve bunu *S. aureus* (n = 4, % 4.44), *Streptococcus* sp. (n = 4, %4.44), *Bacillus* sp., (n = 3, %3.33), *E. coli* (n = 5, %5.55) ve tanımlanamayan diğer Gram negatif bakterilerin (n = 14, %15.55) izlediğini belirtmiştir. Öte yandan, bazı çalışmalarda (Çiftçi ve ark, 1996; İşnel ve Kırcan, 2012; Najeeb ve ark, 2013) *Koagulaz Pozitif Stafilocokların* en yaygın mikroorganizmalar olduğu bulunmuştur. Çiftçi ve arkadaşları (1996), 500 keçide %9 (45 süt örneği) subklinik mastitis prevalansı bildirmiştir. Çalışmalarında *Koagulaz Pozitif Stafilocoklar* (%38.2) en yaygın mikroorganizmalar olurken, onu KNS (%11.8), *Corynebacterium* sp. (%23.5), *E. coli* (%14.7), mayalar (%5.9) ve *Flavobacterium* sp. (%5.9) izlemiştir. İşnel ve Kırcan (2012) kıl keçilerinden 152 adet süt örneğinden 102 (%67.1) adet izolasyon yapmışlardır. Çalışmalarında *S. aureus* (n=71, %69.6) en yaygın izolat olarak bulunmuş, ardından *S. epidermidis* (n = 8, %7.8), *S. intermedius* (n = 5, %4.9), *S. hyicus* (n = 6, %5.9), *Corynebacterium* sp. (n = 3, %2.9), *Klebsiella pneumoniae* (n = 4, %3.9), *Pseudomonas* sp. (n = 2, %2.0), *E. coli* (n = 2, %2.0) ve *Mannheimia haemolytica* (n = 1, %1.0) türleri tanımlanmıştır. Ali ve arkadaşları (2010), 543 keçide subklinik mastitis prevalansının 71 (%13) olduğunu belirtmişlerdir. İzole edilen mikroorganizmalar arasında en yaygın mikroorganizmanın *S. aureus* (%45.34) olduğunu ve bunu *Streptococcus* sp. (%22.74), *E. coli* (% 11.55) ve *Klebsiella* sp. (%3.65) türlerinin izlediğini bildirmişlerdir. Najeeb ve arkadaşları (2013), 200 süt örneğinin 90'ında (%45) bakteriyel üreme bildirmiş ve pozitif süt örneklerinde 146 suş tespit etmiştir. Bu suşlar arasında *S. aureus* (%61.64) prevalansı en yüksek olup, onu *E. coli* (%10.96), *Streptococcus* sp. (%9.59), *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. (%6.85) ve *Corynebacterium* sp. (%4.11) izlemiştir. Hatay'da yapılan başka bir çalışmada Doğruer ve arkadaşları (2013), 505 keçiden alınan 200 CMT-pozitif süt örneğinin %41.4'ünde bakteri üremesi rapor etmiştir. Bu suşlar arasında en yaygın mikroorganizmalar KNS (%51.1), ardından *Koagulaz Pozitif Stafilocoklar* (%20.4), *Streptococcus* sp. (%8), *Bacillus* sp. (%5.7), *E. coli* (%4.5), *Corynebacterium* sp.

(%3.4), *Pseudomonas* sp. (%2.3) ve *Acinetobacter* sp. (%2.3) bulunmuştur. İdentifiye edilen bakteri türleri arasındaki farklılıkların sağım hijyeni (sağım ortamı ve sağımcı el hijyeni), altlık malzemesi, iklim farklılıkları ve sağım sonrası meme ucu daldırma kullanımı veya kullanılmaması nedeniyle meydana gelebileceği düşünülmektedir.

Bulgaristan'da 6 farklı hayvan çiftlikten toplam 478 keçide yapılan araştırmalar neticesinde 100 hasta hayvanda subklinik mastitis belirlenmiştir. Pozitif süt numunelerinden 96 adet Stafilocok türü identifiye edilmiştir. İzolasyon sonrasında 19 türün *S. aureus* (%19.8), diğer 77 (%80.2) türün de Koagulaz Negatif Stafilocok olduğu saptanmıştır (Bochev ve Russenova, 2005).

İtalya'da 2 farklı sürüden 156 keçi ile yapılan bir çalışmada tüm laktasyon boyunca hayvanlar mastitis açısından monitorize edilmiş, hastalık olgularında %80.7 oranında *Koagulaz Negatif Stafilocokların* izole edildiği bildirilmiştir. İlk grupta, hastalığa yol açan neredeyse tüm etkenlerin (%96) *Koagulaz Negatif Stafilocoklardan* köken aldığı bulunmuştur, *S. caprea* ise sık görülen patojen ajan olarak %43 oranında saptanmıştır. İkinci keçi grubunda ise, infeksiyonların %67 oranında *Koagulaz Negatif Stafilocoklardan* köken aldığı ve *S. epidermis*'in de sık görülen patojen ajan olduğu belirlenmiştir (Moroni ve ark, 2005). Araştırmamızda elde edilen veriler, bu bilgileri destekler nitelikte bulunmuştur.

Moleküler tabanlı tekniklerin identifikasyonda kullanılması, Stafilocok türlerinin identifikasyonunda ve genotiplendirilmesinde sağlamış olduğu spesifite ve sensitivite dolayısıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Bakteri sınıflandırılmasında ve bakterilerin veteriner sahada *16S rRNA* gen sekansının sıklıkla kullanıldığı bildirilmiştir (Chai ve ark, 2003).

Heikens ve arkadaşları (2005) çalışmalarda *16S rRNA* ve *tuf* geninin önemini belirtmiştir. Bes ve arkadaşları (2000) bakteriyel genler arasında DNA sıralaması için en uygun bölgenin *16S rRNA* geni olduğunu belirtirken, Murru ve arkadaşları (2005) Stafilocokların tüm suşlarının *16-23S rRNA* bölgesinin amplifikasyonu ile spesifik bir yapı gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Lan ve Reeves (2001), ruminant kökenli KNS'lerin identifikasyonu ve serovarı ile ilgili araştırmasında 263 adet KNS izolatının genotipik identifikasyonunda *16S rRNA* geninden faydalanmıştır. Vanderhaeghen ve arkadaşları (2014) 98 adet subklinik mastitisli süt numunesinden KNS genotipik identifikasyonunda *tuf* primer sekansını kullanmıştır. Heikens ve arkadaşları (2005) amplifikasyon sırasında ekstensiyonu belirleyen Tu faktörünü içeren *tuf* genini KNS'lerin Stafilocoklardan diferensiyasyonu için kullanarak, *tuf* geni identifikasyonunun *16S rRNA*'ya nazaran KNS identifikasyonunda daha stabil olduğunu yaptıkları çalışmalar sonucunda bildirmişlerdir. Ghebremedhin ve arkadaşları

(2008) farklı Stafilocok serogruplarında 16S rRNA için %96-99 oranında pozitiflik tespit etmiştir. Bu çalışmada kullanılan 26 izolatin tamamı 16S rRNA ve 24 adedinin *tuf* geni taşıdığı tespit edilerek Stafilocok ve KNS olduğu doğrulanmıştır.

Alfa hemolitik toksin, çoğu zaman transmembran porlara birikip eritrositleri parçalayarak tesir etmektedir. β hemolizin ise, sfingomyeline özgü fosfolipaz aktivitesi, parsiyel hücre lizisine neden olarak etki göstermektedir (Dinges ve ark, 2000). Brinda ve arkadaşları (2010) izole edilen 44 KNS izolatinın 4'ünün (%9) α hemoliz, 24'ünün (%54.5) β hemoliz, 16'sının (%36.3) hemoliz oluşturmadığını bildirmişlerdir. Savaşan ve arkadaşları (2017) ise mastitisli Sütlerden izole edilen Stafilocoklarda β hemolizin oranını %36.73 olarak tespit etmişlerdir. Wald ve arkadaşları (2019) 81 sığır memesinden izole ettikleri 100 KNS izolatinın 8'inde (%8) β hemoliz, 6'sında (%6) merkezi beyaz çevreye doğru saydamlaşan yarı şeffaf grimsi koloniler tespit etmişlerdir. Bu çalışmada *Hla*, *Hlb* ve γ -Hlg genlerine spesifik olarak yapılan PCR sonucunda Stafilocok izolatlarının 14 adedinde (%53.84) α hemoliz, 9 (%34.61)'unda β hemoliz oluşturduğu gözlenirken, γ hemoliz (non hemolitik) saptanmamıştır. Hemoliz ile alakalı araştırma verilerinin değişik oranlarda saptanması; temin edilen kan türünden, besiyeri kalınlığından, inkubasyon koşullarından ve koloni formasyonunun farklılığından meydana gelebileceği yorumlanmıştır.

Enterotoksin meydana getiren KNS'ler *S. intermedius*, *S. hyicus* ve *S. epidermidis* 'tir. Besin intoksikasyonuna da yol açan enterotoksinlerin infeksiyon oluşturması için belli seviyede olması gerekmektedir. *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* klasik Stafilocokkal enterotoksinlerdir (Balaban ve Rasooly 2000). Park ve arkadaşları (2011) mastitisli hayvanlardan izole ettikleri 263 KNS izolatinın 4'ünde (%1.5) *sea*, 55'inde (%20.9) *seb*, 3'ünde (%1.1) *sec*, 6'sında (%2.2) *sed*, 3'ünde (%1.1) *see* enterotoksin genlerini saptamışlardır. Guimaraes ve arkadaşları (2013) Brezilya'da mastitisli numunelerden izole ettikleri 75 KNS izolatinın 43'ünde (%57.3) *sea*, 9'unda (%12) *seb*, 14'ünde (%18.7) *sec*, 9'unda (%12) *sed* genlerini tespit etmişlerdir. Piechota ve arkadaşları (2014) sağlıklı sütler ve barınaklardan topladıkları sütlerin izolasyonundan elde ettikleri 138 KNS'nin 1'inde (%0.7) *sea*, 1'inde (%0.7) *seb*, 13'ünde (%9.4) *sec*, 3'ünde (%2.1) *sed*, 3'ünde (%2.1) *see* genlerini saptamışlardır. Aynı araştırmacılar süttten izole ettikleri KNS'lerde %15.5, çevresel örneklerden izole ettikleri KNS'lerde %6.5 oranında enterotoksin geni bulduklarını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada *entA*, *entB*, *entC*, *entD*, *entE* genlerine spesifik primerler ile yapılan multipleks PCR işlemi sonucunda, 26 izolatin; 1 (%3.84)'inde 120 bp uzunluğunda *entA* geni, 8 (%30.70)'inde 478 bp uzunluğunda *entB* geni, 3 (%11.53)'ünde 257 bp uzunluğunda *entC* geni varlığı tespit edilmiştir. *entE*, *entD*, *entG* ve *entH* geni tespit edilememiştir. Günümüzde

mastitise sebep olan Stafilocokların yaygın olarak tespit edilmesine rağmen enterotoksin genlerinin mastitiste etkisi hakkında tatmin edici bilgi bulunmamaktadır, dolayısıyla ülkemizde de toksin genlerin tespiti ile daha fazla çalışma yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Antibiyotikler, bakterilerin yol açtığı mastitislerin tedavisinde ve profilakside kullanılsa da meydana gelebilen dirençten dolayı; tedavi ve korunmada umulan etkiyi gösteremeyebilirler. Özellikle mastitise neden olan ve sıklıkla izole edilen *Koagulaz Negatif Stafilocokların* birçok antibiyotiğe karşı çoklu direnç gösterdiği belirtilmiştir (Sawant ve ark, 2005). β -laktamaz olarak adlandırılan penisilinazlar, penisilin ile beraber bazı β -laktam antibiyotikleri parçalayarak etki etmektedir (Arda, 2011). β -laktamaz geni; diğer antibiyotik direnç genleri ile birlikte plazmid üzerinde aktarılacak çoklu direnç oluşumuna neden olabilmektedir. Araştırmamızda elde edilen Stafilocok izolatlarının da söz konusu antibiyotik gruplarından olan Amoksisilin-Klavulanik asit, Ampisilin ve Penisilin G antibiyotiklerine karşı dirençli bulunduğu saptanmıştır. Bununla birlikte elde edilen Stafilocok izolatları Tobramisin, Trimetoprim-Sulfometoksazol, Vankomisin, Sefoksitin, Siprofloksasin, Gentamisin ve Levofloksasin antibiyotiklerine karşı tam duyarlı, Klindamisin, Daptomisin, Eritromisin, Fosfomisin, Fusidik Asit, Linezolid, Nitrofurantoin, Oksasilin, Kinupristin-dalfopristin, Rifampin, Teikoplanin, Tetrasiklin ve Tigesiklin antibiyotiklerine ise değişen oranlarda duyarlı olduğu saptanmıştır.

