



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KONYA BÖLGESİ'NDEKİ MASTİTİSLİ
İNEKLERDEN İZOLE EDİLEN
STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUŞLARININ
REAL-TIME PCR İLE ÇEŞİTLİ VİRULANS
GENLERİNİN (*PVL*, *LukED*, γ -HEMOLİZİN)
KANTİTATİF ANALİZİ

Serengül LADİKLİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyoloji Anabilim Dalı

Ocak-2011
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Serengül LADİKLİ tarafından hazırlanan “Konya Bölgesi’ndeki Mastitisli ineklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının Real-Time PCR ile çeşitli virulans genlerinin (PVL, LukED, γ -hemoliz) kantitatif analizi” adlı tez çalışması 11/01/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan

Yrd. Doç. Dr. Rüstem DUMAN

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Emine ARSLAN

Üye

Yrd. Doç. Dr. Emine ARSLAN

Üye

Yrd. Doç. Dr. Uğur ARSLAN

Üye

Yrd. Doç. Dr. Rüstem DUMAN

İmza

.....

.....

.....

.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Bayram SADE
FBE Müdürü

Bu tez çalışması BAP tarafından 09201063 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Serengül LADİKLİ

Tarih: 11.01.2011

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KONYA BÖLGESİ'NDEKİ MASTİTİSLİ İNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SUŞLARININ REAL-TIME PCR İLE ÇEŞİTLİ VİRULANS GENLERİNİN (*PVL*, *LukED*, γ -HEMOLİZİN) KANTİTATİF ANALİZİ

Serengül LADİKLİ

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Emine ARSLAN

2011, 48 Sayfa

Jüri

Yrd. Doç. Dr. Emine ARSLAN

Yrd. Doç. Dr. Uğur ARSLAN

Yrd. Doç. Dr. Rüstem DUMAN

Bu çalışmada mastitisli ineklerden izole edilen 98 *Staphylococcus aureus* suşunda Real-Time PCR ile *PVL*, γ -hemolizin ve *LukED* gibi virulans genlerin varlığı/yokluğu ve kantitatif analizi yapılmıştır. Ayrıca bu üç genin varlığı PCR ile de doğrulanmıştır. Real-Time PCR'a göre *PVL*, γ -hemolizin ve *LukED* genleri sırasıyla %70,40, %90,81 ve %66,32 oranlarında bulunurken klasik PCR'a göre %92,85, %97,95, %75,51 oranları elde edilmiştir. Virulans genlerinin suşlara göre kantitatif analizi sonucunda, bu viral gen miktarlarına göre 40<-10.000, 10.000-100.000 ve 100.000< IU/ml şeklinde 3 gruba ayrılmıştır. *PVL* geninin miktarı bu gruplar arasında sırasıyla %27,55, %9,18 ve %32,65 olarak değerlendirilirken, γ -hemolizin %48,97, %39,79 ve %2,04 ve *LukED*'nin %45,91, %14,28 ve %6,12 olarak miktarları belirlenmiştir. Sonuç olarak mastitisli ineklerden izole edilen *S. aureus* suşlarında bu virulans genlerinin prevalansı yüksek çıkmıştır. Her iki metoda göre elde edilen virulans genlerinin varlığının birbiri ile uyumlu olduğu istatistiki olarak söylenebilir (p<0,05).

Anahtar Kelimeler: inek, *LukED*, mastitis, *PVL*, Real-Time PCR, *S. aureus*, γ -hemolizin

ABSTRACT

MS THESIS

QUANTITATIVE ANALYSIS of VARIOUS VIRULANCE GENES (*PVL*, *LukED*, γ -*HEMOLYSIN*) by REAL-TIME PCR of *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* STRAINS ISOLATED FROM BOVINE MASTITIS IN KONYA REGION

Serengül LADİKLİ

The Graduate School of Natural And Applied Science of Selçuk University
Biology Branch

Advisor: Asist. Prof. Dr. Emine ARSLAN

2011, 48 Pages

Jury

Asist. Prof. Dr. Emine ARSLAN

Yrd. Doç. Dr. Uğur ARSLAN

Yrd. Doç. Dr. Rüstem DUMAN

In this study, existence/absence of virulence genes such as *PVL*, *LukED* and γ -*hemolysin* and the quantitative analysis was done in 98 *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis by Real-Time PCR. Also the existence of the three genes was verified with PCR. While *PVL*, *LukED*, γ -*hemolysin* and genes were found to be 70,40%, 90,81% and 66,32% respectively according to Real-Time PCR, according to classical PCR the rates were 92,85%, 97,95% and 75,51%. As a result of the quantitative analysis of virulence genes in *S. aureus* strains, according to the amount of this viral gene have been divided into three groups as 40<-10.000, 10.000-100.000, and 100.000< IU/ml. While the amount of *PVL* gene in these groups is evaluated as 27,55%, 9,18%, and 32,65% respectively, the amounts of γ -*hemolysin* and *LukED* are determined as 48,97%, 39,79%, 2,04%, and 45,91%, 14,28%, 6,12%, respectively. Consequently, in *S. aureus* strains isolated from bovine mastitis, the prevalence of these virulence genes were determined to be high. According to both methods, it can be statistically deduced that the existence of virulence genes obtained were coherent.

Keywords: bovine, *LukED*, mastitis, *PVL*, Real-Time PCR, *S. aureus*, γ -*hemolysin*

ÖNSÖZ

Bu çalışmada, mastitise sebep olan *S. aureus* bakterilerindeki virulans etki gösteren Panton-Valentin lökositin (*PVL*), *LukED*, *γ-hemolizin* genlerinin Real-Time PCR (gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) tekniği ile varlığı veya yokluğu tespit edilip varsa genlerinin miktarının tayini yapılmıştır. Elde edilen verilerden oluşan grafikler direkt değerlendirilerek ve değerlendirilen verilerin doğruluk analizleri normal PCR metodu ile bu gen bölgeleri çoğaltılarak agaroz jel elektroforezinde gözlenmiştir.

Tez çalışmamın her anında bilgi ve tecrübeleri ile her konuda bana yol gösteren, danışmanlığımı yapan hocam Yrd. Doç. Dr. Emine ARSLAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamda Real-Time PCR analizi için kendi laboratuvar imkanlarını benden esirgemediği için Yrd. Doç. Dr. Uğur ARSLAN'a, şekillerimin düzenlenmesinde yardımcı olan Doç. Dr. Atilla ARSLAN'a, deney aşamalarında yardımını esirgemeyen Elif GÜLBAHÇE'ye, istatistik analizinde yardımcı olan Öğr. Gör. Dr. Neriman KARADAYI'ya, Real-Time PCR çalışmalarında bana yardımcı olan Mehmet Ali KURUL'a teşekkür ederim. Ayrıca bana bu süre boyunca her konuda destek olan, sıkıntılarımı paylaşan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen babam Zeki LADİKLİ, annem Emine LADİKLİ, kardeşim Hakan LADİKLİ'ye teşekkür ederim.

Ayrıca 09201063 nolu proje ile tezimin yürütülmesinde araç gereç ve maddi olanak sağlayan S.Ü. BAP Koordinatörlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Serengül LADİKLİ
KONYA-2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
3. MATERYAL VE METOT.....	12
3.1. Materyal.....	12
3.1.1. Kimyasal maddeler ve besiyerleri.....	12
3.1.2. Tampon ve Çözeltiler.....	12
3.2. Metod.....	13
3.2.1. Çalışmada kullanılan bakteri kültürleri.....	13
3.2.2. Bakteriden Genomik DNA izolasyonu	13
3.2.3. PCR uygulaması	13
3.2.4. Real-Time PCR uygulaması	14
3.2.5. <i>S. aureus</i> suşlarının PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	15
3.2.6. Real-Time PCR ürünlerinin değerlendirilmesi	15
3.2.7. İstatistiksel Analiz.....	15
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	16
4.1. <i>S. aureus</i> suşlarında <i>PVL</i> , γ -hemoliz ve <i>LukED</i> genlerinin PCR Analizi Sonuçları	16
4.2. Virulans Genlerin Real-Time PCR Sonuçları.....	20
4.2.1. <i>PVL</i> gen bölgesinin Real-Time PCR sonuçları.....	20
4.2.2. γ - Hemoliz gen bölgesinin Real-Time PCR sonuçları	26
4.2.3. <i>LukED</i> gen bölgesinin Real-Time PCR sonuçları	31
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	38
KAYNAKLAR	39
ÖZGEÇMİŞ	48

SİMGELER VE KISALTMALAR

<i>S. aureus</i>	Staphylococcus aureus
<i>PVL</i>	Panton-Valentin lökositidin
γ -hemolizin	Gama hemoliz
Real-Time PCR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
PMN	Monositler ve polimorfnükleer hücreler
PFGE	Pulsed-field gel electrophoresis (değişken alanlı jel elektroforezi)
MLST	Multilokus dizi tiplendirme
MRSA	Metisiline dirençli <i>S. aureus</i>
NaCl	Sodyumklorür
NB	Nutrient Broth
TSA	Tryptone Soy Agar
SDS	Sodyum dodesil sülfat
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
ark	Arkadaşları
μ l	Mikrolitre
MgCl	Magnezyum klorür
KCL	Potasyum klorür
HCl	Hidroklorik asit
TAE	Tris-Asetik asit-EDTA
bp	Baz çifti
IU/ml	International unit
Tm	Erime noktası
CP	Cycle point
TE	Tris-EDTA
EDTA	Etilendiamin tetraasetikasit
°C	Santgrad derece
dNTP	dATP, dTTP, dCTP, dGTP
dATP	Deoksi adenzin trifosfat
dCTP	Deoksi sitidin trifosfat
dGTP	Deoksi guanozin trifosfat
dTTP	Deoksi timidin trifosfat
ml	Mililitre
ng	Nanogram
Mg	Miligram
UV	Ultraviyole

1. GİRİŞ

Mastitis, süt veriminde azalmaya, süt kalitesinin bozulmasına (Bramley ve Dodd, 1984; Pyorala ve Syvajarvi, 1987; Philpot ve Nickerson, 1991), ineklerin sürüden erken çıkartılmasına (Jain, 1979; Gudding ve ark., 1984; Nickerson, 1989; Han ve ark., 2000) ve önemli derecede ekonomik kayıplara sebep olan yangı ile karakterize olan bir hastalıktır (Bramley ve Dodd, 1984; Pyorala ve Syvajarvi, 1987; Philpot ve Nickerson, 1991). Bu enfeksiyon aynı zamanda işlenmemiş çiğ süt ve süt ürünleri tüketimi ile de insan sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir (Jain, 1979; Gudding ve ark., 1984; Nickerson, 1989; Han ve ark., 2000).

Mastitis, klinik ve subklinik olmak üzere iki formda gözlenir. Klinik mastitiste ateş ve yangı semptomları gözlenirken, subklinik mastitiste klinik semptomlar gözlenmez (Lipman ve ark., 1996; Arda, 1997). Hastalığın subklinik şeklinin klinik vakalara nazaran daha yaygın olması ve bunun da yetiştiriciler tarafından kolaylıkla fark edilememesi hastalığı önemli kılmaktadır (Jarrett, 1984; Fırat ve Uysal, 1986).

Mastitis genellikle bakteriler tarafından şekillendirilen, kompleks etiyolojiye sahip bir hastalıktır. Fiziksel, kimyasal veya enfeksiyöz etkenlere bağlı olarak mastitis meydana gelmektedir (Karahana, 2005). Bugüne kadar hem dünyanın çeşitli ülkelerinde hem de yurdumuzda yapılan çalışmalarda mastitis oluşturan etkenlerin büyük bir çoğunluğunun bakteriler olduğu ortaya konulmuştur. Bu etkenlerin %95'ini *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Str. dysgalactiae*, *Str. uberis* gibi bakteriler oluşturur (Bilgehan, 2000). Sığırlardan elde edilen mastitisli süt örneklerinden, 130'un üzerinde farklı mikroorganizma izole edilmiştir. Bakteriler dışında bazı mantar ve maya türleri ile viruslar da mastitise neden olmaktadır (Arda ve İstanbulluoğlu, 1980; Eberhatr, 1986; Watts, 1988).

Bu bakteriler içerisinde yer alan *S. aureus*'lar birçok hayvan türünde ve insanlarda çeşitli enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Bu enfeksiyonlar; birçok hayvanda gözlenen apseler ve irinli olgular, ineklerde çeşitli derecelerde gözlenen mastitis olgularıdır (Quinn ve ark., 1994). İnsanlarda ise, *S. aureus* hastane kaynaklı enfeksiyonları oluşturan etkenlerin başında gelmektedir (Konemen ve ark., 1997). *S. aureus*, dünya çapında %60 oranında hastane kaynaklı enfeksiyonlara yol açabilen önemli bir patojendir. Ayrıca Avrupa'da %1-30 arasında değişen klinik tablolar gözlenmiştir. Bu patojenin yayılmasının kontrolünde, hastane enfeksiyon kontrol programları öncelik kazanmıştır (Frenay ve ark., 1994; Muto ve ark., 2003).

S. aureus'un neden olduğu mastitisin patojenezinde etkenin sahip olduğu virulans faktörler önemli bir yere sahiptir. Toksinler, enzimler, yüzey proteinleri, kapsül ve slime gibi virulans faktörleri lenfositlerin mitogenezisini baskılamak ve nötrofil aktivitesinden korunmak suretiyle meme içinde etkenin canlı kalmasına, invazyonuna, konakçı immun sisteminden korunmasına yardımcı olurlar (Karahan, 2005).

Virulans faktörlerin büyük bir kısmı *S. aureus* tarafından üretilir. *S. aureus* A'dan E'ye son zamanlarda tanımlanan SE türlerini (*seg-seu*) (Dinges ve ark., 2000; Smyth ve ark., 2005), toksik şok sendrom toksin 1'i (*tsst-1*), β - hemolizini (*hly*), iki komponentli Panton-Valentine Leukosidini (*Luk-PVL*), proteaz yeteneği ile T-hücre çoğalmasına neden olan eksfoliyatif A ve B toksinini (*eta* ve *etb*), klasik stafilokokkal enterotoksinler (*SEs*) dahil bir dizi ekzotoksini üretebilir (Ikawaty ve ark., 2010).

Mastitislerin teşhisinde genellikle klinik tanı yeterli değildir. Mastitise neden olan etkenin izolasyonu ve identifikasyonu gereklidir (Karahan, 2005). *S. aureus*'un sebep olduğu mastitisin kontrolü için çok çeşitli metotlara ihtiyaç duyulmaktadır. Fenotipik teknikler (faj tiplendirme, serotiplendirme, biyotiplendirme, antibiyogramlar) inek orijinli *Staphylococcus*'lar için genellikle düşük tiplendirme yeteneğine sahiptirler (Matthews ve ark., 1992; Tenover ve ark., 1994). Son günlerde moleküler epidemiyolojinin DNA'ya dayalı metotları iyi sonuçlar vermiştir (Moslov ve ark., 1993; van Belkum ve ark., 1995). Bu tip çalışmalar insan ve hayvan kaynaklı *S. aureus* suşları arasında genotipik farklılıklar olduğunu göstermiştir (Hajek ve Marsalek, 1971; Devriese, 1984; Musser ve Kapur, 1992; Kapur ve ark., 1995; Zadoks ve ark., 2000; Reinoso ve ark., 2004). Hızlı epidemiyolojik tiplendirme, kaynağın identifikasyonu için çok önemlidir ve infeksiyonun yayılmasında bakterinin gelişimi için detaylı bilginin edinilmesini sağlamıştır (Del Vecchio ve ark., 1995).