Metisiline dirençli ve duyarlı Stafilocoklar, PBP2a taşımaktadır. Penisilin bağlayan protein (2a), 2 kb'lik DNA segmentine yerleşen *mecA* geni tarafından kodlanmaktadır. Ayrıca transdüksiyon ile dirençli suşlardan duyarlı suşlara aktarılabilir. Sampimon ve arkadaşları (2011) inek sütlerinden izole ettikleri KNS'lerin %13'ünde *mecA* geni tespit ederek metisilin direncini saptamışlardır. Belçika'da Piessens ve arkadaşları (2012) 6 farklı işletmeden toplanan çevresel ve süt numunelerinden izole edilen 366 KNS'den 22 tür bildirilmiştir. Toplam izolatlarda %11.7 oranında *mecA* tespit edilirken; süt örneklerinde %10.38 oranında, çevresel örneklerde ise %12.1 oranında *mecA* geni bulmuşlardır. Tunus'ta Klibi ve arkadaşları (2018) sütlerden izole edilen metisilin dirençli KNS'lerin karakterizasyonu ile ilgili çalışmada; metisilin dirençli ve şüpheli 20 KNS izolatının 14 (%70)'ünde *mecA* geni bulmuşlardır. Araştırmamızda ise *mecA* ve *mecC* geni, ayrıca Vankomisin direnci açısından *vanA*, *vanB*, ve *vanC* spesifik primerler ile yapılan PCR işlemi sonucunda ilgili genler açısından pozitiflik tespit edilmemiştir.

Araştırmamızda sekansı yapılan 4 adet izolatın, Gupta ve arkadaşlarının 2011 yılında yapmış olduğu çalışma neticesinde tiplendirdikleri JN092619 (*S. aureus*) erişim numaralı

izolat ile %93,0-97,0 oranları arasında, 1 adet izolatın, Krohn ve arkadaşlarının 2016 yılında yapmış olduğu çalışma neticesinde tiplendirdikleri KY007579 (*S. aureus*) erişim numaralı izolat ile %99,37 oranında, 1 adet izolatın, Takadama ve arkadaşlarının 2020 yılında yapmış olduğu çalışma neticesinde tiplendirdikleri AP023034 (*S. aureus*) erişim numaralı izolat ile %97 oranında, 1 adet izolatın, Ali ve arkadaşlarının 2015 yılında yapmış olduğu çalışma neticesinde tiplendirdikleri MG819549 (*S. succinus*) erişim numaralı izolat ile %97 oranında, 1 adet izolatın, Ali ve arkadaşlarının 2015 yılında yapmış olduğu çalışma neticesinde tiplendirdikleri KX95997 (*S. succinus*) erişim numaralı izolat ile %99,37 oranında, 3 adet izolatın Shwani ve arkadaşlarının 2019 yılında yapmış olduğu çalışma neticesinde tiplendirdikleri CPO046028 (*S. chromogenes*) erişim numaralı izolat ile %97-98 oranında, 4 adet izolatın Bojja ve arkadaşlarının 2019 yılında yapmış olduğu çalışma neticesinde tiplendirdikleri CPO53957 (*S. caprae*) erişim numaralı izolat ile %97-98 oranında, 3 adet izolatın, Pandey ve arkadaşlarının 2012 yılında yapmış olduğu çalışma neticesinde tiplendirdikleri JX966457 (*S. devriesei*) erişim numaralı izolat ile %97-99 oranında, 1 adet izolatın, Lin'in 2013 yılında yapmış olduğu çalışma neticesinde tiplendirdiği KC534469 (*S. xylosus*) erişim numaralı izolat ile %98 oranında, 1 adet izolatın De Bel ve arkadaşlarının 2011 yılında yapmış olduğu çalışma neticesinde tiplendirdikleri JN092113 (*S. jettensis*) erişim numaralı izolat ile %99,04 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Mastitis bakterilerin yol açtığı önemli bir meme bezi hastalığıdır. Mastitise bağlı olarak seneler içerisinde dramatik ekonomik giderler oluşmaktadır. Enfeksiyon tarafından ortaya çıkan mali kayıplar sadece süt üretiminde düşüş ile sınırlı kalmayıp, enfeksiyon terapisi, sürüden hastalıklı hayvanların eliminasyonu gibi komplikasyonları da içine almaktadır. Ayrıca çok mühim bir besin bileşeni olan sütün kalitesindeki bozulma halk sağlığı açısından da olumsuz sonuçlara yol açabilmektedir.

Araştırmamızda, toplam 110 adet hayvana ait mastitisli süt örneklerinden Stafilocok türlerinin ve diğer bakterilerin identifikasyonları biyokimyasal yöntemlere ilave olarak otomatize sistem ve PCR ile yapılmıştır. Süt örneklerinin %23.6'sından Stafilocok izolasyonu yapılmıştır. Yapılan identifikasyon çalışmaları sonucunda, 5 *S. equorum* (%19), 5 *S. pettenkoferi* (%19), 5 *S. epidermidis* (%19), 3 *S. warneri* (%12), 3 *S. caprae* (%12), 2 *S. capitis* (%7), 1 *S. simulans* (%4), 1 *S. hominis* (%4) ve 1 *S. aureus* (%4), 15 (%13.8) *Streptococcus* sp., 13 (%12) *Bacillus* sp., 10 (%9) *Lactobacillus* sp., 7 (%6.3) *Shigella* sp., 7 (%6.3) *E. coli*, 7 (%6.3) *Corynebacterium* sp., 5 (%4.5) *Klebsiella* sp. ve 3 (%2.7) *Flavobacterium* sp. izole ve identifiye edilmiştir. Toplam 17 (%15.5) örnekte ise bakteriyel üreme görülmemiştir.

Araştırmamız sayesinde keçi yetiştiriciliğinde süt üretimi için çok mühim olan subklinik tipteki mastitis hastalığındaki etkenlerin spesifik yöntemler ile tanımlanması, hastalığın ülkemiz ve Aydın ili civarı durumunun belirlenmesi açısından gelecek çalışmalara rehber olacak niteliktedir. Gelecek araştırmalar, ülkemiz için hastalığın teşhis ve terapi prosedürlerinin oluşturulmasında katkı sağlayabilecektir. Antimikrobiyel terapinin uygulanacağı vakalarda *Koagulaz Negatif Stafilocok* türlerinin saptandığı sürülerde araştırmamızda da belirlenen farklı antibiyotik duyarlılıklarının olabileceğinin dikkate alınması önerilmektedir. Elde edilen sonuçlar ışığında, keçilerde subklinik mastitis hastalığının süt verimini etkileyebileceği, sütün kalitesini bozabileceği öngörülmektedir. Keçilerdeki subklinik mastitis olgularında tanı ve tedaviye yönelik çalışmaların keçi yetiştiricilerine faydalı olacağı düşünülmektedir.

Ayrıca KNS izolatlarının PCR ile saptanmasında *16S rRNA* ve *tuf* genlerinin kullanılabileceği, konvansiyonel bakteriyolojik yöntemlerle PCR'nin uyumlu olduğu, KNS izolatlarının α , β , γ hemolizi farklı oranlarda oluşturdukları, ancak α hemoliz oluşturan KNS izolatlarının daha fazla oranda saptandığı, KNS izolatlarında metisilin ve vankomisin direncinin saptanmadığı, bu nedenle de keçilerden alınan mastitisli sütlerin metisilin direncini insanlara süt ve süt ürünleri ile geçmesinin halk sağlığı açısından çok fazla önemi bulunmadığı, β -laktam grubu antibiyotiklere karşı direncin yüksek olduğu, veteriner hekimlikte mastitisin tedavisinde bu antibiyotiklerin kullanımının sınırlandırılması gerektiği, diğer antibiyotiklere karşı duyarlılık saptanmasına rağmen, bakteri izolatlarının tür bazında değerlendirildiğinde değişen oranlarda çoklu ilaç dirençleri gelişebildiği, bu nedenlerden dolayı mastitis tedavisinde rastgele antibiyotik kullanımının önüne geçilmesi gerektiği sonucuna ulaşılmıştır.

Son olarak; yapılan çalışma sonucunda, kullanılan hızlı tanı sistemleri biyokimyasal test tabanlı sonuçlar verdiği için Sanger sekans sonuçları ile paralellik göstermemektedir. *Staphylococcus* türleri birbirine yakın biyokimyasal özelliklere sahip olduklarından dolayı moleküler tiplendirme ile elde edilen sonuçların daha değerli olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Aarestrup FM, Schwarz S.** “Staphylococci and streptococci” In: Aarestrup F.M. (Ed.), Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin. *ASM Press*, Washington, DC, 2006, 187-206.
- Aarestrup FM, Agersø Y, Ahrens P, Østergaard Jzrgensen JC, Madsen M, Jensen LB.** “Antimicrobial susceptibility and presence of resistance genes in staphylococci from poultry”, *Veterinary Microbiology* 2000, 74, 353-64.
- Ali S.** Corn Sap Bacterial Endophytes and Their Potentials in Plant Growth-Promotion. *Environmental Sustainability* 2018, 1, 341-355.
- Ali Z, Muhammad G, Ahmad T, Khan R, Nazet S.** Prevalence of Caprine Sub-Clinical Mastitis, its Etiological Agents and their Sensitivity to Antibiotics in Indigenous Breeds of Kohat, Pakistan. *Pakistan Journal of Life and Social Sciences* 2010, 8(1), 63–67.
- Aman MJ, Karauzum H, Bowden MG, Nguyen TL.** Structural model of the pre-pore ring-like structure of Pantone-Valentine leukocidin: providing dimensionality to biophysical and mutational data. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 2010, 28, 1–12.
- Ameh JA., Tari IS..** Observations on the prevalence of caprine mastitis in relation to predisposing factors in Maiduguri. *Small Ruminant Research* 1999, 35, 1–5.
- Ammam F, Marvaud JC, Lambert T.** Distribution of the *vanG*-like gene cluster in *Clostridium difficile* clinical isolates. *Canadian Journal of Microbiology* 2012, 58(4), 547–51.
- Anderson ME, Lefebvre SL, Weese JS.** Evaluation of prevalence and risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in veterinary personnel attending an international equine veterinary conference. *Veterinary Microbiology* 2008, 129, 410–417.
- Arbuthnott JP.** Staphylococcal alpha-toxin. In: Montie TC, Kadis S, Ajl SI, editors. Microbial toxins, vol. III. New York, NY: Academic Press; 1970, 189–236.
- Arda M.** Temel Mikrobiyoloji (4. Baskı), MedisanYayın serisi, Ankara, 2011, 31(71), 510-17.

Aydin İ, Kav K, Çelik HA. Identification and antimicrobial susceptibility of subclinical mastitis pathogens isolated from hair goats' milk. *Journal of Animal Veterinary advances* 2009, 8, 1086-1090.

Ayliffe GA. 1997. The progressive intercontinental spread of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases* 24 (Suppl. 1), 74–79.

Baddour LM. Virulence factors among gram-positive bacteria in experimental endocarditis. *Infection and Immunity*, 1994, 62, 2143–2148.

Baird-Parker AC. A classification of micrococci and staphylococci based on physiological and chemical tests. *Journal of General Microbiology*, 1963, 30, 409–27.

Balaban N, Rasooly A. Review: Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology* 2000, 61(1), 1-10.

Bannoehr J1, Ben Zakour NL, Waller AS, Guardabassi L, Thoday KL, van den Broek AH, Fitzgerald JR. Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* group: insights into agr diversification and the emergence of methicillin-resistant strains. *Journal of Bacteriology* 2007, 189, 8685–8692.

Barber M. Methicillin-resistant staphylococci. *Journal of Clinical Pathology* 1961;14:385–93.

Bar-Gal GK, Blum SE, Hadas L, Ehrlich R, Monecke S, Leitner G. “Host specificity of *Staphylococcus aureus* causing intramammary infections in dairy animals assessed by genotyping and virulence genes”, *Veterinary Microbiology* 2015, 176, 143-154.

Barkema HW, Green MJ, Bradley AJ, Zadoks RN. “Invited review: the role of contagious disease in udder health”, *Journal of Dairy Science* 2009, 92, 4717-29.

Barros EM, Iório NLP, de Freire Bastos MC, Santos KRN, Giambiagi-deMarval M. Species-level identification of clinical staphylococcal isolates based on polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism analysis of a partial *groEL* gene sequence. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2007, 59, 251–257.

Barski P, Piechowicz L, Galiński J, Kur J. Rapid assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using multiplex PCR. *Molecular and Cellular Probes* 1996, 10, 471–475.

Becker K, Harmsen D, Mellmann A, Meier C, Schumann P, Peters G, von Eiff C. Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. *Journal of Clinical Microbiology* 2004, 42, 4988–4995.

Becker K, Haverkämper G, von Eiff C, Roth R, Peters G. Survey of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene in non-*Staphylococcus aureus* species. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2001a, 20, 407–409.

Becker K, Keller B, von Eiff C, Brück M, Lubritz G, Etienne J, Peters G. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus intermedius*. *Applied and Environmental Microbiology* 2001b, 67, 5551–5557.

Becker K, von Eiff C. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, editors. *Manual of clinical microbiology*. 10th ed. Washington, DC: ASM Press, 2011, 308–330.

Belmonte G, Cescatti L, Ferrari B, Nicolussi T, Ropele M, Menestrina G. Pore-formation by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin in lipid bilayer: temperature and toxin concentration dependence. *European Biophysics Journal* 1987, 14, 349–358.

Bergdoll, MS. Enterotoxins. In: Easman, CSF, Adlam, C, (eds) *Staphylococci and Staphylococcal Infections*. Academic Press; London, UK, 1983, 559–598.

Bergeron M, Dauwalder O, Gouy M, Freydiere AM, Bes M, Meugnier H, Benito Y, Etienne J, Lina G, Vandenesch F, Boisset S. Species identification of staphylococci by amplification and sequencing of the *tuf* gene compared to the *gap* gene and by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2011, 30, 343–354.

Bergonier D, de Crémoux R, Rupp R, Lagriffoul G, Berthelot X. Mastitis of dairy small ruminants. *Veterinary Research* 2003, 34, 5, 689–716.

Berube BJ, Bubek Wandeburg J. *Staphylococcus aureus* α -toxin: nearly a century of intrigue. *Toxins (Basel)* 2013, 5, 1140–1166.

Bes M, Guerin-Faublee V, Meugnier H, Etienne J, Freney J. Improvement of the identification of staphylococci isolated from mammary infections using molecular method. *Veterinary Microbiology* 2000, 71, 287-94

Bhakdi S, Trantum-Jensen J. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology Reviews* 1991, 55, 733–751.

Bialkowska-Hobrzanska H, Harry HV, Jaskot D, Hammerberg O. Typing of coagulase-negative staphylococci by Southern hybridization of chromosomal DNA fingerprints using a ribosomal RNA probe. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 1990, 9, 588–594.

Billot-Klein D, Gutmann L, Bryant D, Bell D, Van Heijenoort J, Grewal J, Shlaes DM. Peptidoglycan synthesis and structure in *Staphylococcus haemolyticus* expressing increasing levels of resistance to glycopeptide antibiotics. *Journal of Bacteriology* 1996, 178, 4696–4703.

Birch-Hirschfeld D. Über die Agglutination von Staphylokokken durch Bestandteile des Säugetierblutplasmas. *klinische wochenschrift* 1934, 13, 331–333.

Bjerketorp J, Jacobsson K, Frykberg L. The von Willebrand factor-binding protein (vWbp) of *Staphylococcus aureus* is a coagulase. *FEMS Microbiology Letters* 2004, 234, 309–314.

Bochev I, Russenova N. Resistance of *Staphylococcus* spp. Strains Isolated from Goats with Subclinical Mastitis. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 2005, 8, (2), 109-118.

Bond R, Loeffler A. What's happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of multi-drug resistance. *Journal of Small Animal Practice* 2012, 53, 147–154.

Boscós C, Stefanakis A, Alexopoulos C and Samartzi F. “Prevalence of subclinical mastitis and influence of breed, parity, stage of lactation and mammary bacteriological status on Coulter Counter Counts and California Mastitis Test in the milk of Saanen and autochthonous Greek goats ” *Small Ruminant Research*, 1996, 21, 139–147.

Boyd DA, Willey BM, Fawcett D, Gillani N, Mulvey MR. Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06–0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel D-Ala- D-Ser gene cluster, *vanL*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008, 52(7), 2667–72.

Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA. “Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene”, *Journal of Clinical Microbiology* 1992, 30, 1654-60.

Brinda MV, Herman V, Fodor IH. Phenotypic Characterization Of Coagulase-Negative *Staphylococci* Isolated From Mastitic Milk In Cows. *Lucrari Stiintifice - Medicina Veterinara* 2010, 11 (1), 100.

Bugg TD, Wright GD, Dutka-Malen S, Arthur M, Courvalin P, Walsh CT. 1991. Molecular basis for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147: biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins *vanH* and *vanA*. *Biochemistry* 30, 10408– 10415.

Burnet FM. The exotoxins of *Staphylococcus pyogenes aureus*. *The Journal of Pathology and Bacteriology* 1929, 32, 717–734.

Carfora V, Caprioli A, Marri N, Sagrafoli D, Boselli C, Giacinti G, Giangolini G, Sorbara L, Dottarelli S, Battisti A. Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Central Italy, *International Dairy Journal* 2015, 42, 12–15.

Cassidy P, Harshaman S. Studies on the binding of staphylococcal 125I-labeled alpha-toxin to rabbit erythrocytes. *Biochemistry* 1976, 15, 2348-2355.

Castro-Sánchez E, Moore LSP, Husson F, Holmes AH. What are the factors driving antimicrobial resistance? Perspectives from a public event in London. *BMC Infectious Diseases* 2016, 16 (1), 465.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Antibiotic Resistance Threats in the United States, Atlanta, 2013.

Chai H, Archambault M, Prescott JF. 16S ribosomal RNA sequence-based identification of veterinary clinical bacteria. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2003, 15, 465-69.

Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clinical Microbiology Reviews* 1997;10(4):781–91

Chapman GH, Berens C, Peters A, Curcio L. Coagulase and hemolysin tests as measures of the pathogenicity of Staphylococci. *Journal of Bacteriology* 1934, 28, 343–363.

Cheng AG, Kim HK, Burts ML, Krausz T, Schneewind O, Missiakas DM. Genetic requirements for *Staphylococcus aureus* abscess formation and persistence in host tissues. *FASEB Journal* 2009, 23, 3393–3404.

Cheng AG, McAdow M, Kim HK, Taeok B, Dominique MM, Olaf S. Contribution of coagulases towards *Staphylococcus aureus* disease and protective immunity. *PLOS Pathogens* 2010, 6, e1001036.

Chesneau O, Morvan A, Aubert S, El Solh N. The value of rRNA gene restriction site polymorphism analysis for delineating taxa in the genus *Staphylococcus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2000, 50, 689–697.

Clark NC, Cooksey RC, Hill BC, Swenson JM, Tenover FC. “Characterization Of Glycopeptide-Resistant Enterococci From U.S. Hospitals”, *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 1993, 2311-2317.

CLSI (National Committee for Clinical Laboratory Standards M31-A2). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 2012. Vol. 22, No. 6, Pennsylvania Wayne.

Cong Y, Yang S, Rao X. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of case updating and clinical features *Journal of Advanced Research* 2020, 21, 169–176.

Contreras A, Luengo C, Sánchez A, Corrales JC. The role of intramammary pathogens in dairy goats. *Livestock Production Science* 2003, 79(2-3), 273–283.

Contreras A, Sierra D, Sánchez A, Corrales JC, Marco JC, Paape MJ, Gonzalo C. Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Research* 2007, 68, 145–153.

Cooney J, Kienle Z, Foster TJ, O'Toole PW. The gamma-hemolysin locus of *Staphylococcus aureus* comprises three linked genes, two of which are identical to the genes for the F and S components of leukocidin. *Infection and Immunity* 1993, 61, 768–771.

Courvalin P. Vancomycin resistance in Gram-positive cocci. *Clinical Infectious Diseases* 2006, 42(Suppl 1), 25–34.

Couto I, Pereira S, Miragaia M, Sanches IS, de Lencastre H. Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by internal transcribed spacer PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2001, 39, 3099–103.

Crass B, Bergdoll MS. Involvement of coagulase-negative staphylococci in toxic shock syndrome. *Journal of Clinical Microbiology* 1986, 23, 43–45.

Cunha MLRS, Peresi E, Calsolari RAO, Junior JPA. Detection of enterotoxins genes on coagulase-negative staphylococci isolated from foods. *Brazilian Journal of Microbiology* 2006, 37, 70–74.

Cuny C, Layer F, Strommenger B, Witte W. Rare occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC130 with a novel mecA homologue in humans in Germany. *PloS One* 2011, 6, 24360.

Çiftci MK, Berkin Ş, Erer H, Erganiş O, Kıran MM, Hatipoğlu F, Sağlam YS. Keçi mastitisleri üzerinde patolojik ve bakteriyolojik çalışmalar. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi* 1996, 12(2), 105–114.

Da Cunha M, Rugolo LM, Lopes CA. Study of virulence factors in coagulase-negative staphylococci isolated from newborns. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2006, 101, 661–668.

De Buyser ML, Dufour B, Maire M, Lafarge V. Implication of milk and milk products in foodborne diseases in France and in different industrialised countries. *International Journal of Food Microbiology* 2001, 67, 1–17.

De Buyser ML, Morvan A, Aubert S, Dilasser F, El Solh N. Evaluation of ribosomal RNA gene probe for the identification of species and sub-species within the genus *Staphylococcus*. *Journal of General Microbiology* 1992, 138, 889–899.

de Lencastre H, Oliveira D, Tomasz A. Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power. *Current Opinion in Microbiology* 2007, 10(5), 428–435.

De Vlieghe S, Fox LK, Piepers S, McDougall S, Barkema HW. Invited review: mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *Journal of Dairy Science* 2012, 95, 1025-40.

DeLeo FR, Otto M, Kreiswirth BN, Chambers HF. Community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 2010, 375, 1557–1568.

Devriese LA, Vancanneyt M, Baele M, Vanechoutte M, De Graef E, Snauwaert C, Cleenwerck I, Dawyndt P, Swings J, Decostere A, Haesebrouck F. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2005, 55, 1569–1573.

Devriese LA, Vandamme LR, Fameree L. Methicillin (cloxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases *Zentralblatt* 1972, 19, 598–605.

Devriese LA. A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from animal species. *Journal of Applied Microbiology* 1984, 56, 215–220.

Devriese LA, van de Kerckhove A. A comparison of methods and the validity of deoxyribonuclease tests for the characterization of staphylococci isolated from animals. *Journal of Applied Microbiology* 1979, 46, 385–393.

Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews* 2000, 13, 16–34.