Gen anlatımlarının nicel olarak saptanmasında kullanılan gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real-Time PCR), etkili, güvenilir ve hızlı bir yöntemdir. Bu yöntem ile fizyolojik ya da gelişimsel süreçlere bağlı olarak gen anlatımında meydana gelen değişimler hassas ve hızlı bir şekilde ölçülebilir. Ayrıca Real-Time PCR, sentezlenen kopya ürün miktarının sayısal değerlere dönüştürülmesi ile birlikte, tek nokta mutasyonlarının belirlenmesinde, patojenlerin tanımlanmasında, DNA hasarının belirlenmesinde, tek nükleotid polimorfizmi (SNP) analizinde ve kromozom bozukluklarının tespitinde de etkin olarak kullanılmaktadır (Temizkan ve ark., 2008).

Real-Time PCR dinamik, hassas ve spesifik olması nedeni ile çok yaygın kullanılan bir yöntem haline gelmiştir. Bu teknoloji, SYBR Green gibi DNA ya

bağlanan floresan işaretliyecileri kullanılması ile biriken floresan yoğunluğuna bağlı olarak DNA ya da mRNA örneklerindeki ürün miktarlarının tespiti mümkündür (Özbek, 2008).

Viruslar, bakteriler ve bazı mantar türleri insanlar, hayvanlar ve bitkiler de enfeksiyonlara yol açabilen çok önemli patojenlerdir. Real-Time PCR enfeksiyon hastalıklarında patojenlerin saptanmasında diziye özgü floresan probler sayesinde klinik laboratuvarlarında tercih edilen ve rutin uygulamada kullanılan bir metot haline gelmiştir. Ayrıca viral genomun sayısal değerinin belirlenmesi hastalığın etki derecesinin saptanmasında ve tedavisinde çok büyük önem taşımaktadır. Bu teknoloji ile çok önemli mikrobiyal patojen tanımlanabilirken, antibiyotiklere dirençli olan bazı türlerin tespiti de yapılabilmektedir (Günel, 2008).

Son zamanlarda, virulans genlerine dayanan oldukça basit genomik metodların uygulanması ile farklı *S. aureus* izolatlarını sınıflandırmak ve çoklu yanıt ile akrabalığı değerlendirmek için faydalı olacağı görülmüştür. Bununla birlikte farklı virulans genlerin varlığını ya da yokluğunu Real-Time PCR ile belirleyerek *S. aureus*'un patojenik aktivitesini hızlı bir şekilde değerlendirmek mümkündür. Bu da birçok hayvan hastalığının tedavisinde önemlidir. Real-Time gibi hızlı ve güvenilir bir metodla *PVL*-pozitif izolatlar ve diğer virulans genler belirlenebilir ve bu hastalığın optimal tedavisi damar içi immunoglobulinler ile birleştiğinde antimikrobial ajanlarla gerçekleştirilir (Johnson ve ark., 2004).

Mastitisli ineklerde *S. aureus* virulans genlerin (*PVL*, *LukED* ve γ -hemoliz gibi) varlığı üzerine dünyada oldukça sınırlı çalışma vardır. Ülkemizde ise moleküler teknikle bu virulans genlerin varlığı hakkında çalışmaya rastlanmamıştır. Bu anlamda önem arz eden bu çalışmada Mastitis'e sebep olan *S. aureus* bakterilerinde virulans etki gösteren *PVL*, *LukED* ve γ -hemoliz genlerinin, Real-Time PCR tekniği ile varlığının, yokluğunun ve varsa bu genlerin miktarlarının belirlenmesi ve aynı zamanda PCR ile doğrulanması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Mastitis, meme bezlerinin travmatik etkilere ve meme içerisine çoğunlukla ekzojen veya endojen yolla giren mikroorganizmalara karşı reaksiyon göstermesidir (Roditis ve ark., 1979). Sütün miktar ve bileşimini olumsuz yönde etkileyen mastitisin oluşumuna zemin hazırlayan etmenler arasında yaş, laktasyon sayısı, süt verimi, ırk, memenin anatomik ve fizyolojik özellikleri, mevsim, barınak koşulları, beslenme ve sağım tekniği gibi faktörler gösterilebilmektedir (Şeker ve ark., 2000; Uzmay ve ark., 2003)

Mastitis, meme dokusu ve sütte ortaya çıkan değişikliklere göre klinik ve subklinik mastitisler olarak sınıflandırılmaktadır (Baştan, 2002). Bunlardan klinik mastitisler meme bezindeki yangının şiddetine bağlı olarak perakut, akut, subakut ve kronik olmak üzere 4 grupta sınıflandırılmıştır (Jain, 1979).

Perakut mastitis birden ortaya çıkar. Bu tür mastitis, hayvanlarda titreme, vücut ısısında yükselme, nabızda artış, kısa ve hızlı solunum, yeme içmenin durması ve tek taraflı topallık gibi belirtilere neden olur. Memenin bir veya daha fazla lobunda şişkinlik, gerginlik, kızarıklık, ısı artışı, ödem ve ağrı görülmektedir. Süt sekresyonu azalır veya tamamen durur. Erken müdahale edilmeyen durumlarda ölüm görülebilir. Akut olgularda semptomlar perakut mastitis olgularına göre, biraz daha hafiftir. Süt ve meme lobundaki değişiklikler aynıdır. İlerleyen durumda gangrenli mastitise dönüşebilir. Subakut mastitiste perakut ve akut mastitislerde görülen şiddetli genel ve lokal belirtiler görülmez. Sağımın başlangıcında sütte pıhtılaşmaya rastlanabilir. Enfeksiyonun ilerlemesiyle birlikte şişme, kızarma, ısı artışı ve ağrı görülür. Kronik mastitis, tedavi edilemeyen ve uzun süre devam eden diğer klinik ve subklinik olguların sonucunda ortaya çıkar. Sütte her zaman belirgin değişiklikler görülmez (Deveci ve ark., 1994; Harmon, 1994).

Klinik mastitis formlarının hepsinde yangısal cevabın karakteristik belirtileri olan memede şişme, ağrı, kızarıklık, sıcaklık artışı ve fonksiyon kaybı gibi belirtilerle birlikte sistemik olarak hayvanda ateş, halsizlik, iştahsızlık gibi genel hastalık belirtileri de gözlenir. Sütte ise, renk değişimleri, koku, sulanma, pıhtı gibi değişiklikler görülebilmektedir (Karahan, 2005). Yapılan çalışmalarda klinik mastitis olgularının %47,45'inin *S. aureus*'tan kaynaklandığı ve bu olguların %10,8'inin tedaviye rağmen klinik olarak iyileşmediği gözlemlenmiştir (Bademkiran ve ark., 2005).

Mastitisin ikinci formu olan subklinik mastitis, gizli seyretmesi, sütte ve memedeki değişikliklerin kolayca fark edilememesi, sürenin uzun olması, süt üretimini azaltması, süt bileşimini etkileyerek süt ürünlerinin kalitesinde ve veriminde düşmeye sebep olması (Alaçam, 1997; Hadimli, 2000), klinik mastitislere göre daha sık görülmesi ve süratle yayılması gibi nedenlerden dolayı daha önemlidir (Baştan, 2002). Süt inekleri üzerinde yapılan bazı çalışmalarda, mastitis olgularının %93-98'ini subklinik mastitislerin oluşturduğu tespit edilmiştir (Rodenburg, 1990; Ekin, 1998).

Mastitis, birçok bakteriyel (*Escherichia coli*, *Str. uberis*, *Str. agalactiae*, *Str. dysgalactiae*, *Str. pyogenes*, *S. aureus*, *Corynebacter pyogenes*), mikotik (*Candida spp.*, *Cryptococcus spp.*) ve viral patojen (Herpes tipi viruslar) tarafından oluşturulur. Yapılan birçok araştırmaya göre sütçülük işletmelerindeki ineklerdeki mastitis olgularının çoğuna *Staphylococcus* ve *Streptococcus* türleri sebep olmaktadır (Alaçam ve ark., 1986; Deveci ve ark., 1994; Biggadike, 2001; Baştan, 2002; Rişvanlı ve Kalkan, 2002). Bu bakteriyel etkenler arasında *S. aureus* ilk sırada yer alır (Arda ve İstanbulluoğlu, 1979; Alaçam ve ark., 1994; Erganiş ve ark., 1995; Hadimli ve ark., 2001). Bulaşıcı mastitislere sebep olan bu patojen, çoğunlukla süt sağımı sırasında memeden memeye aktarılır.

Arda ve İstanbulluoğlu (1979) mastitis üzerine yaptıkları bir çalışmada, %31,1 *S. aureus*, %15,5 *Str. agalactiae*, %10,4 *E. coli*, %8,8 *C. albicans*, %8,3 *C. pyogenes*, %7,2 *S. epidermidis*, %6,7 *P. aeruginosa*, %6,2 anaerobik koklar, %2,6 *Str. dysgalactiae*, %2,6 *Str. uberis*, %1,5 *Enterobacter aerogenes*, %1 *Diplococcus pneumoniae*, %0,5 *Str. faecalis*, %3,1 *Proteus vulgaris* izole etdiklerini bildirmişlerdir. Aydın ve Coşkun (1981) ise, 568 süt örneğinden 564 hastalık etkeni izole etmişler ve bu etkenlerin %23,4'ünün koagulaz pozitif stafilokok, %7,2'sinin koagulaz negatif stafilokok, %10,6'sının *Str. agalactiae*, %4,2'sinin *Str. faecalis*, %8,5'inin *E. coli*, %7,4'ünün *C. pyogenes*, %0,3'ünün *Cryptococcus sp.*, %0,1'inin *Nocardia sp.* ve diğer saprofitik karakterdeki maya ve mantarların olduğunu tespit etmişlerdir.

Mastitisli hayvanların yılda ortalama olarak 180-200 dolarlık bir kayba yol açtığı, bu kaybın %70'inin süt üretimindeki azalmadan, %8'inin tedavi sırasında ve sonrasında atılan süttten, %8'inin ilaç ve veteriner hekim masrafından, %14'ünün ölüm ve hayvanın zorunlu olarak sürüden uzaklaştırılması olarak bildirilmektedir (Philpot ve Nickerson, 1991).

Mastitisten kaynaklanan kayıplar, hayvan hastalıklarının sebep olduğu ekonomik kayıpların %26'sını oluşturmaktadır (Şenünver ve Kırşan, 1995). Yalnızca Amerika

Birleşik Devleti'nde mastitis nedeniyle meydana gelen yıllık zararın 185 dolar/inek olmak üzere (Schroeder, 1997), toplam 2 milyar dolar (Sugimoto ve ark., 2006); İngiltere'de ise 300 milyon sterlin olduğu tahmin edilmektedir (Hillerton ve Berry, 2005).

Memeye giren mikroorganizmalar her zaman mastitis oluşturmaz. Memede infeksiyonun ortaya çıkabilmesi için etkenin memeye girmesi, üremesi, üreyen etkenin memede yayılması ve yangı oluşturmaya başlaması gerekmektedir. Bu durum etkenin türüne, memeye giren mikroorganizmaların sayısına, virulansına, meme dokusunun ve hayvanın direncine bağlıdır (White ve ark., 1986; Oliver ve Sordillo, 1988; Deveci ve ark., 1994; Harmon, 1994).

S. aureus infeksiyonlarının patojenitesi, çeşitli yüzey komplementlerini tanıyan bağlı matriks moleküllerini (örneğin; klamping faktör, fibronektin binding protein) içeren bakteri yüzey komplementleriyle (örneğin; kapsüler polisakkarit ve protein A) ve ekstrasellüler proteinlerle (örneğin; koagülaz, hemolizinler [α (Hla), β , γ (Hlg), δ], enterotoksinler, toksik şok sendrom toksin (*tsst*), exfoliatinler ve *PVL*) ilişkilidir. Bakteri bu virulans faktörleri üreterek mastitisin patogeneziğine katkı sağlar ve bu toksinler arasından bazıları monositler ve polimorfonükleer hücreler (PMN) gibi fagositik hücreleri hedef alarak öldürme kapasitesine sahiptir (Tomita ve Kamio, 1997; Archer, 1998).

S. aureus, virulansta büyük rol oynayan alfa, beta, gama ve delta olarak isimlendirilen toksinler sentezlemektedir (Akan, 2006). Alfa toksin sığır mastitlerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının yaklaşık %40-50'sinde, beta toksin ise %75-100'ünde saptanmıştır. Saf alfa toksinin doza bağımlı olarak meme bezlerinde hemorajik nekroza ve etkenin yoğun üremesine bağlı olarak da gangrenöz mastitise neden olabileceği bildirilmiştir (Karahan, 2005). Beta toksin ise, meme alveollerinde ve meme kanallarında polimorfnükleer lökosit infiltrasyonuna ve yangısal değişikliklere sebep olur (Ward ve ark., 1979). Gama toksin, hassas hücre membranlarını hasara uğratan iki komponentli bir proteindir. Bu proteinler membran hasarında birlikte rol oynamaktadır. Gama toksin gen lokusu A, B ve C olmak üzere 3 tane protein komponentinin üretiminden sorumludur. B ve C komponentleri zayıf hemolitik aktiviteye sahip bir gama toksin oluştururken, A ve B komponentleri hemolitikler ve zayıf lökotoksiktirler (Küplülü ve ark., 1995). Bununla birlikte, gama toksinin beta toksin ile birlikte çoğunlukla doku irritasyonuna sebep olduğu, alfa ve beta toksinlerinin

meme dokularına adezyon yeteneğini artırmak suretiyle virulansa önemli katkıda bulundukları rapor edilmiştir (Cifrian ve ark., 1996; Karahan, 2005).

Sığır süt örneklerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının birçoğu tarafından sentezlenen diğer önemli bir toksin lökositin'dir (Loeffler ve Norcross, 1985). *PVL*, insan klinik hastalıkları (Lina ve ark., 1999; Rhem ve ark., 2000) ve son zamanlarda mastitisli ineklerle ilişkilendirilen lökotoksindir (Schuberth ve ark., 2001; Rainard ve ark., 2003; Fueyo ve ark., 2005). Bu toksin, sadece insan ve tavşan polimorfnükleer lökositler ve makrofajları hedef alır, sadece bu hücreler üzerine sitolitik etkiye sahiptir ve fagositozu engellemek suretiyle virulansa katkıda bulunmaktadır (Fox ve ark., 2000, Wagner, 1992; Akan, 1993). Fagositoz stafilokokkal infeksiyonlara karşı önemli bir savunma mekanizmasıdır. *PVL* (*lukS-PV* ve *lukF-PV*), birbirinden ayrı F ve S olmak üzere iki protein komponentinden oluşur. Bunların ayrı ayrı etkisi azdır veya hiç yoktur, ancak sinerjik olarak etki gösterirler (Wagner, 1992; Akan, 1993). Bu her iki komponent de antijeniktir ve formaldehit ile tokside dönüştürülür. *PVL* ile muamele edilmiş lökositin katyon geçirgenliği değişmektedir. Hücre hareketini kaybederek şişer ve granüllü, yuvarlak bir şekil alarak yavaş yavaş parçalanır. Lökositleri harap ettiği ve fagositozu engellediği için virulansta önemli bir rol oynar (Akan, 1993).