Doery HM, Magnuson BJ, Galasekharam J, Pearson JE. The properties of phospholipase enzymes in staphylococcal toxins. *Journal of General Microbiology* 1965, 40, 283–96.

Doğruer G, Saribay MK, Aslantas O, Ergun Y, Aslantas O, Demir C, Ates CT. Treatment of subclinical mastitis in Damascus goats during lactation. *Small Ruminant Research* 2013, 90,153-155.

Domingo MC, Huletsky A, Giroux R, Picard FJ, Bergeron MG. *vanD* and *vanG*- like gene clusters in a Ruminococcus species isolated from human bowel flora. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2007, 51(11), 4111–7.

Drancourt M, Raoult D. *rpoB* gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. *Journal of Clinical Microbiology* 2002, 40, 1333–1338.

Droke EA, Paape MJ, Di Carlo AL. “Prevalence of high somatic cell counts in bulk tank goat milk ” *Journal of Dairy Science*, 1993, 76, 1035–1039.

Duboeuf JP, Mohrand-Fehr P, Rubino R. “Situation, changes and future of goat industry around the world” *Small Ruminant Research*, 2004, 51, 165–173.

East NE, Bimie EF, Farver TB. Risk factors associated with mastitis in dairy goats. *American Journal of Veterinary Research* 1978, 48(5), 776–779.

Ekstedt RD, Yotis WW. Studies on staphylococci. II. Effect of coagulase on the virulence of coagulase negative strains. *Journal of Bacteriology* 1960, 80, 496–500.

El Haddad L, Moineau S. Characterization of a novel Panton-Valentine leukocidin-encoding staphylococcal phage and its natural PVL-lacking variant. *Applied and Environmental Microbiology* 2013, 7, 2828–2832.

Elsayed MS, El-Bagoury AEM, Dawoud MA. Phenotypic and genotypic detection of virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical mastitis in cattle and water buffaloes from different farms of Sadat City in Egypt. *Veterinary World* 2015, 8, 1051-58.

Ena J, Dick RW, Jones RN, Wenzel RP. The epidemiology of intravenous vancomycin usage in a university hospital. A 10-year study. *JAMA* 1993, 269, 598–602.

Eski A, Demir I, Zihni D. Integrated management of beet armyworm. *Journal of Agriculture and Environmental Sciences* 2015, 4.

European Medicines Agency (EMA) and European Centre For Disease Prevention and Control (ECDC). The Bacterial Challenge: Time to React a Call to Narrow the Gap between Multidrug-Resistant Bacteria in the EU and Development of New Antibacterial Agents, Stockholm, 2009.

Euzéby JP. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the internet. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 1997, 47, 590–592.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations statistical Databases. 2013. Available from: [http:// www.faostat.fao.org](http://www.faostat.fao.org). Retrieved on: 15-09-2018.

Fitzgerald, JR, Penades, JR. Staphylococci of Animals. In: Lindsay, JA, editor. *Staphylococcus*. Molecular Genetics. *Caister Academic Press*; Norfolk, 2008, 255–269.

Forsman P, Tilsala-Timisjarvi A, Alatossava T. Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S–23S rRNA spacer regions. *Microbiology* 1997, 143, 3491–3500.

Francis JS, Doherty MC, Lopatin U, Johnston CP, Sinha G, Ross T, Cai M, Hansel NN, Perl T, Ticehurs JR, Carroll K, Thomas DL, Nuermberge E, Bartlett JG. “Severe community-onset pneumonia in healthy adults caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the Panton-Valentine leucocidin genes”, *Clinical Infectious Disease* 2005, 1, 100-107.

Fraser JD, Proft T. The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. *Immunological Reviews* 2008, 225, 226–243.

Freer JH, Arbuthnott JP, Bernheimer AW. Interaction of staphylococcal alpha-toxin with artificial and natural membranes. *Journal of Bacteriology* 1968, 95, 1153–1168.

Freer JH, Arbuthnott JP. Toxins of *Staphylococcus aureus*. *Pharmacol Ther* 1983, 19, 55–106.

Friedrich R1, Panizzi P, Fuentes-Prior P, Richter K, Verhamme I, Anderson PJ, Kawabata S, Huber R, Bode W, Bock PE. Staphylocoagulase is a prototype for the mechanism of cofactor-induced zymogen activation. *Nature* 2003, 425, 535–539.

Fujita S, Senda Y, Iwagami T, Hashimoto T. Rapid identification of staphylococcal strains from positive-testing blood culture bottles by internal transcribed spacer PCR followed by microchip gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology* 2005, 43, 1149–1157.

Gao J, Ferreri M, Yu F, Liu X, Chen L, Su J, Han B. “Molecular types and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in a single herd in China”, *Veterinary Journal* 2012, 192, 550-52.

Garrity GM, Johnson KL, Bell J, Searles DB. Taxonomic outline of the procaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. New York, NY: Springer-Verlag, 2004.

Gelasakis AI, Angelidis AS, Giannakou R, Filioussis G, Kalamaki MS, Arsenos G. Bacterial subclinical mastitis and its effect on milk yield in low-input dairy goat herds. *Journal of Dairy Science* 2016, 99, 3698-3708.

Gharsa H, Ben Slama K, Lozano C, Gomez-Sanz G, Klibi N, Ben Sallem R, Gomez P, Zarazaga M, Boudabous A, Torres C. "Prevalence, antibiotic resistance, virulence traits and genetic lineage of *Staphylococcus aureus* in healthy sheep in Tunisia", *Veterinary Microbiology* 2012, 156, 367-73.

Ghebremedhin B, Layer F, König W, König B. Genetic Classification and Distinguishing of *Staphylococcus* Species Based on Different Partial *gap*, 16S rRNA, *hsp60*, *rpoB*, *sodA*, and *tuf* Gene Sequences. *Journal Of Clinical Microbiology* 2008, 46 (3), 1019-25.

Ghebremedhin B, Layer F, König W, König B. Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus* species based on different partial *gap*, 16S rRNA, *hsp60*, *rpoB*, *sodA*, and *tuf* gene sequences. *Journal of Clinical Microbiology* 2008, 46, 1019–1025.

Gherardi G, Di Bonaventura G, Savini V. Staphylococcal Taxonomy. Pet-To-Man Travelling Staphylococci, *Academic Press* 2018, 1-10.

Glenny AT, Stevens NF. Staphylococcal toxins and antitoxins. *The Journal of Pathology and Bacteriology* 1935, 40, 201–210.

Goh SH, Santucci Z, Kloos WE, Faltyn M, George CG, Driedger D, Hemmingsen SM. Identification of *Staphylococcus* species and subspecies by the chaperonin 60 gene identification method and reverse checkerboard hybridization. *Journal of Clinical Microbiology* 1997, 35, 3116–3121.

Goh SH, Potter S, Wood JO, Hemmingsen SM, Reynolds RP, Chow AW. HSP60 gene sequences as universal targets for microbial species identification: studies with coagulase-negative staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology* 1996, 34, 818–823.

Goja A, Ahmed T, Saeed S, Dirar H. Isolation and identification of *Staphylococcus* sp. in fresh beef. *Pakistan Journal of Nutrition* 2013, 12, 114–120.

Gouaux E. α -Hemolysin from *Staphylococcus aureus*: an archetype of β -barrel, Channel-Forming Toxins. *Journal of Structural Biology* 1998, 121, 110–122.

Gouaux JE, Braha O, Hobaugh MR, Song L, Cheley S, Shustak C, Bayley H. Subunit stoichiometry of staphylococcal alpha- hemolysin in crystals and on membranes: a heptameric transmembrane pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1994, 91,12828–12831.

Graves SF, Kobayashi SD, DeLeo FR. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* immune evasion and virulence. *Journal of Molecular Medicine* 2010, 88, 109–114.

Gravet A, Colin DA, Keller D, Gigardot R, Monteil H, Prevost G. Characterization of a novel structural member, LukE- LukD, of the bi-component staphylococcal leucotoxins family. *FEBS Letter* 1998, 436, 202–208.

Gray GS, Kehoe M. Primary sequence of the a-toxin gene from *Staphylococcus aureus* Wood 46. *Infection and Immunity* 1984, 46, 615–618.

Gribaldo S, Cookson B, Saunders N, Marples R, Stanley J. Rapid identification by specific PCR of coagulase-negative staphylococcal species important in hospital infection. *Journal of Medical Microbiology* 1997, 46, 45–53.

Guimarães FF,Nóbrega DB, Richini-Pereira VB, Marson PM, Pantoja JCF, Langoni H. Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *Journal of Dairy Science* 2013, 96, 2866-72.

Gupta AK, Patole MS, Shouche YS. Phylogenetic profiling of gut-associated bacteria in larvae and adults of the flesh fly, *Sarcophaga* sp. (Diptera: Sarcophagidae). *Medical and Veterinary Entomology* 2014, 28, 4, 345-354.

Gülcü HB, Öngör H. Elazığ İlinde Mezbahada Kesilen Koyun ve Keçilerde Meme Loblarının Mastitis Yönünden Bakteriyolojik İncelenmesi. *Veteriner Bilimleri Dergisi* 2002, 18, 3-4.

Günther J, Esch K, Poschadel N, Petzl W, Zerbe H, Mitterhuemer S, Blum H, Seyfert HM. “Comparative kinetics of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*-specific activation of key immune pathways in mammary epithelial cells demonstrates that *S. aureus* elicits a delayed response dominated by interleukin-6 (IL-6) but not by IL-1A or tumor necrosis factor alpha” *Infection Immunity* 2011, 79(2), 695-707.

Hadimli HH, Sayın Z, Ergani O, Kav K, Sakmanoğlu A. Subklinik mastitisli süt ineklerinden izole edilen koagulaz negatif stafilokokların identifikasyonu ve antibiyotiklere duyarlılıkları. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences* 2014, 30 (1), 14-19.

Haenlein GFW. “Relationship of somatic cell counts in goat milk to mastitis and productivity”. *Small Ruminant Research*, 2002, 45(2), 163-178.

Hajek V. *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 1976, 26, 401–408.

Halasa T, Huijps K, Osteras O, Hogeveen H. “Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review”, *Veterinary Quarterly* 2007, 29, 18-31.

Hall SM, Rycroft AN. Causative organisms and somatic cell counts in subclinical intramammary infections in milking goats in the UK. *Veterinary Record* 2007, 160, 19–22.

Harraghy N, Homerova D, Herrmann M, Kormanec J. Mapping the transcription start points of the *Staphylococcus aureus* eap, emp, and vwb promoters reveals a KNServed octanucleotide sequence that is essential for expression of these genes. *Journal of Bacteriology* 2008, 190, 447–451.

Hartman BJ, Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 1984, 158 (2), 513–6.

Hauschild T, Stepanovic S. Identification of *Staphylococcus spp.* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of *dnaJ* gene. *Journal Clinical Microbiology* 2008, 46, 3875–3879.

Haveri M, Roslof A, Rantala L, Pyörala S. “Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics”, *Journal of Applied Microbiology* 2008, 103, 993-1000.

Hébert GA, Hancock GA. Synergistic hemolysis exhibited by species of staphylococci. *Journal Clinical Microbiology* 1985, 22, 409–415.

Heikens E, Fleer A, Paauw A, Florijn A, Fluit AC. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology* 2005, 43, 2286-2290.

Helbin WM, Polakowska K, Międzobrodzki J. Phage-related virulence factors of *Staphylococcus aureus*. *Post Mikrobiology* 2012, 51, 291–298.

Hendrix H, Lindhout T, Mertens K, Engels W, Hemker H. Activation of human prothrombin by stoichiometric levels of staphylocoagulase. *Journal of Biological Chemistry* 1983, 258, 3637–3644.

Hennekinne JA, De Buyser ML, Dragacci S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews* 2012, 36, 815–836.

Heringstad B, Klemetsdal G, Ruane J. “Selection for mas-titis resistance in dairy cattle: A review with focus on the situation in the Nordic countries. ” *Livestock Science*, 2000, 64,95-106.