LukED tavşan deri örneğinde dermonekrozis için *PVL* kadar etkilidir fakat hemolitik aktiviteye sahip değil ya da lökositolitik aktivitesi zayıftır (Kaneko ve Kamio 2004).

Real-Time PCR teknolojisi DNA'nın çoğaltımını ve ürünlerini tek bir tüpte belirlemeyi mümkün kılan son yıllarda popüler olmuş bir metottur. Floresan ışıma tekniklerinin moleküler genetik yöntemlerle kullanıma girmesi ile birlikte bilinen PCR geliştirilerek oluşturulmuş bir yöntemdir. Gen anlatımının belirlenmesi, farklılaşma ve patolojik durumların saptanması için çok önemlidir. Medikal araştırmalarda ve moleküler tanı çalışmalarında biyolojik materyalle çalışırken çok sayıda doku örneğine veya hücre miktarına ihtiyaç duyulur. Real-Time PCR metodu ile çok az miktardaki biyolojik bir örneğin özelliği hızlı, güvenilir ve hassas bir şekilde ortaya koyulabilmektedir (Günel, 2008).

Real-Time PCR'da amplifikasyon ve analiz birlikte gerçekleşmektedir. DNA boyları ya da floresan problemler gibi analiz için gerekli olan reaktifler, PCR karışımına amplifikasyondan önce eklenmektedir. Veriler amplifikasyon süresince aynı tüp/kapiller içinden ve aynı cihaz ile toplanır. Örnek transferi, reaktif eklenmesi ve jel ayırımına gerek yoktur (Persing, 2006). Real-Time'da PCR ürünleri, floresan problemler veya SYBR

Green gibi DNA bağlayıcı boya kullanılarak belirlenebilir. Bu yöntemde kullanılan floresan boya sadece çift zincirli DNA'ya bağlandığından çoğalan DNA miktarındaki artışa paralel olarak Real-Time PCR cihazında okunan floresanın miktarı da eş zamanlı olarak artmaktadır (Kubista ve ark., 2006). Bu yöntem optimize edilmiş PCR şartlarında ve iyi tasarlanmış primerler ile çok fazla sayıda hedef genin çoğaltılmasına olanak vermektedir (van der Velden, 2003).

Real-Time PCR'da ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılmaktadır. Bu nedenle, agaroz jel elektroforezi, DNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır. Böylece sonuçlar anında alınmakta, kontaminasyon riski azalarak tüm işlemler sıcaklık döngüleri başlayınca otomatik olarak devam etmektedir (Persing, 2006). Geniş bir uygulama alanı, özgünlük ve doğru kantitatif imkanı sunmaktadır (Higuchi ve ark., 1992; Higuchi ve ark., 1993).

Prévost ve ark. (1995a) synergohimenotropik toksinleri üreten insan kaynaklı *S. aureus* suşları üzerine yaptıkları bir epidemiyolojik çalışmada *S. aureus*'un klinik suşlarının %>99'nın γ -hemoliz ürettiklerini, hastanelerden izole ettikleri *S. aureus* suşlarının %<52'da ise *PVL* ürettiklerini belirlemişlerdir.

Lina ve ark. (1999), hastane kaynaklı 172 örnekten oluşan bir *S. aureus* koleksiyonunda PCR amplifikasyonu ile *PVL* genlerini taramışlardır. *PVL* genleri, furunklöz örneklerinin %93'ünde ve zor nekrotik kanamalı pnömonia'nın %85'inde tespit edilmiştir. Aynı zamanda selülit %55, kütanöz apsesi %50, osteomyelit %23 ve parmak infeksiyonlarında da %13 olmak üzere tespit edilmiştir. 172 klinik izolattan 64 *PVL* pozitif amplifikasyon verirken, tüm izolatlarda γ -hemoliz genleri saptanmıştır. Buna rağmen *PVL* genleri, bulaşıcı endokardit, mediastinit, hastane pnömonisi, idrar kordonu infeksiyonu ve enterokolit gibi infeksiyonlarda tespit edilememiştir. Böylece *PVL*'nin daha çok deri ve mukozayı ilgilendiren nekrotik infeksiyonlarda kendini gösterdiği sonucuna varılmıştır.

İnsan kaynaklı *S. aureus*'da *PVL* geninin prevalansı, basit, tekrarlanabilir ve hızlı Real-Time Light-Cycler SYBR Green I PCR yöntemi ile araştırılmıştır. *PVL* geni *S. aureus* bakteriyemili 65 hastadan 1 izolatta, solunum yolu infeksiyonlu 55 hastadan 4 izolatta, deri infeksiyonlu 91 hastadan 2 izolatta saptanmıştır (Johnsson ve ark., 2004).

İspanya'da subklinik mastitisli ineklerin sütlerinden izole ettikleri 84 *S. aureus* izolatını 6 kontrol suşu ile birlikte hemolizin (*hla*, *hly*, *hld*, *hlg*, *hly-2*), lökotoxin (*lukPV*, *lukM*, *lukED*), toksik şok sendrom toksin (*tsst*) ve enterotoksin (*sea*, *seg*, *ser*,

seu) genleri klasik ve multipleks PCR ile test edilmiştir. Tüm 84 *S. aureus* izolatu γ -hemoliz için negatif iken, 83 izolat *LukED* için pozitif olarak belirlenmiştir (Fueyo ve ark., 2005).

Bir başka çalışmada evcil hayvanlardan izole edilen *S. aureus*'daki lökotoxin ailesi genleri PCR'la incelenmiştir. 48'i kuşlara ve 72'si domuzlara ait olan *S. aureus* örneklerinde *LukS* ve *LukF* genleri domuzdan izole edilen *S. aureus* suşlarında rastlanmazken, 48 kuş örneğinden izole edilen *S. aureus* suşlarının 44'ünde (%91,7) bulunmuştur. İki bölgedeki süt mandırasından mastitisli inek sütünden 297 *S. aureus* izolatu toplanmıştır. *LukS-LukF* ve *LukE-LukD* genlerine ilave olarak *LukM* ve *LukF-PV* (P83) genleri, İshikawa'dan 160 izolatın 100'ünde (%62,5) belirlenirken, Hokkaido'dan 137 izolatın 118'inde (%86,1) belirlenmiştir (Yamada ve ark., 2005).

Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) klonlarının sınırlı sayıda *PVL*'nin dünyada çeşitli topluluklarda yayılış gösterdiği rapor edilmiştir. Denis ve ark. (2005)'nin Belçika'da izole edilmiş ilk *PVL* pozitif MRSA suşlarının moleküler karakterizasyonunu tanımlama amacıyla yaptıkları çalışmada, Belçikalı hastalardan topladıkları klinik MRSA izolatlarını PCR ile *PVL* bakımından incelemişlerdir. Ayrıca *PVL* pozitif izolatlar, PFGE, SCCmec tiplendirme, spa dizi tiplendirme, yardımcı gen regülatör (*agr*) polimorfizm ve multilokus dizi tiplendirmesi ile de genotiplendirilmiştir. 60 izolatın *PVL* toksinini kodlayan *lukS* ve *lukF* genlerini taşıdığını bulmuşlardır.

S.aureus insan ve hayvanlarda pek çok ciddi hastalıklara sebep olmaktadır ve bulaşıcı inek mastitislerinin en yaygın etiyolojik ajanıdır. Bakteri çeşitli virulans faktörleri içermektedir ve bu virulans faktörlerinin kombinasyonunun değerlendirilmesinin önemi son yıllarda vurgulanmıştır. Zecconi ve ark. (2006)'nın yaptıkları çalışmada çeşitli virulans faktörlerinin kombinasyonun değerlendirilmesi koagülaz gen (*coa*), proteinA geni (*spa*), kollajen-bağlanma protein geni (*cna*), fibrinojen-bağlanma protein geni (*efb*), *PVL* ve enterotoksinler (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*) düşünülmüştür. Farklı genlerin varlığı/yokluğu arasındaki ilişkinin analizi ve süt somatik hücre sayımı ile iltihaplı meme cevabının ölçülmesi, lojistik gerileme ve genel doğrusal modeller tarafından gerçekleştirilmiştir. Virulans gen kombinasyonları ile kümelerdeki izolatların sınıflandırılması en az bir kümenin en yüksek iltihabi cevabı meydana getirdiğini göstermiştir. Virulans genler arasındaki ilişkilendirme, subklinik mastitisin oluşumunda risk faktör olarak *spa* ve *sej* genlerinin rol oynadığını göstermiştir. Bu sonuçlar subklinik mastitisin gelişiminde virulans

faktörlerin spesifik kombinasyonlarının ekspresyonu ve suşların özellikleri ile ilişkili olabileceğini desteklemektedir.

Aires-de-Sousa ve ark. (2007)'nın yaptığı çalışmada, 84 stafilokokkal izolat subklinik mastitisli inek, koyun, keçi, bufalo süt örneklerinden ve devekuşunun kolonizasyon örneklerinden elde edilmiştir. 30 izolat biyokimyasal ve moleküler teknikler ile *S. aureus* olarak tanımlanmış ve fenotipik ve genotipik metodlar ile kıyaslanarak karakterize edilmiştir. PFGE, spa tiplendirme, multilokus dizi tiplendirme (Multilocus Sequence Typing: MLST) ile moleküler karakterizasyon 5 tipi ortaya çıkarmıştır. İzolatların hiçbirinin *PVL* geni ve eksfoliyatif toksin D geni içermediği görülmüştür.

Haveri ve ark. (2007), hem inek meme içi infeksiyonlara sebep olan *S. aureus*'daki virulans genlerin taranmasını hem de PFGE ve antimikrobiyal direnç ile klon tipi, infeksiyonun klinik tablosu, infeksiyon ısrarı ve genetik profili arasında bir ilişkinin olup olmadığını belirlemeyi amaçlamışlardır. 17 farklı PFGE tipi içeren *S. aureus* suşları geleneksel ve multipleks-PCR ile 24 virulans gen [hemoliz (*hla*, *hlg*), lökositin (*lukED*, *lukM*), eksfoliyatif toksinler (*eta*, *etb*), enterotoksinler (*sea*, *seo*, *seu*), toksik şok sendrom toksin (*tsst*), penisilini şifreleyen gen (*blaZ*) ve metisilin direnci (*mecA*)] için taranmıştır. Mastitisin etkeni olan *S. aureus* izolatlarının büyük çoğunluğunun hemoliz geni (%76,7-97,4) ve *LukED* (%96,6) genlerini taşıdıkları görülmüştür.

Haveri ve ark. (2008), inek meme içi infeksiyonlarında ve meme dışı bölgelerden toplanan *S. aureus* izolatlarını, meme içi infeksiyonun kaynağını araştırmak amacıyla analiz etmişlerdir. Seçtikleri izolatları hemoliz (*hla*, *hlg*), lökositin (*lukED* ve *lukM*), süperantijen (*sea*, *sec*, *sed*, *seg*, *seo*, *seu*, *tst*), adesinler (*fmbA* ve *fmbB*), penisilin ve metisilin direnci (*blaZ* ve *mecA*) kodlayan genleri için PFGE ve PCR aracılığı ile incelemişlerdir. PCR analizi sonucunda hemen hemen bütün suşların α , β , γ -hemoliz, *LukED*, *fmbA* genlerini taşıdığı gözlenmiştir. Meme içi infeksiyondan izole edilen *S. aureus* ile meme dışı etkenlerden izole edilen *S. aureus*'lar bu tekniklerle ayıramamıştır. *S. aureus* infeksiyonunun kaynağı bu meme dışı etkenler olduğu ve kontaminasyonun mümkün olduğu gösterilmiştir.

Moussa ve ark. (2008), insan kaynaklı 37 *S. aureus* izolatında 16S rRNA, *PVL* ve stafilokokkal kasette kromozom *mec* (*SCCmec*) tip IV gen bölgelerini multipleks PCR ile tanımlamayı amaçlamışlardır. Deri ve yumuşak doku infeksiyonlarından izole

edilen sadece 3 *S. aureus* suşu (%8,1) *PVL* ve *SCCmec* tip IV için pozitif değerlendirilmiştir.

Esan ve ark. (2009), Nijerya’da *S. aureus*’un epidemiyolojisini daha iyi anlamak, tedavi geliştirmek ve hastalıkları kontrol altına almak amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Güney-Batı Nijerya’da sağlıklı sağlık personelinin elde edilen klinik ve nazal örneklerden fenotipik yöntemlerle tanımlanan 54 *S. aureus* izolatının *PVL* pozitif olduğu görülmüştür.

İnek mastitisine sebep olan *S. aureus*’ların patojenitesi ve inek mastitisinde *S. aureus* virulans genlerinin varlığı yeterince anlaşılmıştır. Bu nedenle Ikawaty ve ark. (2010), Hollanda’da farklı genotipte klinik inek mastitis izolatlarının virulans faktör profillerini incelemişlerdir. Ulusal ve bölgesel suşları temsilen 2 kurumdan toplam 76 *S. aureus* izolatı 19 toksin geni, 12 adesin geni, 3 bağışıklık geni ve 6 diğer bazı genler PCR ile taranmıştır. İzolatların %20’sinde *LukE* geni saptanmıştır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Çalışma materyalini S.Ü. Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Emine Arslan tarafından tanımlanan Konya Bölgesi'ndeki mastitisli ineklerden izole edilen *S. aureus* izolatları oluşturmuştur.

3.1.1. Kimyasal maddeler ve besiyerleri

Fenol, kloroform, izoamil alkol gibi kimyasal maddeler Merck KGaA, 64271, Darmstadt, Almanya firmasından elde edilmiştir.

Agaroz, etidyum bromür, NaCl, izopropanol, glacial asetik asit gibi kimyasal maddeler ise Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 89552, Steinheim, Almanya firmasından sağlanmıştır.

Real-Time PCR uygulaması için Roche marka LightCycler 480 SYBR Green I Master mix kullanılmıştır.

Besiyeri olarak Nutrient Broth (NB) ve Triptik Soy Agar (TSA) Oxoid marka kullanılmıştır.

3.1.2. Tampon ve Çözeltiler

- TE tamponu : Tris 10mM, EDTA 1mM, pH=8
- Proteinaz K : 20mg/ml
- CTAB : %1
- SDS : %10
- NaCl : 5M
- Lizostafin : 2mg/ml
- Kloroform/İzoamil alkol : 24:1 oranında Kloroform/İzoamil alkol karıştırılarak hazırlanmıştır.
- Fenol/Kloroform : 25:24 oranında
- İzopropanol

3.2. Metod

3.2.1. Çalışmada kullanılan bakteri kültürleri

-80°C'de saklanan bakteri suşları Triptik Soy Agar (TSA) besiyerinde aktif hale getirilmiştir. Daha sonra DNA izolasyonları için Nutrient Broth (NB) sıvı besiyerine ekim yapılarak 37°C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. *γ-hemoliz* pozitif (NTCT 8325) ve negatif (ATCC 9114) kontrolü olan referans suşlar XX Aniversario de la fundación del Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA)'daki M.C. Martin tarafından sağlanmıştır. *LukED* ve *PVL* pozitif ve negatif kontrol suşları S.Ü. Selçuklu Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji kültür koleksiyonundan sağlanmıştır.

3.2.2. Bakteriden Genomik DNA izolasyonu

Bakteriden DNA izolasyonu Ausubel ve ark. (1991)'nın önerdiği metoda göre yapılmıştır. 2 ml'lik sıvı besiyerinde bakteri örnekleri üretilmiştir. 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek, pellet 200 µl TE tamponunda (pH:8.0) süspanse edilmiştir. 9 µl lizostafin (2mg/ml) solüsyonu süspansiyona ilave edilerek 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. 30 µl %10'luk SDS ve 3 µl proteinaz K (20mg/ml) ilave edilmiştir. Daha sonra 37°C'de 1 saat bakteri hücrelerinin parçalanması için inkübe edilmiştir. 1M NaCl içerisinde %1'lik CTAB çözeltisinden 80 µl ve 100 µl 5M NaCl çözeltisi ilave edilmiştir. 10 dakika 65°C'de inkübe ettikten sonra lizat kloroform ile ekstrakte edilmiş ve daha sonra fenol/kloroform ile ekstrakte edilmiştir. DNA 0,6 hacim izopropanol ile süpernatanttan presipite edilmiştir ve 50 µl steril distile su ile süspanse edilmiştir. DNA konsantrasyonu spektrofotometre ile belirlenmiştir.

3.2.3. PCR uygulaması

PCR uygulamaları için 10 µl çözelti hazırlanmıştır. Her bir reaksiyon karışımı için, 50 pikomol forward ve reverse primeri (çizelge 3.1), 10X PCR tamponu (50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH=9, %0,1 TritonX-100), 1 µl MgCl, 2,5mM dNTP ve 0,5U Taq polimeraz kullanılmıştır. Daha önceden bakteriden izole edilen genomik DNA'dan 1,5 µl karışıma eklenmiştir. Karışım hazırlandıktan sonra thermo-cycler cihazı ile her bir primerin Tm değeri göz önüne alınarak gen bölgeleri çoğaltılmıştır. Çoğaltım 30 döngüde

yapılmıştır ve thermo-cycler cihazı 95°C’de 3 dakika, 94°C’de 40 saniye, 59°C’de 45 saniye, 72°C’de 1 dakika’ya programlanmıştır. 72°C uzatma sıcaklığında 8 dakika basamağı da eklenerek ve hazırlanan tüpler thermo-cycler cihazına yerleştirilip çoğaltım yapılmıştır (Zecconi ve ark., 2006). PCR uygulamasında Real-Time PCR uygulamasında kullanılan primerler kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. PCR uygulamaları için kullanılan primerler

Gen Bölgesi	Dizi	Tm (°C)
<i>PVL</i>	Forward 5'-TTCATTTAGACGCAGCAGGA-3' (Zecconi ve ark., 2006)	58
	Reverse 5'-TTGAATAGCCGTCCTTAACG-3'	
<i>γ-hemoliz (Hlg)</i>	Forward 5'-GCCAATCCGTTATTAGAAAATGC -3' (Lina ve ark., 1999)	58
	Reverse 5'-CCATAGACGTAGCAACGGAT -3'	
<i>Luk ED</i>	Forward 5'-CAGAACTTCATTTTCGGATGTGAAGGG-3' (Yamada ve ark., 2005)	64,5
	Reverse 5'-CTCCAGGATTAGTTTCTTTAGAATCCG-3'	

3.2.4. Real-Time PCR uygulaması

Real-Time PCR uygulamaları için 15 µl çözelti hazırlanmıştır. Her bir reaksiyon karışımı için, forward ve reverse primerden 1 µl (çizelge 3.1), 10 µl Light Cycler 480 DNA Master SYBR Green I (Roche) ve daha önceden bakteriden izole ettiğimiz genomik DNA’dan 100 ng karışıma eklenmiştir. Karışım hazırlandıktan sonra Real-Time PCR, 95°C’ta 10 dakika, 35 döngü, 95°C’ta 10 saniye, 52°C’ta 15 saniye, 72°C’ta 18 saniye olarak programlanmıştır. Her bir gen bölgesi için Real-Time PCR uygulamasında kullanılan standart suşlar çizelge 3.2’de verilmiştir. Kullanılan 98 suşun konsantrasyonları okutularak 1 µl’inde 100 ng DNA olacak şekilde dilüe edilmiştir.

Çizelge 3.2. Real-Time PCR uygulamaları için kullanılan negatif ve pozitif suşlar

	<i>PVL</i>	<i>γ-hemoliz (Hlg)</i>	<i>Luk ED</i>
Negatif suş	<i>S. aureus</i> ATCC 2913	<i>S. aureus</i> ATCC 9114	<i>S. aureus</i> ATCC 49775
Pozitif suş	<i>S. aureus</i> ATCC 49775	<i>S. aureus</i> NTCT 8325	<i>S. aureus</i> ATCC 2913

3.2.5. *S. aureus* suşlarının PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

PCR ürünlerini değerlendirmek için %1,5'luk agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuştur (Maniatis ve ark., 1982). Agaroz jel için 4,5 gr agaroz tartılıp, 300 ml TAE tamponu içinde kaynatılmıştır. Kaynadıktan sonra 15 µl etidyum bromür eklenerek elektroforez kabına dökülmüş ve taraklar yerleştirilmiştir. Daha sonra soğumaya bırakılmıştır. Jel soğuduktan sonra PCR ürünleri kuyucuklara yüklenerek 100 voltta yürütülerek U.V. transilluminatorde görüntülenen fotoğraf bilgisayara aktarılmış.

3.2.6. Real-Time PCR ürünlerinin değerlendirilmesi

Real-Time PCR sonucunda elde edilen amplifikasyon eğrisine göre *S. aureus* suşlarında genlerin varlığı ve yokluğu belirlenmiştir. Bir virulans genin bir *S. aureus* suşunda kaç kopya halinde bulunduğu yani konsantrasyonu Real-Time PCR software'i kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2.7. İstatistiksel Analiz

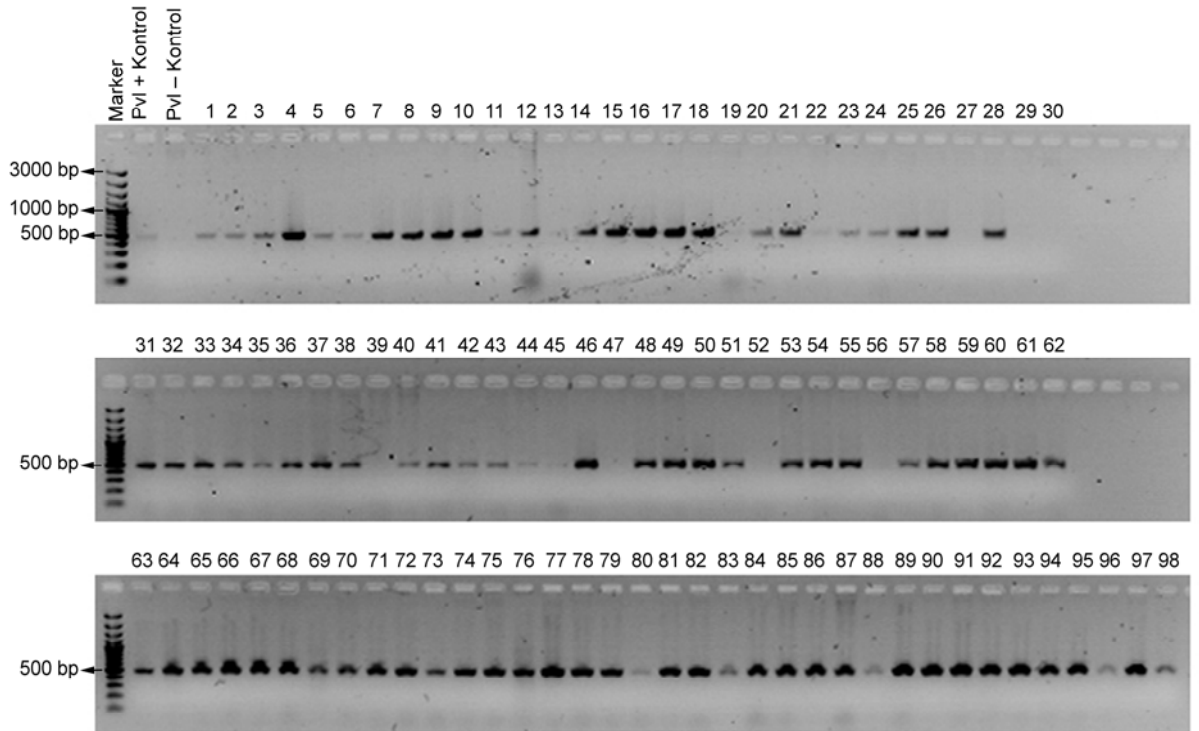
Çalışılan genlere ait her iki yöntemle de elde edilen sonuçlara Cohen Kappa (Uyumluluk) Analizi ve Khi-kare İstatistik programı uygulanmıştır.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

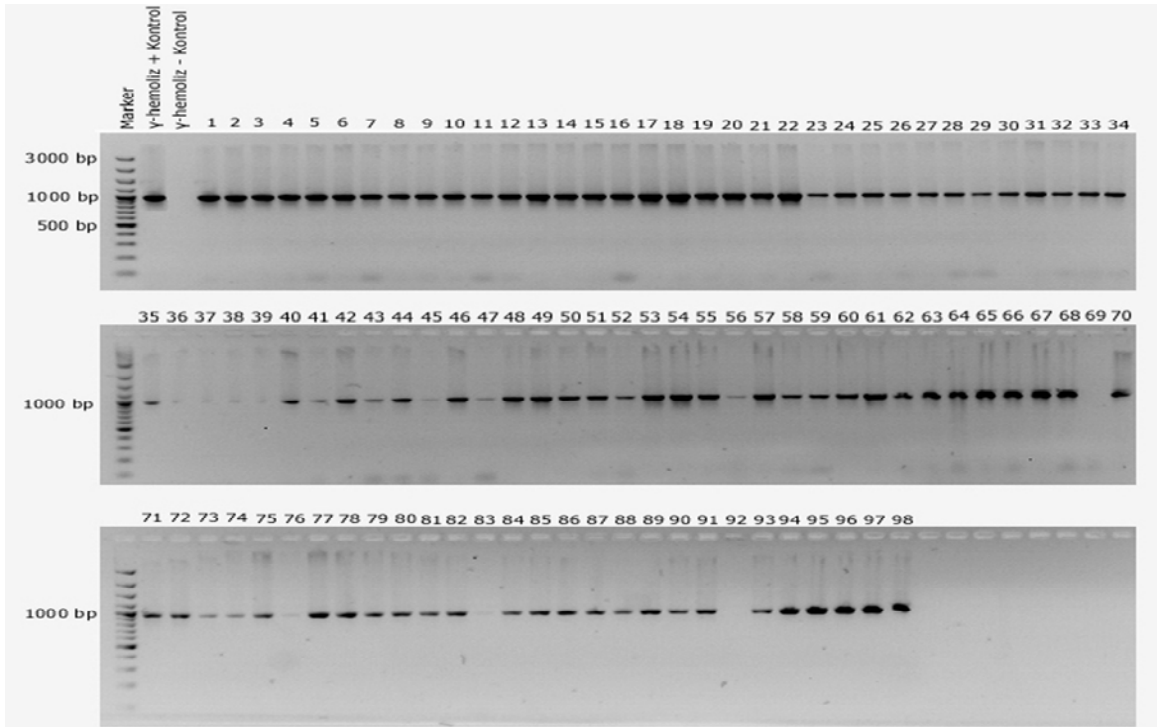
4.1. *S. aureus* suşlarında *PVL*, γ -hemoliz ve *LukED* genlerinin PCR Analizi

Sonuçları

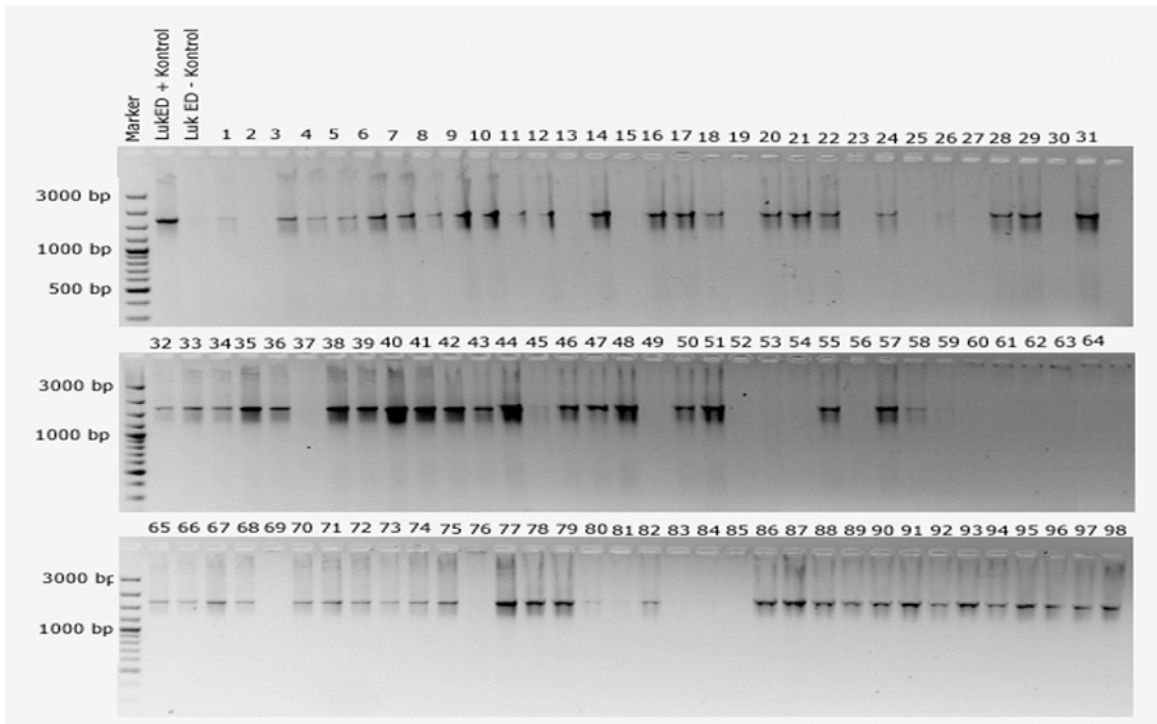
Çalışılan 98 *S. aureus* suşunun *PVL*, γ -hemoliz ve *LukED* gen bölgeleri birer çift primer aracılığıyla Nyxteknik marka gradient thermo-cycler'da çoğaltılmıştır. PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde etidium bromid ve DNA marker kullanılarak gözlenmiştir (Şekil 4.1, 4.2, 4.3). 98 *S. aureus* suşunun 91'i *PVL* pozitif (%92,85), 96'sı γ -hemoliz pozitif (%97,95) ve 74'ü de *LukED* pozitif (%75,51) bulunmuştur (Çizelge 4.1). Genler sırasıyla 465, 937 ve 1855 bp büyüklüğünde amplifikasyon ürünü vermiştir.