Hermans K, Devriese LA, Haesebrouck F. *Staphylococcus*. In: Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO, editors. Pathogenesis of bacterial infections in animals. Ames, IA: Wiley-Blackwell; 2010, 75–89.

Hernández L. Enfermedades de las cabras. SAGARPA-INIFAP: México; 2015, 33–242

Hildebrand A, Pohl M, Bhakdi S. *Staphylococcus aureus* alpha-toxin: dual mechanisms of binding to target cells. *Journal of Biological Chemistry* 1991, 266, 17195–17200.

Hirota S, Sasaki T, Kuwahara-Arai K, Hiramatsu K. Rapid and accurate identification of human-associated staphylococci by use of multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2011, 49, 3627–31.

Hollenbeck BL, Rice LB. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence* 2012, 3(5), 421–33.

Holt JG, Krieg NR, Sneathm PHA, Staley JT, Williams ST. “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology”. MD: Williams and Williams, Baltimore, 1994, 9.

Hong HJ, Hutchings MI, Buttner MJ. Biotechnology, and U.K. biological sciences research council, vancomycin resistance *VanS/VanR* two-component systems. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2008, 631, 200–13.

Hu Q, Peng H, Rao X. Molecular events for promotion of vancomycin resistance in vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology* 2016, 7, 1601.

Hugas M, Monfort JM. Bacterial starter cultures for meat fermentation. *Food Chemistry* 1997, 59, 547–554.

Hunter AC. Microflora and somatic cell content of goat milk. *Veterinary Record* 1984, 114, 318–320.

Hwang SM, Kim MS, Park KU, Song J, Kim EC. Tuf gene sequence analysis has greater discriminatory power than 16S rRNA sequence analysis in identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci”, *Journal of Clinical Microbiology* 2011, 49, 4142-49.

Ilhan Z, Taşal I, Sagcan S, Solmaz H. Subklinik Mastitisli Keçi Sütlerinden Aerobik Bakterilerin İzolasyonu. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2011, 22(2), 89–91.

Irlinger F. Safety assessment of dairy microorganisms: coagulase-negative staphylococci. *International Journal of Food Microbiology* 2008. 126, 302–310.

Islam MA, Samad MA, Anisur Rahman AKM. Bacterial Pathogens and Risk Factors Associated With Mastitis in Black Bengal Goats in Bangladesh. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine* 2011, 9(2), 155–159.

Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H, Hiramatsu K. Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase, ccrC. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 2004, 48(7), 2637–2651.

İşnel NB, Kırcan Ş. Subklinik Mastitisli Keçilerden Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Antibiyotiklere Duyarlılıklarının Araştırılması. *Animal Health, Production and Hygiene* 2012, 1(2), 106 – 112.

Jans C, Merz A, Johler S, Younan M, Tanner SA, Kaindi DWM, Wangoh J, Bonfoh B, Meile L, Tasara T. East and West African milk products are reservoirs for human and livestock-associated *Staphylococcus aureus*, *Food Microbiology* 2017, 65, 64–73.

Jensen AG, Wachmann CH, Espersen F, Scheibel J, Skinhoj P, Frimdt-Moller N. “Treatment and outcome of *Staphylococcus aureus* bacteremia: a prospective study of 278 cases”, *Archives of Internal Medicine* 2002, 162, 25–32.

Jensen MA, Webster JA, Straus N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Applied Environmental Microbiology* 1993, 59, 945–952.

Johnson HM, Russell JK, Pontzer CH. Staphylococcal enterotoxin microbial superantigens. *The FASEB Journal* 1991, 52, 2706–2712.

Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton FE, Pollard DR, Rozee KR. “Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction”, *Journal of Clinical Microbiology* 1991, 29, 426–30.

Jonas D, Walev I, Berger T, Liebetrau M, Palmer M, Bhakdi S. Novel path to apoptosis: small transmembrane pores created by staphylococcal alpha-toxin in nT lymphocytes evoke inter- nucleosomal DNA degradations. *Infection and Immunity* 1994, 62, 1304–1312.

Jones G, Bailey T, Roberson J. 1998. “*Staphylococcus aureus* mastitis: cause, detection, and control”. Virginia Cooperative Extension, Virginia State University. Accessed: 01 November 2016

Kadlec K, Schwarz S. “Identification of a plasmid-borne resistance gene cluster comprising the resistance genes *erm*(T), *dfrK*, and *tet*(L) in a porcine methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* ST398 strain”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010, 54, 915-18.

Kalorey DR, Shanmugam Y, Kurkure NV, Chousalkar KK, Barbuddhe SB. “PCR-based detection of genes encoding virulence determinants in *Staphylococcus aureus* from bovine subclinical mastitis cases”, *Journal of Veterinary Science* 2007, 8, 151-54.

Kanemitsu K, Yamamoto H, Takemura H, Kaku M, Shimada J. Relatedness between the coagulase gene 3end region and coagulase serotypes among *Staphylococcus aureus* strains. *Microbiology Immunology* 2001, 45, 23–27.

Kim C, Milheirico C, Gardete S, Holmes MA, Holden MT, de Lencastre H, Tomasz A. Properties of a novel PBP2A protein homolog from *Staphylococcus aureus* strain LGA251 and its contribution to the beta-lactam-resistant phenotype. *Journal of Biological Chemistry* 2012, 287(44), 36854–63.

Kleeman KT, Bannerman TL, Kloos WE. Species distribution of coagulase-negative staphylococcal isolates at a community hospital and implications for selection of staphylococcal identification procedures. *Journal of Clinical Microbiology* 1993, 31, 1318–1321.

Klibi A, Maaroufia A, Torres C, Jouini A. Detection and characterization of methicillin-resistant and susceptible coagulase-negative staphylococci in milk from cows with clinical mastitis in Tunisia. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2018, 52, 930-35.

Kloos WE. Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to humans. In: Crossley KB, Archer GL, editors. *The staphylococci in humans and disease*. New York, NY: Churchill Livingstone; 1997, 113–137.

Kloos WE, Bannerman TL. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews* 1994, 7, 117–140.

Kloos WE, George CG. Identification of *Staphylococcus* species and subspecies with the Microscan Pos ID and Rapid Pos ID panel systems. *Journal of Clinical Microbiology* 1991, 29, 738–744.

Kloos WE, Schleifer KH. Genus IV. *Staphylococcus*. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG, editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. vol. 2. Baltimore, MD: Williams & Wilkins; 1986, 1013–1035.

Koenig RL, Ray JL, Maleki SJ, Smeltzer MS, Hurlburt BK. *Staphylococcus aureus* agrA binding to the RNAPIII-agr regulatory region. *Journal of Bacteriology* 2004;186:7549–55.

Kontos F, Petinakia E, Spiliopouloub I, Maniatia M, Maniatisa AN. Evaluation of a novel method based on PCR restriction fragment length polymorphism analysis of the *tuf* gene for the identification of *Staphylococcus* species. *J Microbiol Methods* 2003, 55, 465–469.

Koop G, Nielen M, Werven T. “Bulk milk somatic cell counts in dairy goats ” *Journal of Dairy Science* 2009, 92, 4355-4364.

Koop G, Nielen M, Werven T. “Diagnostic tools to monitor udder health in dairy goats” *Veterinary Quarterly* 2012, 32, 37–44.

Krawczyk B, Kur J. Molecular Identification and Genotyping of *Staphylococci*: Genus, Species, Strains, Clones, Lineages, and Interspecies Exchanges. 2018, 199-200.

Krishnamoorthy P, Satyanarayana ML, Shome BR. Coagulase Negative *Staphylococcal* species Mastitis: An Overview. *Research Journal of Veterinary Sciences* 2016, 9(1), 1-10.

Krohn A, Stevens B, Robbins-Pianka A, Belus M, Allan GJ, Gehring C. Optimization of 16S amplicon analysis using mock communities: implications for estimating community diversity. *PeerJ Preprints* 2016,1-24.

Kruse T, Levisson M, de Vos WM, Smidt H. *vanI*: a novel D-Ala- D-Lac vancomycin resistance gene cluster found in *Desulfatobacterium hafniense*. *Microbial Biotechnology* 2014, 7(5), 456–66.

Kurt S, Çolakoğlu EH, Yazlık OM, Vural RM, Küplülü Ş. Sütçü İneklerde Mastitis Yönünden Kuru ve Geçiş Dönemlerinin Önemi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi* 2019, 14(1), 107-13.

Kwok AY, Chow AW. Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species based on partial *hsp60* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2003, 53, 87–92.

Kwok AY, Su SC, Reynolds RP, Bay SJ, Av-Gay Y, Dovichi NJ, Chow AW. Species identification and phylogenetic relationships based on partial HSP60 gene sequences within the genus *Staphylococcus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 1999, 49, 1181–1192.

Lan R, Reeves PR. When does a clone deserve a name? A perspective on bacterial species based on population genetics. *Trends in Microbiology* 2001, 9, 419-24.

Lawryniewicz-Paciorek M, Kochman M, Piekarska K, Grochowska A, Windyga B. “The distribution of enterotoxin and enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from nasal carriers and food samples”, *International Journal of Food Microbiology* 2007, 117, 319-23.

Layer F, Ghebremedhin B, König W, König B. Differentiation of *Staphylococcus* spp. by terminal-restriction fragment length polymorphism analysis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene. *J Microbiol Methods* 2007, 70, 542–549.

Lebreton F, Depardieu F, Bourdon N, Fines-Guyon M, Berger P, Camiade S, Leclercq R, Courvalin P, Cattoir V. D-Ala- D-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011, 55(10), 4606–12.

Lee JH. Methicillin (Oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Applied and Environmental Microbiology* 2003, 69, 6489–6494.

Leitner G, Merin U, Lavi Y, Egber A, Silanikove N. Aetiology of intra-mammary infection and its effect on milk composition in goat flocks. *Journal Of Dairy Research* 2007, 74, 186–193.

Lewter MM, Walker RD. “Mastitis in goats” *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian* 1984, 6(7), 417–25.

Lina G, Jarraud S, Ji G, Greenland T, Pedraza A, Etienne J, Novick RP, Vandenesch F. Transmembrane topology and histidine protein kinase activity of *agrC*, the *agr* signal receptor in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology* 1998, 2, 655–662.

Little CL, Rhoades JR, Sagoo SK, Harris J, Greenwood M, Mithani V, Grant K, McLauchlin J. “Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK” *Food Microbiology* 2008, 25(2), 304-312.

Llarrull LI, Fisher JF, Mobashery S. Molecular basis and phenotype of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and insights into new beta-lactams that meet the challenge. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009, 53(10), 4051–63.

Lo WT, Wang CC. Panton-Valentine leukocidin in the pathogenesis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Pediatrics and Neonatology* 2011, 52, 59–65.

Loeb L. The influence of certain bacteria on the coagulation of the blood. *The Journal of Medical Research* 1903, 10, 407–419.

Loof TG, Morgelin M, Johansson L, Oehmcke S, Olin AI, Dickneite G, Norrby-Teglund A, Theopold U, Herwald H. Coagulation, an ancestral serine protease cascade, exerts a novel function in early immune defense. *Blood* 2011, 118, 2589–2598.

Low DKR, Freer JH. The purification of β -lysin (sphingomyelinase C) from *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters* 1977;2:139–43.

Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *The New England Journal of Medicine* 1998, 339, 520–532.

Löffler B, Hussain M, Grundmeier M. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. *PLoS Pathogens* 2010, 6, 1000715.

Ludwig W, Schleifer KH, Whitman WB. Class I. Bacilli class nov. In: De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, et al., editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology: vol. 3: the firmicutes*. 2nd ed. New York, NY: Springer; 2009, 19–20.

Lyon GJ, Wright JS, Muir TW, Novick RP. Key determinants of receptor activation in the agr autoinducing peptides of *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry* 2002, 41, 10095–10104.