Şekil 4.1. *S. aureus* suşlarında *PVL* gen bölgesinin PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi



Şekil 4.2. *S. aureus* suşlarında γ -hemoliz gen bölgesinin PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi



Şekil 4.3. *S. aureus* suşlarında *LukED* gen bölgesinin PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Çizelge 4.1. *S. aureus* suşlarındaki virulans gen bölgelerinin PCR sonuçları

Suş numarası	<i>PVL</i> Gen Bölgesi amplifikasyonu	<i>γ-hemoliz</i> Gen Bölgesi amplifikasyonu	<i>LukED</i> Gen Bölgesi amplifikasyonu
1	+	+	+
2	+	+	-
3	+	+	+
4	+	+	+
5	+	+	+
6	+	+	+
7	+	+	+
8	+	+	+
9	+	+	+
10	+	+	+
11	+	+	+
12	+	+	+
13	+	+	-
14	+	+	+
15	+	+	-
16	+	+	+
17	+	+	+
18	+	+	+
19	+	+	-
20	+	+	+
21	+	+	+
22	+	+	+
23	+	+	-
24	+	+	+
25	+	+	-
26	+	+	+
27	-	+	-
28	+	+	+
29	-	+	+
30	-	+	-
31	+	+	+
32	+	+	+
33	+	+	+
34	+	+	+
35	+	+	+
36	+	+	+
37	+	+	-
38	+	+	+
39	-	+	+
40	+	+	+
41	+	+	+
42	+	+	+
43	+	+	+
44	+	+	+
45	+	+	+
46	+	+	+
47	-	+	+
48	+	+	+
49	+	+	-
50	+	+	+
51	+	+	+
52	-	+	-
53	+	+	-

Çizelge 4.1. *S. aureus* suşlarındaki virulans gen bölgelerinin PCR sonuçları

Suş numarası	<i>PVL</i> Gen Bölgesi amplifikasyonu	γ -hemoliz Gen Bölgesi amplifikasyonu	<i>LukED</i> Gen Bölgesi amplifikasyonu
54	+	+	-
55	+	+	+
56	-	+	-
57	+	+	+
58	+	+	+
59	+	+	+
60	+	+	-
61	+	+	-
62	+	+	-
63	+	+	-
64	+	+	-
65	+	+	+
66	+	+	+
67	+	+	+
68	+	+	+
69	+	-	-
70	+	+	+
71	+	+	+
72	+	+	+
73	+	+	+
74	+	+	+
75	+	+	+
76	+	+	-
77	+	+	+
78	+	+	+
79	+	+	+
80	+	+	+
81	+	+	+
82	+	+	+
83	+	+	-
84	+	+	-
85	+	+	-
86	+	+	+
87	+	+	+
88	+	+	+
89	+	+	+
90	+	+	+
91	+	+	+
92	+	-	+
93	+	+	+
94	+	+	+
95	+	+	+
96	+	+	+
97	+	+	+
98	+	+	+

4.2. Virulans Genlerin Real-Time PCR Sonuçları

4.2.1. *PVL* gen bölgesinin Real-Time PCR sonuçları

Bir çift primerle *PVL* gen bölgesi Real-Time PCR ile çoğaltılmıştır. Konsantrasyonlarına göre ayarlanmış olan 7 farklı standart (1/4, 1/16, 1/64, 1/256, 1/1024, 1/4096, 1/16384) aralığında var olan gen bölgesinin kantitatif değeri çizelge 4.2’de gösterilmiştir. En küçük standardın altında çıkan değerler negatif olarak kabul edilmiştir. Çizelge 4.2’de görünen CP değerleri (Cycle point) amplifiye edilen genin konsantrasyonuna bağlı olarak ilk kaçınıcı döngüde pik verdiğini gösterir. Çalışmamızda pozitif kontrol izolatları Real-Time PCR’da amplifikasyon ürünü verirken, negatif izolatlar amplifikasyon ürünü vermemiştir (Şekil 4.4). *PVL* pozitif standart amplifikasyon kontrolünün erime noktası (T_m) $78 \pm 2,5^\circ\text{C}$ ’ta ve 10. döngüde her koşulda gerçekleşmiştir. Şekil 4.5’de görüldüğü gibi *PVL* pozitif 69 suşun erime noktası $77,8 \pm 2,5^\circ\text{C}$ ’ta amplifiye edilmiştir. Bu sıcaklıklar bize bütün suşlarda *PVL* geninin doğru bir şekilde çoğaltıldığının göstergesidir. Tüm *S. aureus* suşlarının %70,40’ının *PVL* pozitif olduğu tespit edilmiştir.

PVL geninin klasik PCR’daki pozitifliği ile Real-Time PCR’daki pozitifliği arasındaki uyum belirlenmiş, $p=0,001$ ($p<0,05$) olduğundan dolayı iki yöntemle elde edilen sonuçların uyumlu olduğu istatistiki olarak söylenebilir. Kappa değeri=0,247 olarak bulunmuştur. Bu da zayıf düzeyde uyumluluk olduğunu göstermektedir. $p<0,05$ olan khi-kare değeri 1 serbestlik derecesinde anlamlıdır. Her iki metod arasında uyum vardır.

Real-Time PCR’a göre 15, 32, 43, 70, 78 ve 84 nolu suşlar en konsantre standart değerinin çok üzerinde yoğun miktarda gen kopyası varsa cihaz okuduğu normal kantitatif değerlerden farklı olarak köşeli parantez içinde bir değer vermektedir. Bu nedenle bu suş ve değerler çizelge 4.2’de yer almamıştır. Aynı şekilde 5, 28, 80, 88, 96 ve 98 nolu suşlar ise en düşük standart değerinin altında (4×10 IU/ml) bir değer verdiği için cihaz tarafından negatif olarak kabul edilmiştir. Bu suş numaraları ve negatif değerler de çizelge 4.2’de yer almamıştır. 40 IU/ml üzeri *PVL* gen miktarları pozitif olarak kabul edilmiştir.

Her suşa ait elde ettiğimiz *PVL* virulans geninin kantitatif değerlerini $40 < -10.000$, $10.000-100.000$ ve $100.000 < \text{IU/ml}$ şeklinde 3 gruba ayırarak değerlendirilmiştir. $40 < -10.000$ IU/ml aralığında sonuç veren suşların *PVL* gen miktarı

%27,55, 10.000-100.000 IU/ml aralığında sonuç veren suşların *PVL* gen miktarı %9,18 ve 100.000< IU/ml aralığında sonuç veren suşların *PVL* gen miktarı ise %32,65 olarak hesaplanmıştır. Çoğu *S. aureus* suşunda 100.000< IU/ml aralığında gen kopya sayısı yani gen miktarının oldukça fazla olduğu gözlenmiştir. Virus kopya sayısı arttıkça bakterinin patojenitesi artacağı için bu genin virulans etkisi yüksek olacaktır.

Çizelge 4.2. *S. aureus* PVL gen bölgesi Real-Time PCR sonuçları

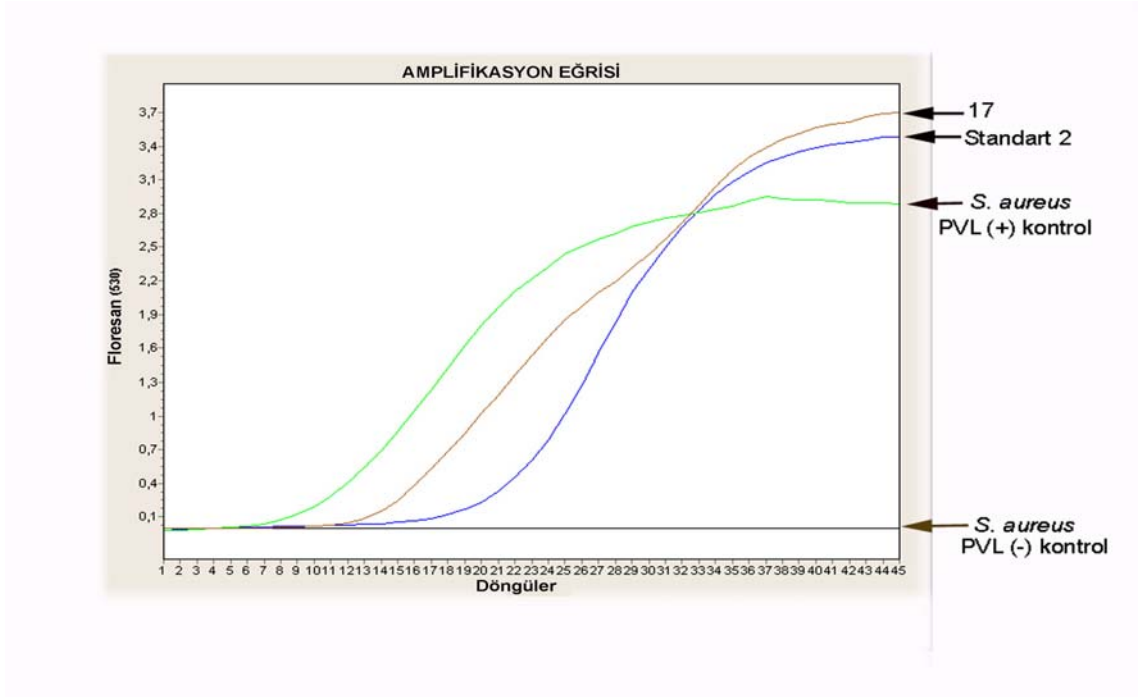
ÖRNEK NUMARASI	KANTİTATİF DEĞER (IU/ml)	POZİTİF/NEGATİF	MELTING (T _m) (±2.5)	CP DEĞERLERİ
1		-		
2		-		
3		-		
4	1,26x10 ⁷	+	77,76	12
5		-		
6	1,39x10 ²	+	78,15	20
7	1,30x10 ⁶	+	78,14	15
8	3,52x10 ⁶	+	77,65	13
9	1,36x10 ⁷	+	78,12	11
10	7,98x10 ¹	+	78,08	30
11		-		
12	1,25x10 ⁵	+	77,68	18
13		-		
14		-		
15		-		
16	4,51x10 ⁶	+	77,95	13
17	5,48x10 ⁶	+	77,76	13
18		-		
19	1,07x10 ²	+	78,98	21
20	1,32x10 ⁷	+	78,86	11
21	4,81x10 ³	+	77,58	23
22		-		
23		-		
24	4,25x10 ¹	+	78,11	31
25	1,31x10 ⁵	-		
26	2,73x10 ³	+	77,91	23
27		-		
28		-		
29		-		
30		-		
31	2,82x10 ¹³	+	77,69	13
32		-		
33	1,92x10 ¹³	+	77,91	15
34	9,68x10 ¹¹	+	78,09	19
35	4,31x10 ⁹	+	78,11	26
36	4,64x10 ¹³	+	77,69	14
37	2,82x10 ¹³	+	77,61	14
38	7,24x10 ⁸	+	78,24	28
39		-		
40	1,76x10 ⁹	+	78,07	27
41	1,60x10 ³	+	78,05	37
42	4,647x10 ⁶	+	77,91	32
43		-		
44	6,79x10 ⁷	+	77,95	30
45	2,25x10 ²	+	77,65	20
46		-		
47		-		

Çizelge 4.2. *S. aureus* PVL gen bölgesi Real-Time PCR sonuçları

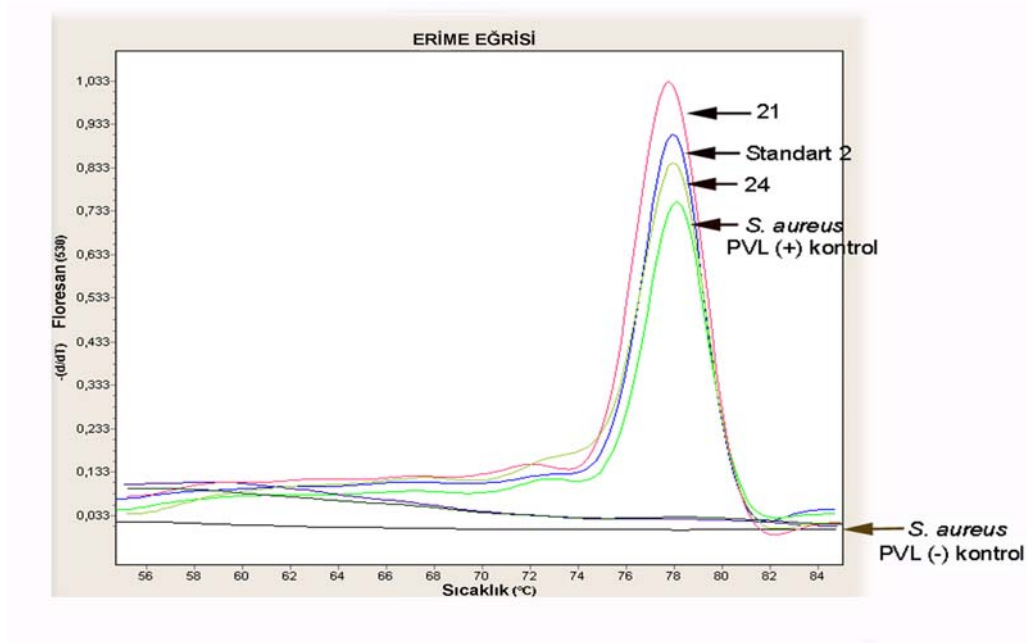
ÖRNEK NUMARASI	KANTİTATİF DEĞER (IU/ml)	POZİTİF/NEGATİF	MELTING (T _m) (±2.5)	CP DEĞERLERİ
48	1,85x10 ¹⁴	+	77,75	12
49	1,53x10 ¹⁴	+	77,82	12
50	2,54x10 ⁴	+	77,60	35
51	5,21x10 ¹²	+	78,11	17
52		-		
53	3,42x10 ¹³	+	78,13	14
54	1,06x10 ¹³	+	77,74	16
55	4,39x10 ¹¹	+	77,59	20
56		-		
57	5,36x10 ⁹	+	78,06	26
58	2,57x10 ²	+	78,18	20
59	1,33x10 ²	+	78,17	20
60	3,63x10 ²	+	78,45	19
61	1,07x10 ⁵	+	78,13	11
62	1,47x10 ²	+	78,14	20
63	1,70x10 ⁴	+	78,08	13
64	2,21x10 ⁴	+	78,20	13
65	4,51x10 ⁴	+	78,28	12
66	7,21x10 ¹	+	78,28	29
67	1,10x10 ⁵	+	78,12	11
68	1,43x10 ²	+	78,01	20
69	7,93x10 ³	+	78,31	14
70		-		
71	1,53x10 ¹⁴	+	77,38	17
72	1,25x10 ⁴	+	77,99	14
73	3,30x10 ⁵	+	78,15	34
74	2,48x10 ⁴	+	77,91	13
75	8,42x10 ⁴	+	77,70	11
76	7,28x10 ³	+	77,81	14
77	2,01x10 ⁵	+	78,23	10
78		-		
79	4,78x10 ⁴	+	77,50	15
80		-		
81	6,67x10 ¹	+	78,24	27
82	2,93x10 ³	+	78,12	16
83	2,75x10 ²	+	78,18	19
84		-		
85	3,08x10 ⁵	+	77,70	11
86	2,97x10 ³	+	77,82	15
87	5,99x10 ²	+	77,18	20
88		-		
89	3,34x10 ³	+	77,81	15
90	7,51x10 ³	+	77,85	13