Maes N, De Gheldre Y, DeRyck R, Vaneechoutte M, Meugnier H, Etienne J, Struelens MJ. Rapid and accurate identification of *Staphylococcus* species by tRNA intergenic spacer length polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 1997, 35, 2477–2481.

Manser DA. Prevalence, causes and laboratory diagnosis of subclinical mastitis in the goat. *Veterinary Record* 1986, 118 (20), 552–554, 17.

Martineau F, Picard FJ, Ke D, aradis S, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Development of a PCR assay for identification of staphylococci at genus and species level. *Journal of Clinical Microbiology* 2001, 39, 2541–2547.

Mazzariol A, Lo Cascio G, Kocsis E, Maccacaro L, Fontana R, Cornaglia G. Outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus haemolyticus* in an Italian intensive care unit. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2012, 31, 523–527.

McAdow M, Missiakas DM, Schneewind O. *Staphylococcus aureus* secretes coagulase and von Willebrand factor binding protein to modify the coagulation cascade and establish host infections. *Journal of Innate Immunity* 2012, 4, 141–148.

McCormick JK, Yarwood JM, Schlievert PM. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annual Review of Microbiology* 2001, 55, 77–104.

McDougall LK, Thornsberry C. The role of beta-lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. *J Clin Microbiol* 1986;23(5):832–9.

McDougall S, Murdough P, Pankey W, Delaney C, Barlow J, Scruton D. Relationships among somatic cell count, California mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. *Small Ruminant Research* 2001, 40, 245–254.

McNiven AC, Arbhunott JP. Cell-associated alpha-toxin from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology* 1972, 5, 123–127.

Meervenne EV, Coillie EV, Kerckhof FM, Devlieghere F, Herman L, De Gelder LSP, Top EM, Boon N. Strain specific transfer of antibiotic resistance from an environmental planning to food-borne pathogens. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012, 101, 83–98.

Megersa B, Tadesse C, Abunna F, Regassa A, Mekibib B, Debela E. “Occurrence of mastitis and associated risk factors in lactating goats underpastoral management in Borana Southern Ethiopia” *Tropical Animal Health and Production* 2010, 42,1249-1255.

Mellmann A, Becker K, von Eiff C, Keckevoet U, Schumann P, Harmsen D. Sequencing and staphylococci identification. *Emerg Infect Dis* 2006;12:333–6.

- Mendoza M, Meugnier H, Bes M, Etienne J, Freney J.** Identification of *Staphylococcus* species by 16S–23S rDNA intergenic spacer PCR analysis. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48:1049–55.
- Mermel LA, Allon M, Bouza E, Craven DE, Flynn P, O’Grady NP, Raad II, Rijnders BJ, Sherertz RJ, Warren DK.** Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* 2009, 49(1), 1–45.
- Meyer SA, Schleifer KH.** Deoxyribonucleic acid reassociation in the classification of coagulase-positive staphylococci. *Arch Microbiol* 1978, 117, 183–188.
- Miglior F, Muir BL, Van Doormaal BJ.** “Selection in-dices in Holstein cattle of various countries” *Journal of Dairy Science*, 2005, 88, 1255–1263.
- Mitchell RG, Baird-Parker AC.** Novobiocin resistance and the classification of staphylococci and micrococci. *Journal of Applied Microbiology* 1967, 30, 251–254.
- Mollet C, Drancourt M, Raoult D.** *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Molecular Microbiology* 1997, 26, 1005–1011.
- Montoya M, Gouaux E.** β -Barrel membrane protein folding and structure viewed through the lens of α -hemolysin. *Biochimica et Biophysica Acta* 2003, 1609, 19–27.
- Moore PCL, Lindsay JA.** “Genetic Variation among Hospital Isolates of Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus*: Evidence for Horizontal Transfer of Virulence Genes ”, *Journal Of Clinical Microbiology* 2001, 2760–2767.
- Moreillon P, Entenza JM, Francioli P, McDevitt D, Foster TJ, François P, Vaudaux P.** Role of *Staphylococcus aureus* coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis. *Infect Immun* 1995, 63, 4738–4743.
- Morinaga N, Kaihou Y, Noda M.** Purification, cloning and characterization of variant LukE-LukD with strong leukocidal activity of staphylococcal bi-component leukotoxin family. *Microbiology Immunology* 2003, 47, 81–90.
- Morita T, Igarashi H, Iwanaga S.** Staphylocoagulase. *Methods in Enzymology* 1981, 80, 311–319.

Moroni P, Pisoni G, Antonini M, Ruffo G, Carli S, Varisco G, Boettcher P. Subclinical Mastitis and Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus caprae* and *Staphylococcus epidermidis* Isolated from Two Italian Goat Herds. *Journal of Dairy Science*, 2005, 88, 1694–1704.

Murru N, Kodjo A, Villard L, Fratino L, Perrelli G, Tozzi M, Cortesi ML. Identification of coagulase negative *Staphylococci* isolated from dairy products using molecular methods. *Revue de Médecine Vétérinaire* 2005, 156, 8-9, 455-59.

Najeeb MF, Anjum AA, Ahmad MUD, Khan HM, Ali MA, Sattar MMK. Bacterial etiology of subclinical mastitis in dairy goats and multiple drug resistance of the isolates. *The Journal of Animal and Plant Sciences* 2013, 23(6), 1541– 1544.

Nazifi S, Haghighi M, Asadi Z, Ansari-Lari M, Tabandeh MR, Esmailnezhad Z, Aghamiri M. “Evaluation of sialic acid and acute phase proteins (haptoglobin and serum amyloid A) in clinical and subclinical bovine mastitis” *Pakistan Veterinary Journal*, 2011, 31, 55-59.

Neely AN, Maley MP. Survival of *Enterococci* and *Staphylococci* on hospital fabrics and plastic. *Journal of Clinical Microbiology* 2000, 38, 724–726.

Nemati M, Hermans K, Vancraeynest D, De Vliegher S, Sampimon OC, Baele M, De Graef EM, Pasmans F, Haesebrouck F. Screening of bovine coagulase-negative *staphylococci* from milk for superantigen-encoding genes. *Veterinary Record* 2008, 163, 740–743.

Noble WC. *Staphylococci on the skin.* In: Noble WC, editor. *The skin microflora and microbial skin disease.* Cambridge: Cambridge University Press; 1992, 135–52.

Novick RP, Ross HF, Projan SJ, Kornblum J, Kreiswirth B, Moghazeh S. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO Journal* 1993, 12, 3967–3975.

Onni T, Sanna G, Cubeddu GP, Marogna G, Lollai S, Leori G, Tola S. Identification of coagulase- negative *staphylococci* isolated from ovine milk samples by PCR-RFLP of 16S rRNA and gap genes. *Veterinary Microbiology* 2011, 144, 347–352.

Onni T, Vidili A, Bandino E, Marogna G, Schianchi S, Tola S. Identification of coagulase-negative staphylococci isolated from caprine milk samples by PCR-RFLP of groEL gene. *Small Ruminant Research* 2012, 104, 185–190.

Orden JA, Goyache J, Hernández J, Doménech A, Suárez G, Gómez-Lucía E. Applicability of an immunoblot technique combined with a semiautomated electrophoresis system for detection of staphylococcal enterotoxins in food extracts. *Applied and Environmental Microbiology* 1992, 58, 4083–4085.

Ortega E, Abriouel H, Lucas R, Gálvez A. Multiple roles of *Staphylococcus aureus* enterotoxins: pathogenicity, superantigenic activity, and correlation to antibiotic resistance. *Toxins* 2010, 2, 2117–2131.

Otto M. *Staphylococcus* colonization of the skin and antimicrobial peptides. *Expert Review of Dermatology* 2010, 5, 183–195.

Otto M. *Staphylococcus epidermidis* the ‘accidental’ pathogen. *Nature Reviews Microbiology* 2009, 7, 555–567.

Över U, Tüç Y, Söyletir G. Catalase-negative *Staphylococcus aureus*: a rare isolate of human infection. *Clinical Microbiology and Infection* 2000, 6, 681–682.

Paape MJ, Capuco AV. “Cellular defense mechanisms in the udder and lactation of goats” *Journal of Animal Science*, 1997, 75, 556–565.

Pakyz AL, MacDougall C, Oinonen M, Polk RE. Trends in antibacterial use in US academic health centers: 2002 to 2006. *Annals of Internal Medicine* 2008, 168 (20), 2254–60.

Pandey PK, Salunkhe RC, Salunke BK, Sawant S, Shouche YS. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/JX966457.1?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=1&RID=KWTYXR2B016](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/JX966457.1?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=1&RID=KWTYXR2B016).

Panizzi P, Friedrich R, Fuentes-Prior P, Richter K, Bock PE, Bode W. Fibrinogen substrate recognition by staphylocoagulase.(pro)thrombin complexes. *Journal of Biological Chemistry* 2006, 281, 1179–1187.

Pantoja JCF, Hulland C, Ruegg PL. “Dynamics of somatic cell counts and intramammary infections across the dry period” *Preventive Veterinary Medicine*, 2009, 90, 43–54.

- Panton PN, Valentine FCO.** Staphylococcal toxin. *Lancet* 1932, 219, 506–508.
- Park JY, Fox LK, Seo KS, McGuire MA, Park YH, Rurangirwa FR, Sicho WM, Bohach GA.** Detection of classical and newly described staphylococcal superantigen genes in coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections. *Veterinary Microbiology* 2011, 147, 149–154.
- Parker MW, Feil SC.** Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 2005, 88, 91–142.
- Patel R, Piper K, Cockerill 3rd FR, Steckelberg JM, Yousten AA.** The biopesticide *Paenibacillus popilliae* has a vancomycin resistance gene cluster homologous to the enterococcal *vanA* vancomycin resistance gene cluster. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000, 44(3), 705–9.
- Peng HL, Novik RP, Kreiswirth B, Kornblum J, Schlievert P.** Cloning, characterization and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 1988, 170, 98–103.
- Perreten V, Vorlet-Fawer L, Slickers P, Ehricht R, Kuhnert P, Frey J.** “Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of gram-positive bacteria”, *Journal Of Clinical Microbiology* 2005, 43, 2291-2302.
- Persoons D, van Hoorebeke S, Hermans K, Butaye P, de Kruif A, Haesebrouck F, Dewulf J.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in poultry. *Emerging Infectious Diseases* 2009, 15, 452–453.
- Phonimdaeng P1, O'Reilly M, Nowlan P, Bramley AJ, Foster TJ.** The coagulase of *Staphylococcus aureus* 8325-4. Sequence analysis and virulence of site-specific coagulase-deficient mutants. *Molecular Microbiology* 1990, 4, 393–404.
- Piechota M, Kot B, Zdunek ., Mitrus J, Wicha J, Wolska MK, Sachanowicz K.** Distribution of classical enterotoxin genes in staphylococci from milk of cows with and without mastitis and the cowshed environment. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 2014, 17(3), 407-11.

Piessens V, Vlieghe SD, Verbist B, Braem G, Nuffel AV, Vuyst DL, Heyndrickx DL, Coillie EV. Characterization of coagulase-negative staphylococcus species from cows' milk and environment based on *bap*, *icaA*, and *mecA* genes and phenotypic susceptibility to antimicrobials and teat dips. *Journal of Dairy Science* 2012, 95, 7027-38.

Place RB, Hiestand D, Gallmann HR, Teuber M. *Staphylococcus equorum* subsp. *linens*, subsp. nov., a starter culture component for surface ripened semi-hard cheeses. *Systematic and Applied Microbiology* 2003, 26, 30–37.

Podkowik M, Bystron J, Bania J. Genotypes, antibiotic resistance, and virulence factors of staphylococci from ready-to-eat food. *Foodborne Pathogens and Disease* 2012, 9, 91–93.

Pol M, Ruegg PL. “Relationship between antimicrobial drug usage and antimicrobial susceptibility of gram-positive mastitis pathogens” *Journal of Dairy Science*, 2007, 90, 262–273.

Pontieri E. The Staphylococcal Hemolysins. Pet-To-Man Travelling Staphylococci, Academic Press 2018, 103-116.

Poulsen AB, Skov R, Pallesen LV. Detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci and in staphylococci directly from simulated blood cultures using the EVIGENE MRSA Detection Kit. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003, 51, 419–421.

Poutrel B, De Cremoux R, Ducelliez M, Verneau D. “Control of intra-mammary infections in goats: impact on somatic cell counts” *The Journal of Animal Science*, 1997, 75, 566-570.

Poyart C, Quesne G, Boumaila C, Trieu-Cuot P. Rapid and accurate species-level identification of coagulase-negative staphylococci by using the *sodA* gene as a target. *Journal of Clinical Microbiology* 2001, 39, 4296–4301.

Prevost G, Couppie P, Prevost P, Gayet S, Petiau P, Cribier B, Monteil H, Piemont Y. Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins. *Journal of Medical Microbiology* 1995, 42, 237–245.

Prévost G, Cribier B, Couppié P, Petiau P, Supersac G, Finck-Barbançon V, Monteil H, Piemont Y. Pantone-Valentine leukocidin and gamma hemolysin from *Staphylococcus aureus*

ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infection and Immunity* 1995, 63, 4121–4129.

Prevost G, Mourey L, Colin D, Monteil H, Serra MD, Menestrina G. Alpha-helix and beta-barrel pore forming toxins (Leu- coccidins, alpha-, gamma-, and delta-cytolins) of *Staphylococcus aureus*. (edt. Alouf JE, Freer JH) Comprehensive sourcebook of bacterial toxins. London: Academic Press 2005, 590–607.

Proft T, Fraser JD. Bacterial superantigens. *Clinical and Experimental Immunology* 2003, 133, 299– 306.

Projan SJ, Kornblum J, Kreiswirth B, Moghazeh SL, Eisner W, Novick RP. Nucleotide sequence: the β -hemolysin gene of *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Research* 1989, 17, 3305.

Pyorala S, Taponen S. Coagulase-negative staphylococci emerging mastitis pathogens, *Veterinary Microbiology* 2009, 134, 3-8.

Rankin S, Roberts S, O'Shea K, et al. Panton-Valentine leukocidin (PVL) toxin positive MRSA strains isolated from companion animals. *Veterinary Microbiology* 2005, 108, 145–8.

Recsei P, Kreiswirth B, O'Reilly M, Schlievert P, Gruss A, Novick RP. Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by agar. *Molecular Genetics and Genomics* 1986, 202, 58–61.

Resch M, Nagel V, Hertel C. Antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci associated with food and used in starter cultures. *International Journal of Food Microbiology* 2008, 127, 99-104.

Rola JG, Sosnowski M, Ostrowska M, Osek J. Prevalence and antimicrobial resistance of coagulase-positive staphylococci isolated from raw goat milk, *Small Ruminant Research* 2015, 123, 124–128.

Rubinstein E, Keynan Y. Vancomycin revisited - 60 years later. *Frontiers in Public Health* 2014, 2, 217.

Rudra PG, Dutta A. *E. coli* coliform mastitis in Doe and its antibiogram. *Journal of Bacteriology and Mycology* 2018, 5(1), 1059.

Ruegg PL. “A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. ” *Journal of Dairy Science*, 2017, 100, 10381–10397.

Ruiz P, Barragán I, Seseña S, Palop ML. Is staphylococci population from milk of healthy goats safe? *The International Journal of Food Microbiology* 2016, 238, 146–152.

Rupp R, Boichard D, Barbat A, Astruc JM, Lagriffoul G, Barillet F. Selection for mastitis resistance in French dairy sheep. In *Proceedings of the 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Montpellier, France. INRA, Castanet-Tolosan, France. 2002, 119–122

Rupp R, Foucras G. Genetics of mastitis in dairy ruminants. (edt. Bishop S, Axford FN, Owen J) *Breeding for Disease Resistance in Farm Animals*. CABI, Wallingford, United Kingdom 2010, 183–210.

Sakwinska O, Giddey M, Moreillon M, Morisset D, Waldvogel A, Moreillon P. *Staphylococcus aureus* host range and human-bovine host shift. *Applied and Environmental Microbiology* 2011, 77 (17), 5908–5915.

Sampimon OC, Lam TJGM, Mevius DJ, Schukken YH, Zadoks RN. Antimicrobial Susceptibility Of Coagulase-Negative Staphylococci Isolated From Bovine Milk Samples. *Veterinary Microbiology* 2011. 150, 173-79.

Sampimon OC, Zadoks RN, De Vliegher S, Supré K, Haesebrouck F, Barkema HW, Sol J, Lam TJ. Performance of API Staph ID 32 and Staph-Zym for identification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine milk samples. *Veterinary Microbiology* 2009, 136, 300–305.

Santos OCS, Barros EM, Brito MAVP, de Freire Bastos MC, dos Santos KN, GiambiagideMarval M. Identification of coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis using RFLP-PCR of the groEL gene. *Veterinary Microbiology* 2008, 130, 134–140.

Saruta K, Matsunaga T, Kono M, Hoshina S, Ikawa S, Sakai O, Machida K. Rapid identification and typing of *Staphylococcus aureus* by nested PCR amplified ribosomal DNA spacer. *FEMS Microbiol Letter* 1997, 146, 271–278.

Sasaki T, Tsubakishita S, Tanaka Y, Sakusabe A, Ohtsuka M, Hirotaki S, Kawakami T, Fukata T, Hiramatsu K. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology* 2010, 48, 765–769.

Sasaki T, Kikuchi K, Tanaka Y, Takahashi N, Kamata S, Hiramatsu K. Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *Journal of Clinical Microbiology* 2007, 45, 2770–2778.

Savaşan S, Kırkan Ş, Erbaş G, Parın U, Çiftçi A. Determination of Virulence Factors of Staphylococci Isolated from Bovine Mastitis. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2017, 23 (6), 947-52.

Savini V, Catavitello C, Masciarelli G, Astolfi D, Balbinot A, Bianco A, Febbo F, D'Amario C, D'Antonio D. Drug sensitivity and clinical impact of members of the genus *Kocuria*. *Journal of Medical Microbiology* 2010, 59, 1395–1402.

Savini V, Catavitello C, Bianco A, Balbinot A, D'Antonio D. Epidemiology, pathogenicity and emerging resistances in *Staphylococcus pasteurii*: from mammals and lampreys, to man. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery* 2009, 4, 123–129.

Savini V, Catavitello C, Masciarelli G, Astolfi D, Balbinot A, Bianco A, Febbo F, D'Amario C, D'Antonio D. Review of airway illnesses by *Kytococcus* and *Rothia* and a look at inhalatory vancomycin as a treatment support. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery* 2011, 6, 64–71.

Sawai T, Tomono K, Yanagihara K, Yamamoto Y, Kaku M, Hirakata Y, Koga H, Tashiro T, Kohno S. Role of coagulase in a murine model of hematogenous pulmonary infection induced by intravenous injection of *Staphylococcus aureus* enmeshed in agar beads. *Infect Immun* 1997, 65, 466–471.

Sawant AA, Sordillo LM, Jayarao BM. A survey on antibiotic usage in dairy herds in Pennsylvania. *Journal of Dairy Science* 2005, 88, 2991-99.

Saydan M. Malatya Arguvan Yöresinde Süt İneklerinde Subklinik Mastitis Prevalansı, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ, 2017.

Schnellmann C, Gerber V, Rossanno A, Jaquier V, Panchaud Y, Doherr M, Thomann A, Straub R, Perreten V. Presence of new *mecA* and *mph(c)* variants conferring antibiotic resistance in *Staphylococcus* spp. isolated from the skin of horses before and after clinic admission. *Journal Of Clinical Microbiology* 2006, 44, 4444-4454.

Schukken YH, Erb HN, Sears PM, Smith RD. Ecologic study of the risk factors for environmental mastitis in cows. *American Journal of Veterinary Research* 1988, 49, 766-69.

Schwalbe RS, Stapleton JT, Gilligan PH.. Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. *New England Journal of Medicine* 1987, 316, 927–931.

Seo KS, Lee SU, Park YH, Davis WC, Fox LK, Bohach GA. Long-term staphylococcal enterotoxin C1 exposure induces soluble factor-mediated immunosuppression by bovine CD4+ and CD8+ T cells. *Infection and Immunity* 2007, 75, 260–269.

Shah MM1, Iihara H, Noda M, Song SX, Nhung PH, Ohkusu K, Kawamura Y, Ezaki T. *dnaJ* gene sequence-based assay for species identification and phylogenetic grouping in the genus *Staphylococcus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2007, 57, 25–30.

Shallcross LJ, Fragaszy E, Johnson AM, Hayward AC. The role of the Panton-Valentine leu- coccidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases* 2013, 13, 43–54.

Shwani A, Adkins PRF, Ekesi NS, Alrubaye A, Calcutt MJ, Middleton JR, Rhoads DD. Whole genome comparisons of *Staphylococcus agnetis* isolates from cattle and chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, doi: 10.1128/AEM.00484-20.

Sivadon V1, Rottman M, Chaverot S, Quincampoix JC, Avettand V, de Mazancourt P, Bernard L, Trieu-Cuot P, Féron JM, Lortat-Jacob A, Piriou P, Judet T, Gaillard JL. Use of genotypic identification by *sodA* sequencing in a prospective study to examine the distribution of coagulase-negative *Staphylococcus* species among strains recovered during septic orthopedic surgery and evaluate their significance. *Journal of Clinical Microbiology* 2005, 43, 2952–2954.

Skapetas B, Bampidis V. Goat production in the world: Present situation and trends. *Livestock Research for Rural Development* 2016, 28,11.

Smith KL, Todhunter DA, Schoenberger PS. Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. *Journal of Dairy Science* 1985, 68, 1531-53.

Smith ML, Price SA. Staphylococcus γ -hemolysin. *The Journal of Pathology and Bacteriology* 1938, 47, 379–93.

Smith W, Hale JH, Smith MM. The role of coagulase in staphylococcal infections. *British journal of experimental pathology* 1947, 28, 57–67.

Song L, Hobaugh MR, Shustak C, Cheley S, Bayley H, Gouaux JE. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* 1996, 274, 1859–1866.

Sorrell TC, Packham DR, Shanker S, Foldes M, Munro R. Vancomycin therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Annals of Internal Medicine* 1982, 97 (3), 344–50.

Spanu V, Scarano C, Viridis S, Melito S, Spanu C, De Santis EPL. Population structure of *Staphylococcus aureus* isolated from bulk tank goat's milk. *Foodborne Pathogens and Disease* 2013, 10, 310–315.

Spergser J, Wieser M, Taubel M, Rossello-Mora RA, Rosengarten R, Busse HJ. *Staphylococcus nepalensis* sp. nov., isolated from goats of the Himalayan region. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2003, 53, 2007–11.

Stackebrandt E, Rainey FA, Ward-Rainey NL. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 1997, 47, 479–491.

Stevens M, Piepers S, Supre K, Dewulf J, De Vliegher S. Quantification of antimicrobial consumption in adult cattle on dairy herds in Flanders, Belgium, and associations with udder health, milk quality, and production performance. *Journal of Dairy Science* 2016, 99, 2118–2130.

Strommenger B, Kehrenberg C, Kettlitz C, Cuny C, Verspohl J, Witte W, Schwarz S. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from pet

animals and their relationship to human isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2006, 57, 461–465.

Sung JM, Lloyd DH, Lindsay JA. *Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray. *Microbiology* 2008, 154, 1949–1959.

Supre K, Haesebrouck F, Zadoks RN, Vanechoutte M, Piepers S, De Vliegher S. Some CNS species are affecting udder health more than others. *Journal of Dairy Science* 2011, 94, 2329-40.

Suttorp N, Seeger W, Dewein E, Bhakdi S, Roka L. Staphylococcal α -toxin induced PGI₂ in endothelial cells: role of calcium. *American Journal of Physiology* 1985, 248, 127–134.