Çizelge 4.2. *S. aureus* PVL gen bölgesi Real-Time PCR sonuçları

ÖRNEK NUMARASI	KANTİTATİF DEĞER (IU/ml)	POZİTİF/NEGATİF	MELTING (Tm) (±2.5)	CP DEĞERLERİ
91	1,22x10 ⁴	+	77,62	13
92	2,05x10 ²	+	77,57	20
93	5,01x10 ²	+	77,52	17
94	3,27x10 ³	+	77,79	15
95	1,79x10 ⁴	+	77,63	12
96		-		
97	2,05x10 ²	+	77,89	20
98		-		



Şekil 4.4. *S. aureus* suşlarının PVL gen bölgesinin Real-Time PCR ürünlerinin amplifikasyon eğrisi



Şekil 4.5. *S. aureus* suşlarının PVL gen bölgesinin Real-Time PCR ürünlerinin erime sıcaklıkları

4.2.2. γ - Hemoliz gen bölgesinin Real-Time PCR sonuçları

Bir çift primerle γ -hemoliz gen bölgesi Real-Time PCR ile çoğaltılmıştır. Konsantrasyonlarına göre ayarlanmış olan 7 farklı standart (1/4, 1/16, 1/64, 1/256, 1/1024, 1/4096, 1/16384) aralığında var olan gen bölgesinin kantitatif değeri çizelge 4.3’de gösterilmiştir. En küçük standardın altında çıkan değerler negatif olarak kabul edilmiştir. Çalışmamızda pozitif kontrol izolatları Real-Time PCR’da amplifikasyon ürünü verirken, negatif izolatlar amplifikasyon ürünü vermemiştir (Şekil 4.6). γ -hemoliz pozitif standart amplifikasyon kontrolünün erime noktası (T_m) $74,9 \pm 2,5^\circ\text{C}$ ’ta ve 27. döngüde her koşulda gerçekleşmiştir. Şekil 4.7’de görüldüğü gibi γ -hemoliz pozitif 89 suşun erime noktası $73,8 \pm 2,5^\circ\text{C}$ ’ta amplifiye edilmiştir. Bu sıcaklıklar bize bütün suşlarda γ -hemoliz geninin doğru bir şekilde çoğaltıldığının göstergesidir. Tüm *S. aureus* suşlarının %90,81’inin γ -hemoliz pozitif olduğu tespit edilmiştir.

γ -hemoliz geninin klasik PCR’daki pozitifliği ile Real-Time PCR’daki pozitifliği arasındaki uyum belirlenmiş, $p=0,000$ ($p<0,05$) olduğundan dolayı iki yöntemle elde edilen sonuçların uyumlu olduğu istatistik olarak söylenebilir. Kappa değeri=0,426 olarak bulunmuştur. Bu da orta düzeyde uyumluluk olduğunu göstermektedir. $p<0,05$ olan khi-kare değeri 1 serbestlik derecesinde anlamlıdır. Her iki metod arasında uyum vardır.

Real-Time PCR’a göre 36, 37, 38, 39, 45, 76 ve 83 nolu suşlar en düşük standart değerinin altında ($4,21 \times 10$ IU/ml) bir değer verdiği için cihaz tarafından negatif olarak kabul edilmiştir. Bu suş numaraları ve negatif değerler çizelge 4.3’de yer almamıştır. 40 IU/ml üzeri γ -hemoliz gen miktarları pozitif olarak kabul edilmiştir.

Her suşa ait elde ettiğimiz γ -hemoliz virulans geninin kantitatif değerlerini $40 < -10.000$, $10.000-100.000$ ve $100.000 < \text{IU/ml}$ şeklinde 3 gruba ayırarak değerlendirilmiştir. $40 < -10.000$ IU/ml aralığında sonuç veren suşların γ -hemoliz gen miktarı %48,97, $10.000-100.000$ IU/ml aralığında sonuç veren suşların γ -hemoliz gen miktarı %39,79 ve $100.000 < \text{IU/ml}$ aralığında sonuç veren suşların γ -hemoliz gen miktarı ise %2,04 olarak hesaplanmıştır. Çoğu *S. aureus* suşunun $40 < -10.000$ IU/ml aralığındaki gen kopya sayısına sahip olduğu görülmüştür. Çok az bakteri örneği (%2,04) γ -hemoliz geninin çok fazla kopyasını içermiştir. Bu da görülme sıklığı fazla olan genin virulans etkisinin az olduğunu göstermiştir.

Çizelge 4.3. *S. aureus* γ -hemoliz gen bölgesi Real-Time PCR sonuçları

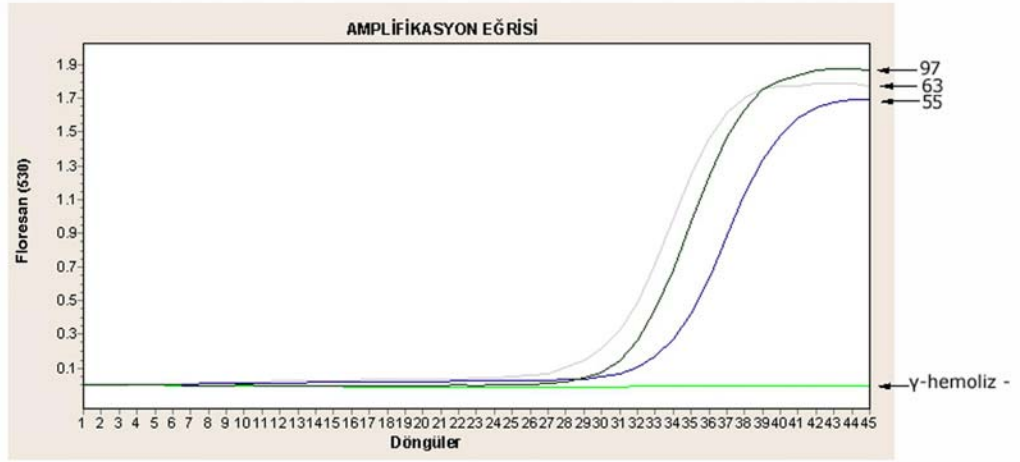
ÖRNEK NUMARASI	KANTİTATİF DEĞER (IU/ml)	POZİTİF/NEGATİF	MELTING (Tm) (± 2.5)	CP DEĞERLERİ
1	$3,36 \times 10^4$	+	74,18	24
2	$4,26 \times 10^2$	+	73,51	30
3	$2,63 \times 10^3$	+	74,15	27
4	$1,47 \times 10^5$	+	72,59	20
5	$1,64 \times 10^4$	+	75,10	24
6	$2,13 \times 10^5$	+	73,12	20
7	$2,46 \times 10^3$	+	73,09	27
8	$4,70 \times 10^3$	+	74,12	26
9	$2,23 \times 10^3$	+	73,64	27
10	$2,11 \times 10^3$	+	74,10	27
11	$1,60 \times 10^3$	+	73,15	27
12	$2,46 \times 10^3$	+	73,31	27
13	$2,89 \times 10^3$	+	74,14	27
14	$3,58 \times 10^3$	+	74,34	27
15	$7,49 \times 10^3$	+	72,78	26
16	$3,26 \times 10^3$	+	72,89	27
17	$3,23 \times 10^3$	+	74,35	27
18	$1,36 \times 10^4$	+	74,16	24
19	$3,12 \times 10^2$	+	73,09	30
20	$1,92 \times 10^3$	+	73,18	27
21	$1,67 \times 10^4$	+	74,17	24
22	$7,92 \times 10^3$	+	74,19	26
23	$4,07 \times 10^3$	+	74,23	27
24	$3,12 \times 10^2$	+	73,12	30
25	$1,68 \times 10^4$	+	75,10	24
26	$5,10 \times 10^3$	+	75,01	27
27	$6,76 \times 10^2$	+	73,70	29
28	$1,65 \times 10^4$	+	73,19	24
29	$7,77 \times 10^2$	+	74,25	29
30	$1,84 \times 10^3$	+	73,65	27
31	$5,10 \times 10^3$	+	73,12	26
32	$6,93 \times 10^3$	+	75,08	26
33	$4,36 \times 10^4$	+	74,05	24
34	$1,64 \times 10^4$	+	73,68	24
35	$2,63 \times 10^4$	+	74,07	24
36		-		
37		-		
38		-		
39		-		
40	$3,64 \times 10^4$	+	74,13	24
41	$1,78 \times 10^4$	+	73,98	24

Çizelge 4.3. *S. aureus* γ -hemoliz gen bölgesi Real-Time PCR sonuçları

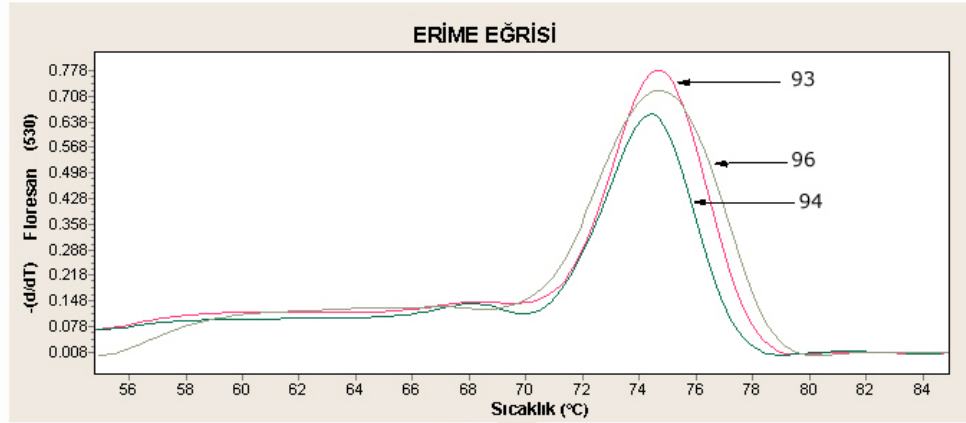
ÖRNEK NUMARASI	KANTİTATİF DEĞER (IU/ml)	POZİTİF/NEGATİF	MELTING (T _m) (±2.5)	CP DEĞERLERİ
42	1,89x10 ³	+	73,75	27
43	4,64x10 ²	+	73,82	30
44	3,64x10 ³	+	73,60	27
45		-		
46	3,42x10 ⁴	+	73,10	24
47	5,64x10 ²	+	75,13	30
48	1,16x10 ³	+	73,74	27
49	2,64x10 ⁴	+	74,59	24
50	3,52x10 ²	+	73,17	30
51	2,97x10 ²	+	75,06	30
52	3,24 x10 ²	+	75,03	30
53	3,64x10 ²	+	74,17	30
54	1,69x10 ⁴	+	73,45	24
55	4,85x10 ³	+	74,13	27
56	1,92x10 ⁴	+	73,14	24
57	4,14x10 ¹	+	75,08	32
58	2,65x10 ⁴	+	74,20	24
59	1,27x10 ⁴	+	74,28	24
60	3,64x10 ⁴	+	73,28	24
61	2,41x10 ⁴	+	74,12	24
62	2,93x10 ⁴	+	75,01	24
63	2,80x10 ⁴	+	74,31	24
64	2,70x10 ²	+	73,12	30
65	5,47x10 ⁴	+	73,38	24
66	4,35x10 ⁴	+	73,99	24
67	7,53x10 ⁴	+	74,15	23
68	3,56x10 ⁴	+	73,91	24
69		-		
70	5,07x10 ³	+	73,81	26
71	2,67x10 ⁴	+	73,23	24
72	4,63x10 ³	+	73,92	27
73	1,76x10 ⁴	+	73,50	24
74	1,64x10 ⁴	+	73,16	24
75	6,07x10 ³	+	74,24	26
76		-		
77	4,61x10 ⁴	+	73,18	24
78	1,01x10 ⁴	+	73,70	24
79	4,13x10 ⁴	+	73,82	24
80	3,10x10 ⁴	+	74,18	24
81	1,84x10 ⁴	+	74,04	24
82	2,36x10 ⁴	+	73,81	24
83		-		
84	8,09x10 ⁴	+	73,85	24
85	3,28x10 ³	+	73,75	27

Çizelge 4.3. *S. aureus* γ -hemoliz gen bölgesi Real-Time PCR sonuçları

ÖRNEK NUMARASI	KANTİTATİF DEĞER (IU/ml)	POZİTİF/NEGATİF	MELTING (T _m) (±2.5)	CP DEĞERLERİ
86	3,08x10 ⁴	+	73,17	24
87	5,20x10 ³	+	73,18	26
88	2,44x10 ⁴	+	73,56	24
89	2,71x10 ⁴	+	73,72	24
90	9,28x10 ³	+	74,18	26
91	2,99x10 ³	+	74,07	27
92		-		
93	6,13x10 ³	+	74,82	26
94	1,26x10 ⁴	+	74,10	24
95	5,96x10 ³	+	73,72	26
96	1,59x10 ²	+	75,05	30
97	2,86x10 ³	+	73,20	27
98	2,49x10 ³	+	73,65	27



Şekil 4.6. *S. aureus* suşlarının γ -hemoliz gen bölgesinin Real-Time PCR ürünlerinin amplifikasyon eğrisi



Şekil 4.7. *S. aureus* suşlarının γ -hemoliz gen bölgesinin Real-Time PCR ürünlerinin erime sıcaklıkları

4.2.3. *LukED* gen bölgesinin Real-Time PCR sonuçları

Bir çift primerle *LukED* gen bölgesi Real-Time PCR ile çoğaltılmıştır. Konsantrasyonlarına göre ayarlanmış olan 7 farklı standart (1/4, 1/16, 1/64, 1/256, 1/1024, 1/4096, 1/16384) aralığında var olan gen bölgesinin kantitatif değeri çizelge 4.4’de gösterilmiştir. En küçük standardın altında çıkan değerler negatif olarak kabul edilmiştir. Çalışmamızda pozitif kontrol izolatları Real-Time PCR’da amplifikasyon ürünü verirken, negatif izolatlar amplifikasyon ürünü vermemiştir (Şekil 4.8). *LukED* pozitif standart amplifikasyon kontrolünün erime noktası (T_m) $76,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$ ’ta ve 25 döngüde her koşulda gerçekleşmiştir. Şekil 4.9’da görüldüğü gibi *LukED* pozitif 65 suşun erime noktası $75,8 \pm 2,5^\circ\text{C}$ ’ta amplifiye edilmiştir. Bu sıcaklıklar bize bütün suşlarda *LukED* geninin doğru bir şekilde çoğaltıldığının göstergesidir. Tüm *S. aureus* suşlarının %66,32’sinin *LukED* pozitif olduğu tespit edilmiştir.

LukED geninin klasik PCR’daki pozitifliği ile Real-Time PCR’daki pozitifliği arasındaki uyum belirlenmiş, $p=0,000$ ($p<0,05$) olduğundan dolayı iki yöntemle elde edilen sonuçların uyumlu olduğu istatistiki olarak söylenebilir. Kappa değeri=0,717 olarak bulunmuştur. Bu da iyi (yeterli) düzeyde uyumluluk olduğunu göstermektedir. $p<0,05$ olan khi-kare değeri 1 serbestlik derecesinde anlamlıdır. Her iki metod arasında uyum vardır.

Real-Time PCR’a göre 1, 26, 29, 45, 59, 80, 81 ve 82 nolu suşlar en düşük standart değerinin altında ($4,05 \times 10$ IU/ml) bir değer verdiği için cihaz tarafından negatif olarak kabul edilmiştir. Bu suş numaraları ve negatif değerler çizelge 4.4’de yer almamıştır. 40 IU/ml üzeri *LukED* gen miktarları pozitif olarak kabul edilmiştir.

Her suşa ait elde ettiğimiz *LukED* virulans geninin kantitatif değerlerini $40 < -10.000$, $10.000-100.000$ ve $100.000 < \text{IU/ml}$ şeklinde 3 gruba ayırarak değerlendirilmiştir. $40 < -10.000$ IU/ml aralığında sonuç veren suşların *LukED* gen miktarı %45,91, $10.000-100.000$ IU/ml aralığında sonuç veren suşların *LukED* gen miktarı %14,28 ve $100.000 < \text{IU/ml}$ aralığında sonuç veren suşların *LukED* gen miktarı ise %6,12 olarak hesaplanmıştır. Çoğu *S. aureus* suşunun $40 < -10.000$ IU/ml aralığındaki gen kopya sayısına sahip olduğu görülmüştür. Çok az bakteri örneği (%6,12) *LukED* geninin çok fazla kopyasını içermiştir. Prevelansı %66,32 olan genin virulans etkisinin az olduğunu göstermiştir.

Çizelge 4.4. *S. aureus* LukED gen bölgesi Real-Time PCR sonuçları

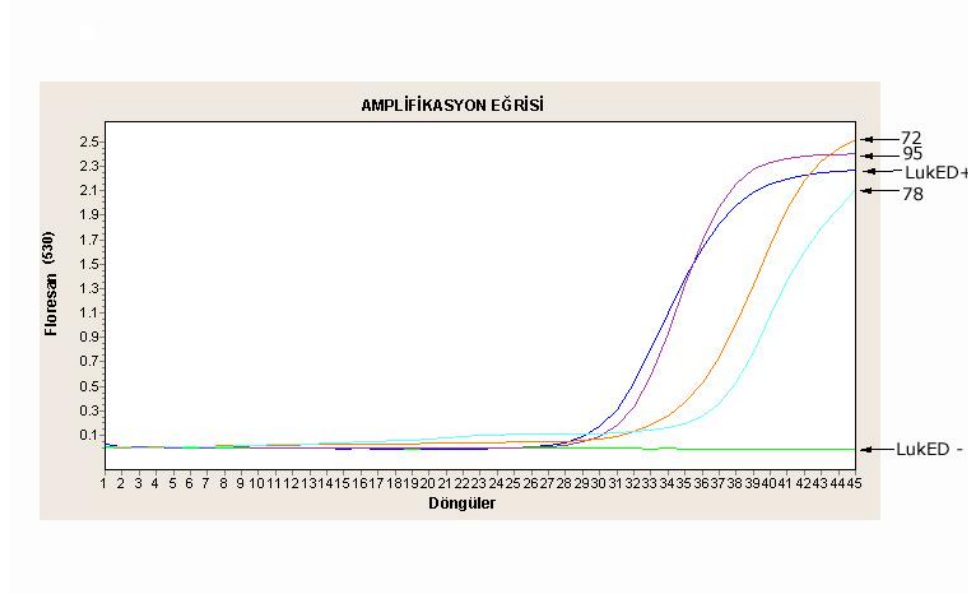
ÖRNEK NUMARASI	KANTİTATİF DEĞER (IU/ml)	POZİTİF/NEGATİF	MELTING (T _m) (±2.5)	CP DEĞERLERİ
1		-		
2		-		
3	1,74x10 ⁴	+	74,60	26
4	2,00x10 ⁴	+	75,11	26
5	6,22x10 ³	+	74,10	27
6		-		
7	1,64x10 ⁴	+	74,30	26
8	1,06x10 ⁴	+	74,59	26
9	7,40 x10 ³	+	74,55	27
10	1,39x10 ³	+	75,07	28
11	1,64x10 ⁴	+	74,19	26
12	1,64 x10 ³	+	74,20	28
13		-		
14	1,19x10 ⁶	+	75,13	24
15		-		
16	1,64x10 ⁴	+	75,08	26
17	2,71x10 ⁶	+	75,20	24
18	2,91x10 ⁶	+	74,29	24
19		-		
20	5,56x10 ³	+	74,12	27
21	6,10x10 ⁴	+	75,02	26
22	1,84x10 ²	+	74,31	30
23		-		
24	7,23x10 ²	+	73,38	29
25		-		
26		-		
27		-		
28	3,38x10 ²	+	74,16	30
29		-		
30		-		
31	1,64x10 ⁴	+	74,91	26
32	4,07x10	+	74,50	33
33	6,27x10 ²	+	74,18	29
34	2,44 x10 ²	+	74,21	34
35	1,39x10 ²	+	74,12	30
36	1,42x10 ²	+	76,01	30
37		-		
38	1,64x10 ⁴	+	74,81	26
39	1,54x10 ³	+	74,15	28
40	4,27x10 ¹	+	74,06	32
41	4,24x10 ¹	+	74,02	32
42	3,21x10 ⁴	+	74,75	29
43	1,92x10 ²	+	74,35	30

Çizelge 4.4. *S. aureus* LukED gen bölgesi Real-Time PCR sonuçları

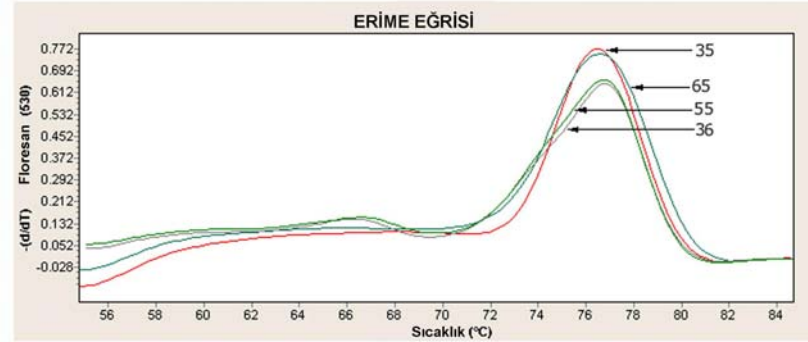
ÖRNEK NUMARASI	KANTİTATİF DEĞER (IU/ml)	POZİTİF/NEGATİF	MELTING (T _m) (±2.5)	CP DEĞERLERİ
44	8,05 x10 ³	+	75,19	27
45		-		
46	3,40x10 ³	+	75,10	28
47	1,94x10 ³	+	75,13	28
48	4,74x10 ³	+	74,75	28
49		-		
50	3,12 x10 ²	+	74,77	30
51	3,21x10 ⁵	+	75,06	25
52		-		
53		-		
54		-		
55	1,94x10 ²	+	76,08	30
56		-		
57	7,58x10 ³	+	75,07	27
58	6,35 x10 ⁴	+	74,60	26
59		-		
60		-		
61		-		
62		-		
63		-		
64		-		
65	8,59x10 ¹	+	76,03	31
66	7,22x10 ³	+	74,99	27
67	6,45 x10 ²	+	74,93	29
68	1,64x10 ⁴	+	74,91	26
69		-		
70	3,75x10 ⁴	+	74,81	26
71	1,01x10 ³	+	74,12	28
72	1,87x10 ²	+	74,92	30
73	3,22x10 ²	+	74,50	30
74	4,25x10 ²	+	74,21	30
75	3,18x10 ²	+	74,24	30
76		-		
77	1,51x10 ³	+	75,18	31
78	2,94x10 ²	+	74,70	30
79	5,69 x10	+	74,13	33
80		-		
81		-		
82		-		
83		-		
84		-		
85		-		

Çizelge 4.4. *S. aureus* LukED gen bölgesi Real-Time PCR sonuçları

ÖRNEK NUMARASI	KANTİTATİF DEĞER (IU/ml)	POZİTİF/NEGATİF	MELTING (T _m) (±2.5)	CP DEĞERLERİ
86	5,42x10 ²	+	74,65	29
87	4,97 x10 ¹	+	74,53	31
88	1,04x10 ⁶	+	74,50	24
89	6,57x10 ²	+	75,11	29
90	2,64x10 ⁵	+	75,10	25
91	4,80 x10 ¹	+	74,50	31
92	1,13x10 ³	+	74,64	28
93	2,19x10 ²	+	74,49	30
94	4,45x10 ³	+	74,17	28
95	3,35x10 ⁴	+	75,09	26
96	4,06x10 ¹	+	75,18	31
97	6,68 x10 ²	+	75,14	29
98	2,13x10 ³	+	74,45	28



Şekil 4.8. *S. aureus* suşlarının *LukED* gen bölgesinin Real-Time PCR ürünlerinin amplifikasyon eğrisi



Şekil 4.9. *S. aureus* suşlarının *LukED* gen bölgesinin Real-Time PCR ürünlerinin erime sıcaklıkları

S. aureus'lardaki *PVL*, γ -hemoliz, *LukED* genlerinin varlığı Real-Time PCR ve klasik PCR'da farklı oranlarda sonuç vermiştir. Klasik PCR'da sırasıyla %92,85, %97,95, %75,51 oranlarında pozitif olan *PVL*, γ -hemoliz, *LukED* genleri Real-Time PCR'da %70,40, %90,81, %66,32 olarak bulunmuştur. Bu da kullanılan en düşük standart konsantrasyonunun (1/16384) altındaki *PVL* gen kopyalarını negatif olarak değerlendirmesinden dolayı Real-Time PCR'da gen pozitiflik oranı düşük çıkmıştır. Bir başka deyişle Real-Time PCR'da gen belirli bir kopya sayısına geldiğinde ilk piki verdiği için bu kopya sayısından daha az sayıdaki gen kopyası negatif kabul edilmektedir. Aynı zamanda bazı suşlarda gen kopyasının yoğun olarak bulunduğu durumlarda cihaz normal okuduğu kantitatif değerlerden farklı olarak köşeli parantez içinde bir değer vermektedir. Dolayısıyla negatif okunan değerlerle bu değerler yukardaki % oranlarına yansıtılmamıştır. Bu nedenle klasik PCR'a göre Real-Time PCR pozitiflik oranları düşük çıkmıştır. Fakat buna rağmen istatistik analizine göre uyumlu sonuçlar elde edilmiştir ($p < 0,05$). 40 IU/ml miktarından fazla olanları pozitif olarak kabul ettiğimiz bu çalışmada bu değer altındaki gen kopyalarını içeren suşları da pozitif olarak değerlendirirsek Real-Time PCR sonucu ile klasik PCR sonucu, γ -hemoliz ve *LukED* de tamamen örtüşmekteyken *PVL*'de oldukça yaklaşmaktadır.

S. aureus'un insan ve hayvanlarda çok ciddi hastalıklara sebep olduğu ve bulaşıcı inek mastitislerin en yaygın etkeni olduğu belirtilmiştir. Mastitisli ineklerdeki *S. aureus*'un genetik karakterizasyonunun klonal tip ile varsayılan virulans faktörleri arasında bir ilişkinin olduğunu ortaya çıkarmıştır (Fitzgerald ve ark. 2000). Bakterinin çeşitli virulans faktör içerdiği ve bu virulans faktörlerin kombinasyonunun değerlendirilmesinin önemi son yıllarda vurgulanmıştır (Zecconi ve ark., 2006).

Johnsson ve ark. (2004) Real-Time PCR SYBR Green metodu ile insan kaynaklı *S. aureus*'larda *PVL* pozitif suşları sadece %0-2 oranlarında gözlemlemiştir. Bu çalışmanın sonuçları diğer bazı insan kaynaklı araştırmalarla (%0-4 oranlarında) uyumlu bulunmuştur (Prévost ve ark. 1995b; Narita ve ark. 2001; Melles ve ark. 2006). Bu çalışmalarında sonucunda *PVL*'nin düşük prevelansa sahip olduğu rapor edilmiştir. Rainard ve ark. (2003), hayvan kaynaklı *S. aureus*'larda klasik PCR ile *PVL* taramasında bütün suşların *PVL* için negatif olduğu gözlenmiştir. Ancak Dufour ve ark. (2002) %21, Melles ve ark. (2004) %38 ve Lina ve ark. (1999) %37,20 oranları ile *PVL*'nin yüksek prevelansa sahip olduğunu savunmuşlardır. Prévost ve ark. (1995a) synergohimenotropik toksinleri üreten insan kaynaklı *S. aureus* suşları üzerine yaptıkları bir çalışmada hastanelerden izole ettikleri *S. aureus* suşlarının %52'den daha

az kısmının *PVL* ürettiği gözlenmiştir. Bu araştırmaların *PVL* pozitif oranlarının tersine bazı araştırmacılar %100'e yakın oranlarda *PVL* pozitif bulmuşlardır. Örneğin bizim sonuçlarımızla uyumlu olarak (%92,85) Coppie ve ark. (1994)'nın yaptıkları çalışma sonucuna göre ise çıban gibi nekrotik infeksiyonlarda *PVL* geninin %93 oranında bulunduğunu tespit edilmiştir.

Fueyo ve ark. (2005), subklinik mastitisli ineklerin sütlerinden elde ettikleri *S. aureus* suşlarını bazı genler bakımından klasik ve multipleks PCR ile test etmişler ve izolatların hiçbirinde γ -hemoliz genine rastlamamışlardır. Bunun aksine Haveri ve ark. (2007)'nin mastitisli *S. aureus* suşları üzerine yaptığı bir çalışmada suşların büyük çoğunluğunun γ -hemoliz %88,8 geni taşıdığı görülmüştür. Yamada ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada hem kuş ve domuza ait *S. aureus* izolatlarını hemde iki farklı bölgedeki ineklerden izole edilen *S. aureus* izolatlarında taramışlardır. Kuş ve domuzdan izole edilen *S. aureus*'ların tamamında γ -hemoliz genine rastlamışlardır. İki farklı bölgedeki ineklerden izole edilen *S. aureus* izolatlarında ise %98,1 ve %98,5 oranlarıyla γ -hemoliz genini tespit etmişlerdir. Bazı araştırmalarda ise mastitisli ineklerden izole edilen *S. aureus* izolatlarının tamamının γ -hemoliz içerdiği rapor edilmiştir (Fitzgerald ve ark. 2000; Rainard ve ark. 2003). γ -hemoliz geninin yüksek bir prevalansa sahip olduğu savunulan bu çalışmaları bizim sonuçlarımız %97,95 oranıyla desteklemektedir.