Svec P, Vancanneyt M, Sedláček I, Engelbeen K, Stetina V, Swings J, Petrás P. Reclassification of *Staphylococcus pulvereri* Zakrzewska-Czerwinska et al. 1995 as a later synonym of *Staphylococcus vitulinus* Webster et al. 1994. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2004, 54, 2213–2215.

Takadama S, Nakaminami H, Kaneko H, Noguchi N. A novel community-acquired MRSA clone uniquely evolved in Japan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2020.

Takahashi T, Kaneto M, Mori Y, Tsuji M, Kikuchi N, Hiramune T. Phylogenetic analyses of *Staphylococcus* based on the 16S rRNA sequence and assignment of clinical isolates from animals. *Journal of Veterinary Medical Science* 1997, 59, 775–783.

Takahashi T, Satoh I, Kikuchi N. Phylogenetic relationships of 38 taxa of the genus *Staphylococcus* based on 16S rRNA gene sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 1999, 49, 725–728.

Taponen S, Bjorkroth J, Pyörala S. Coagulase-negative staphylococci isolated from bovine extramammary sites and intramammary infections in a single dairy herd. *Journal Of Dairy Research* 2008, 75, 422-29.

Taponen S, Pyörala S. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis—Not so different from *Staphylococcus aureus*? *Veterinary Microbiology* 2009, 134, 29-36.

Taponen S, Simojoki H, Haveri M, Larsen HD, Pyorala S. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. *Veterinary Microbiology* 2006, 115, 199–207.

Taylor AL, Llewelyn MJ. Superantigen-induced proliferation of human CD4+CD25– T cells is followed by a switch to a functional regulatory phenotype. *Journal of Immunology* 2010, 185, 6591– 6598.

Thomas DY, Chou S, Dauwalder O, Lina G. Diversity in *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Chemical Immunology and Allergy* 2007, 93, 24–41.

Thumu SC, Halami PM. “Presence of erythromycin and tetracycline resistance genes in lactic acid bacteria from fermented foods of Indian origin”, *Antonie Van Leeuwenhoek* 2012, 102, 541-551.

Tomasz A, Drugeon HB, de Lencastre HM, Jabes D, McDougall L, Bille J. New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1989, 33(11), 1869–1874.

Tomita T, Kamio Y. Molecular biology of the pore-forming cytolisins from *Staphylococcus aureus*, α - and γ -hemolysins and leukocidin. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 1997, 61, 565–572.

Tsubakishita S, Kuwahara-Arai K, Sasaki T, Hiramatsu K. Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010, 54(10), 4352–4359.

Turner NA, Sharma-Kuinkel BK, Maskarinec SA, Eichenberger EM, Shah PP, Carugati M, Holland TL, Fowler VG. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nature Reviews Microbiology* 2019, 17(4), 203–18.

Unal N, Cinar OD. Detection of staphylococcal enterotoxin, methicillin-resistant and Pantone–Valentine leukocidin genes in coagulase-negative staphylococci isolated from cows and ewes with subclinical mastitis. *Tropical Animal Health and Production* 2012, 44, 369–375.

Unal N, Yildirim M. Antibiotic resistance profiles of staphylococci species isolated from milks, teat skins and noses mucous of cows. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi* 2010, 16, 389–396.

Ushioda H, Terayama T, Sakai S, Zen-Yoji H, Nishiwaki M, Hidano A. Coagulase typing of *Staphylococcus aureus* and its application in routine work. In: Jeljaszewicz J, editor. *Staphylococci and staphylococcal infections*, Zentbl. Bakteriol. Suppl. 10. Stuttgart, Germany: Gustav Fischer Verlag; 1981. pp. 77–83.

Valeva A, Palmer M, Bhakdi S. Staphylococcal α -toxin: formation of the Heptameric pore is partially cooperative and proceeds through multiple intermediate stages. *Biochemistry* 1997, 36, 13298–13304.

Valeva , Hellmann N, Walev I, Strand D, Plate M, Boukhallouk F, Brack A, Hanada K, Decker H, Bhakdi S. Evidence that clustered phosphocholine head groups serve ads sites for binding and assembly of an oligomeric protein pore. *Journal of Biological Chemistry* 2006, 281, 26014–26021.

Valle J, Gomez-Lucia E, Piriz S, Goyache J, Orden JA, Vadillo S. Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. *Applied and Environmental Microbiology* 1990, 56, 1323– 1326.

Vancraeynest D, Hermans K, Haesebrouck F. Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits for biofilm formation and MSCRAMMs. *Veterinary Microbiology* 2004, 103,241-247.

Vandana S, Raje M, Krishnasastry V. The role of the amino terminus in the kinetics and assembly of α -hemolysin of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry* 1997, 272, 24858–24863.

Vandenesch F, Lina G, Henry T. *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2012, 2, 1–15.

Vanderhaeghen W, Cerpentier T, Adriaensen C, Vicca J, Hermans K, Butaye P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. *Veterinary Microbiology* 2010, 144, 166–171.

Vanderhaeghen W, Piepers S, Leroy F, Van Coillie E, Haesebrouck F, De Vliegher S. “Identification, typing, ecology and epidemiology of coagulase negative staphylococci associated with ruminants”, *Journal of Veterinary Science* 2015, 203, 44-51.

Vanderhaeghen W, Piepers S, Leroy F, Van Coillie E, Haesebrouck F, De Vliegher S. “Invited review: effect, persistence, and virulence of coagulase negative *Staphylococcus* species associated with ruminant udder health”, *Journal Of Dairy Research* 2014, 97, 5275-93.

Vanderhaeghen W, Piepers S, Leroy F, Van Coillie E, Haesebrouck F, Vliegher S. Identification, typing, ecology and epidemiology of coagulase negative staphylococci associated with ruminants. *The Veterinary Journal* 2014, 203, 44-51.

Vangroenweghe F, Lamote I, Burvenich C. “Physiology of the periparturient period and its relation to severity of clinical mastitis”, *Domestic Animal Endocrinology* 2005, 29, 283-93.

Vannuffel P, Heusterspreute M, Bouyer M, Vandercam B, Philippe M, Gala JL. Molecular characterization of femA from *Staphylococcus hominis* and *Staphylococcus saprophyticus*, and femA-based discrimination of staphylococcal species. *Research in Microbiology* 1999, 150, 129–141.

Varaldo PE, Kilpper-Balz R, Biavasco F, Satta G, Schleifer KH. *Staphylococcus delphini* sp. nov., a coagulase-positive species isolated from dolphins. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 1988, 38, 436–9.

Vasconcelos NG, da Cunha MLRS. Staphylococcal enterotoxins: molecular aspects and detection methods. *Journal of Public Health and Epidemiology* 2010, 2, 29-42.

Ventura CL, Malachowa N, Hammer CH, Nardone GA, Robinson MA, Kobayashi SD, DeLeo FR. Identification of a novel *Staphylococcus aureus* two-component leukotoxin using cell surface proteomics. *PLoS ONE* 2010, 5, 11634.

Viana D, Blanco J, Tormo-Más MA, Selva L, Guinane CM, Baselga R, Corpa J, Lasa I, Novick RP, Fitzgerald JR, Penadés JR. Adaptation of *Staphylococcus aureus* to ruminant and equine hosts involves SaPI-carried variants of von Willebrand factor-binding protein. *Molecular Microbiology* 2010, 77, 1583–1594.

Villaruz AE, Bubeck Wardenburg J, Khan BA, et al. A point mutation in the agr locus rather than expression of the Pantone-Valentine leukocidin caused previously reported phenotypes in *Staphylococcus aureus* pneumonia and gene regulation. *The Journal of Infectious Diseases* 2009, 200, 724–734.

Virdis S, Scarano C, Cossu F, Spanu V, Spanu C, De Santis EP. “Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase negative *Staphylococci* isolated from goats with subclinical mastitis” *Veterinary Medicine Journal*, 2010.

von Darányi J. Qualitative Untersuchungen der Luftbakterien. *Archives of Hygiene Sciences* (Berlin) 1925, 96, 182.

von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *The New England Journal of Medicine* 2001, 344, 11–16.

Wagenvoort JHT, Sluijsmans W, Penders RJR. Better environmental survival of outbreak vs. sporadic MRSA isolates. *Journal of Hospital Infection* 2000, 45, 231.

Wald R, Hess C, Urbantke V, Wittek T, Baumgartner M. Characterization of *Staphylococcus* Species Isolated from Bovine Quarter Milk Samples. *Animals* 2019, 9, 200.

Walther C, Perreten V. Letter to the editor: Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* in organic milk production. *Journal Of Dairy Research* 2007, 90, 5351.

Watanabe S, Ito T, Takeuchi F, et al. Structural comparison of ten serotypes of staphylocoagulases in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 2005, 187, 3698–3707.

Weese JS. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals. *ILAR Journal*. 2010, 51, 233–244.

Weese JS. Staphylococcal control in the veterinary hospital. *Veterinary Dermatology* 2012, 23, 258–292.

Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, Nouwen JL. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *The Lancet Infectious Diseases* 2005, 12, 751–762.

White EC, Hinckley LS. Prevalence of mastitis pathogens in goat milk. *Small Ruminant Research* 1999, 33, 117–121.

Wilke GA, Bubek Wanderburg J. Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin-mediated cellular injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)* 2010, 107, 13473–13478.

Wilson GJ, Seo KS, Cartwright RA, Connelley T, Chuang-Smith ON, Merriman JA, Guinane CM, Park JY, Bohach GA, Schlievert PM, Morrison WI, Fitzgerald JR. A novel core genome encoded superantigen contributes to lethality of community-associated MRSA necrotizing pneumonia. *PLoS Pathogens* 2011, 7, e1002271.

Woodin AM. Fractionation of the two component of leukocidin from *Staphylococcus aureus*. *Biochemical Journal* 1959, 73, 225–237.

Wooding FB, Morgan G, Craig H. Sunbursts and christiesomes: cellular fragments in normal cow and goat milk. *Cell Tissue Research* 1977, 185, 535–545.

Xu X, Lin D, Yan G, Ye X, Wu S, Guo Y, Zhu D, Hu F, Zhang Y, Wang F, Jacoby GA, Wang M. *vanM*, a new glycopeptide resistance gene cluster found in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010, 54(11), 4643–7.

Yugueros J1, Temprano A, Berzal B, Sánchez M, Hernanz C, Luengo JM, Naharro G. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase- encoding gene as a useful taxonomic tool for *Staphylococcus* spp. *Journal of Clinical Microbiology* 2000, 38, 4351–4355.

Yugueros J, Temprano A, Sanchez M, Luengo JM, Naharro G. Identification of *Staphylococcus* spp. by PCR-restriction fragment length polymorphism of gap gene. *Journal of Clinical Microbiology* 2001, 39, 3693–3695.

Zajdel M, Wegrzynowicz Z, Jeljaszewicz J, Pulverer G. Mechanism of action of staphylo- agulase and clumping factor. *Contributions to microbiology and immunology* 1973, 1, 364–375.

Zecconi A, Cesaris L, Liandris E, Dapra V, Piccinini R. “Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland”, *Microbial Pathogenesis* 2006, 40, 177-83.

Zenebe T, Ahmed N, Kabeta T, Kebede G. Review on medicinal and nutritional values of goat milk. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics Impact Factor* 2014, 3(3), 30-39.

Ziebuhr W. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* : emerging pathogens in nosocomial infections. *Contributions to Microbiology* 2001, 8, 102–107.



ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : Dönmez, Evrim
Uyruk : T.C.
Telefon : 05530109161
Doğum yeri ve tarihi : İzmir / 03.07.1995
E-mail : donmezevrim95@gmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Y. Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi İş Sağlığı ve Güvenliği	2019
Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Gıda Mühendisliği	2017

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2020	İNSUS Dondurulmuş Gıda Ürünleri San.Tic. A.Ş.	Gıda Mühendisi