LukED geninin kuş domuz ve iki farklı bölgedeki ineklerden izole edilen *S. aureus* suşlarının klasik PCR ile tarama sonuçlarına göre kuşlar ve ineklerde izole edilen *S. aureus*'ların sırasıyla %91,7 ve %95,95 gibi yüksek oranlarda *LukED* genini taşıdıkları belirlenirken domuzların hiçbirinde bu gene rastlanmamıştır (Yamada ve ark. 2005). Haveri ve ark. (2007) bu çalışmaları %96,6 oranıyla *LukED* genini pozitif bularak desteklemişler. Yine aynı şekilde bir başka çalışmada mastitisli inek kaynaklı *S. aureus* izolatlarının tümünde *LukED* geninin bulunduğunu rapor etmişlerdir (Rainard ve ark. 2003). Bu çalışmadaki klasik PCR ile %75,51 oranıyla *LukED*'nin varlığı uyumlu çıkmıştır. Bütün bu çalışmaların aksine Ikawaty ve ark. (2010) *S. aureus* suşlarının sadece %20'sinde *LukE* genine rastlamışlardır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

S. aureus, bütün dünyada süt endüstrisinde önemli ekonomik kayıplardan sorumlu olan inek mastitisinin önemli sebeplerindendir. Çoğu virulans faktörlerin *S. aureus* ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Fitzgerald ve ark., 2000). Bu bakteri çeşitli virulans faktörleri üreterek mastitisin patojenitesine katkıda bulunmaktadır. Virulans genlerinin prevalansının yüksek olması bakterinin patojenliğini artırmaktadır. Bu çalışma ile *PVL*, γ -hemoliz ve *LukED* virulans genlerinin prevalansının yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Bu çalışma, genetik olarak aynı kökenden gelen *S. aureus* tiplerinin virulans gen profillerinin karakterizasyonu ile patojenitesini belirlemeye, klinik sonuçları tahmin etmeye ve özellikle zararlı suşların tanımlanmasına yardım edebilmesi bakımından önemlidir (Haveri ve ark., 2007). Böyle bir çalışma dünyada oldukça sınırlıdır. Daha çok insan kaynaklı *PVL* geni Real-Time PCR'ı yapılmıştır. Fakat mastitisli ineklerden ve insandan izole edilen *S. aureus* suşlarında γ -hemoliz ve *LukED* genlerinin Real-Time PCR'la kantitatif analizine hiç rastlanmamıştır. Çalışma bu anlamda önemli ve orijinal bir çalışmadır.

Bir bakterideki virulans genlerinin varlığını belirlemek ve varsa kantitatif olarak miktarını ölçmek amacıyla Real-Time PCR hem hızlı hemde pratik bir tekniktir. Real-Time PCR'da amplifikasyon ürünlerinin analizinde agaroz jel elektroforez bantlarının, U.V. ışığı altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmaması, geniş bir dinamik aralığına sahip olması, özgüllük ve duyarlılığının klasik PCR'dan daha üstün olması gibi nedenlerle kullanımı giderek yaygınlaşan bir metottur (Güllüce, 2009).

Bu tez çalışmasında da klasik PCR sonuçları ile Real-Time PCR sonuçları arasında istatistiki olarak uyum analizi yapılmış ve her iki sonucunda uyumlu olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$).

Bu gibi kantitatif miktar çalışmalarında klasik PCR'la doğrulamaya gerek kalmadan ve etidyum'a maruz kalmadan, Real-Time PCR aracılığı ile zahmetsiz, daha hızlı ve güvenilir sonuçlar elde edilebilir.

KAYNAKLAR

- Aires-de-Sousa, M., Parente, C.E.S.R., Vieira-da- Motta, O., Bonna, C.F.I., Silva, D.A., de Lencastre, H., 2007, Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolated from Buffalo, Bovine, Ovine and Caprine Milk Samples Collected in Rio de Janeiro State, Brazil, *Applied and Enviromental Microiology*, 73, 3845-3849.
- Akan, E., 1993, Tıbbi Mikrobiyoloji, Bakteriler, Mantarlar, Riketziyalar, Klamidyalar ve İnfeksiyonları, *Saray Tıp Kitapevleri*, 2. baskı, 1-12.
- Akan, M., 2006, Staphylococcus infeksiyonları. Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). Ed. Nejat Aydın, Jale Paracıkoğlu. *İlke Emek Yayınları*, Ankara.
- Alaçam, E., 1997, Meme Hastalıkları, 'Sığır Hastalıkları', Alaçam, E., and Şahal, M., (ed), *Medisan*, Ankara, 389-425.
- Alaçam, E., Dinç, D.A., Erganis, O., Tekeli, T. Uçan, U.S., 1994, Sağlıklı ve subklinik mastitisli ineklerde kuru dönemde antibiyotik uygulamalarının etkisi, *Türk Journal of Veterinary and Anim. Sci.* 18: 241-250.
- Alaçam, E., Tekeli, T., Sezen, Y., Erganis, O., 1986, Sütçü İneklerin Subklinik Mastitislerinde Cefoperazone'un Etkisi Üzerinde Çalışma, *Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1 (2), 65-74.
- Archer, G.L., 1998, *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen, *Clinical Infectious Diseases*, 26, 1179-81.
- Arda, M., 1997, Temel Mikrobiyoloji, 1. baskı, Medisan Yayın Serisi No:25, Ankara.
- Arda, M., İstanbulluoglu, E. 1980 Mastitislere Sebep Olan Aerobik-Mikroaerofilik, Anaerobik Bakterilerin İzolasyon Ve İdentifikasyonu Üzerinde Çalışmalar, *Tübitak Veterinerlik Ve Hayvancılık Araştırma Grubu Vhag- 304*.
- Arda, M., İstanbulluoglu, E., 1979, Mastitislere neden olan aerobik, mikroaerofilik, anaerobik bakterilerin izolasyon ve identifikasyonu üzerinde çalışmalar, *TÜBİTAK VHAG-304*, Kesin Rapor.
- Ausubel, F.M., Kingston, R.E., Brent, R., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K., 1991, Current protocols in molecular biology, *Greene Publishing Associates & Wiley Interscience*, New York.
- Aydın, N., Coşkuner, M.R., 1981, Ankara bölgesinde klinik ve subklinik mastitislere neden olan aerobik mikroorganizmaların ve mantarların izolasyon, identifikasyon ve antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının saptanması üzerine çalışmalar, *Etilik Veteriner Mikrobiyoloji Enstitüsü Dergisi*, 5 (4-5), 7-28.
- Bademkiran, S., Yesilmen, S., Gürbulak, K., 2005, Sütçü İneklerde Günlük Sağım Sayısının Klinik Mastitis ve Süt Verimi Üzerine Etkisi, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16 (2), 17-21.

- Baştan, A., 2002, İneklerde Meme Hastalıkları (ISBN: 975-8322-15-X), *Şahin Matbaası*, Ankara.
- Biggadike, H., 2001, Enviromental Mastitis: Causes and Prevalence, *ADAS/IGER/ University of Bristol*, 211-220.
- Bilgehan, H., 2000, Klinik Mikrobiyolojik Tedavi, *Barış Yayınları* 3.Baskı, Bornova, İzmir
- Bramley, A.I., Dodd, F.H., 1984, Reviews of the progres of dairy science: mastitis control- progress and prospects, *Journal of Diry Research*, 51, 481-512.
- Cifrian, E., Guidry, A.J., O'Brien, C.N. and Marquardi, W.W., 1996, Effect of antibodies to alpha and beta toxins, cell wall and exopolysaccharide casule on the cytotoxicity and adherence of *Staphylococcus aureus* to bovine mammary secretory epithelial cells, *American Journal of Veterinary Research*, 57 (9), 1308-1311.
- Couppie, P., Cribier, B., Prévost, G., Grosshans, E., Piémont, Y., 1994, Leukocidin from *Staphylococcus aureus* and cutaneous infections: an epidemiologic study, *Arch Dermatol*, 130, 1208-9.
- Del Vecchio, V.G., Petroziello, J.M., Gress, M.J., McClesky, F.K., Melcher, G.P., Crouch, H.K., Lupski, J.R., 1995, Molecular genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via flu-orophore enhanced repetitive sequence PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 33 (8), 2141-2144.
- Denis, O., Deplano, A., De Beenhouwer, H., Hallin, M., Huysmans, G., Garrino, M.G., Glupczynski, Y., Malaviolle, X., Versigon, A., Struelens, M.J., 2005, Polyclonal emergence and importation of community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains harbouring Panton-Valentine leucocidin genes in Belgium, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56 (6), 1103-1106.
- Dinges, M.M., Orwin, P.M., Schlievert, P.M., 2000, Exotoxins of *Staphylococcus aureus*, *Clinical Microbiology Reviews*, 13, 16-34.
- Deveci, H., Apaydin, A.M., Kalkan, C., Öcal, H., 1994, Evcil Hayvanlarda Meme Hastalıkları I. Baskı (ISBN:975-394-005), *Fırat Üniversitesi Basımevi*, Elazığ.
- Devriese, L.A., 1984, A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species, *The Journal of Applied Bacteriology*, 56 (2), 215-220.
- Dufour, P., Gillet, Y., Bes, M., et al., 2002, Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of single clone that produces Panton-Valentine leucocidin, *Clinical Infeciont Diseases* 35, 819-824.
- Eberhatr, R.J., 1986, Management of dry cows to reduce mastitis, *Journal of Dairy Science*, 69 (6), 1721-1732.

- Ekin, İ.H., 1998, İneklerde Subklinik Mastitis Olgularından İzole Edilen Streptokokların Serogruplandırılması ve Çeşitli Biyokimyasal Özellikleri Üzerine Araştırmalar, Yüksek Lisans Tezi, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Van.
- Erganis, O., Kuyucuoglu, Y., Ok, Ü., 1995, İnek ve koyun mastitislerine sebep olan koagülaz negatif ve pozitif Staphylokokların biyotiplendirilmesi, *Veterinarium*, 6 (1-2), 23-27.
- Esan, C.O., Famurewa, O., Lin, J., Shittu, A.O., 2009, Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates obtained from health care institutions in Ekiti and Ondo States, South-Western Nigeria, *African Journal of Microbiology Research*, 3 (12), 962-968.
- Fırat, G., Uysal, Y., 1986, İstanbul bölgesindeki klinik ve subklinik mastitisli ineklerden izole edilen aerob mikroorganizmaların identifikasyonları ve çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları üzerine bir çalışma, *Pendik Hayvan Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 18 (1-2), 12-27.
- Fitzgerald, J.R., Meaney, W.J., Hartigan, P.J., Smyth, C.J., 2000, Population and Virulence Factor Analysis of *Staphylococcus aureus* from Bovine Mastitis.
- Fox, L.K., Ferens, W.A., Bohach, G.A., Bayles, K.W., Davis, W.C., 2000, *Staphylococcus aureus*: Super mastitis Pathogen, *National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings*, Atlanta, Georgia, 98-103.
- Frénay, H.M.E., Theelen, J.P.G., Schouls, L.M., Vanderbroucke- Grauls, C.M.J.E., Verhoef, J., van Leeuwen, W.J., Mooi, F. R., 1994, Discrimination of epidemic and nonepidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains on the basis of protein A gene polymorphism, *Journal of Clinical Microbiology*, 32 (3), 846-847.
- Fueyo, J.M., Mendoza, M.C., Rodicio, M.R., Muñiz, J., Alvarez, M.A., Martín, M.C., 2005, Cytotoxin and Pyrogenic Toxin Superantigen Gene Profiles of *Staphylococcus aureus* Associated with Subclinical Mastitis in Dairy Cows and Relationships with Macrorestriction Genomic Profiles, *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 1278-1284.
- Gudding, R., McDonald, J.S., Cheville, N.F., 1984 Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* mastitis: bacteriologic, histologic, and ultrastructural pathologic finding, *American Journal of Veterinary Research*, 45 (12), 2525-2531.
- Güllüce, A., 2009, Farklı hayvan türlerinin ısıtılmış et karışımlarında Real-Time PCR tekniği ile tespit edilmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kayseri, 56.
- Günel, T., 2008, Real-Time PCR ve Uygulama Alanları, *Real-Time PCR Çalıştayı*, İstanbul, 4-8.

- Hadimli, H.H., 2000, Süt ineklerinde Staphylococcal Mastitisler için aşı çalışmaları, Doktora Tezi, *Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi*, Konya.
- Hadimli, H.H., Ates, M., Güler, L., Kav, K., Öncel, T., 2001 Mastitisli süt ineklerinden izole edilen Stafilocokların beta-laktamaz aktiviteleri ve antibiyotiklere duyarlılıkları, *Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17 (4), 21-25.
- Hajek, V., Marsalek, E., 1971, The differentiation of pathogenic staphylococci and a suggestion for their taxonomic classification. *Zentralbl. Bakteriöl. Orig. A.* 217 (2), 176-182.
- Han, H.R., Pak, S.I., Kang, S.W., Jong, W.S., Youn, C.J., 2000, Capsular polysaccharide typing of domestic mastitis-causing *Staphylococcus aureus* strains and its potential exploration of bovine mastitis vaccine developmen. I. capsular polysaccharide typing, isolation and purification of the strains, *Journal of Veterinary Science*, 1 (1): 53–60.
- Harmon, R.J., 1994, Physiology and factors affecting somatic cell counts. *Journal of Dairy Science*, 77 (7), 2103-2113.
- Haveri, A., Roslöf, A., Rantala, L., Pyörälä, S., 2007, Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics, *Journal of Applied Microbiology* 103 (4), 993-1000.
- Haveri, M., Hovinen, M., Roslöf, A., Pyörälä, S., 2008, Molecular Types and Genetic Profiles *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Bovine Intramammary Infections and Extramammary Sites, *Journal of Clinical Microbiology*, 46 (11), 3728-3735.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R., 1992, Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences, *Biotechnology (Nature Publishing Company)*, 10 (4), 413-7.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R., 1993, Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions, *Biotechnology (Biotechnology (Nature Publishing Company))*.11 (9), 1026-30.
- Hillerton, J. E. and Berry, E. A., 2005, Treating mastitis in the cow-a tradition or an archaism, *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1250- 1255.
- Ikawaty, R., Brouwer, E.C., Van Duijkeren, E., Mevius, D., Verhoef, J., Fluit, A.C., 2010, Virulence Factors of Genotyped Bovine Mastitis *Staphylococcus aureus* Isolates in The Netherlands, *International Journal of Diry Science*, 5 (2), 60-70.
- Jain, N.C., 1979, Common mammary pathogens and factors in infection and mastitis, *Journal of Diry Science*, 62, 128-134.
- Jarrett, J.A., 1984, Enviromental effects on mastitis and milk of quality, *The Veterinary Clinics of North America Large Animal Practice*, 6 (2), 371-375.

- Johnsson, D., Mölling, P., Strålin, K., Söderquist, B., 2004, Detection of Pantone-valentine leukocidin gene in *Staphylococcus aureus* by LightCycler PCR: clinical and epidemiological aspects, *Clinical Microbiology and Infection*, 10 (10), 884-889.
- Kaneko, J., Kamio, Y., 2004, Bacterial Two-component are and Hetero-heptameric Pore-forming Cytolytic-toxins: Structures Pro-forming Mechanism, and Organization of the Genes, *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 68 (5), 981-1003.
- Kapur, V., Sischo, W., Greer, R., Whittam, T., Musser, J., 1995, Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows, *Journal of Clinical Microbiology*, 33 (2), 376-380.
- Karahan, M., 2005, Mastitisli inek sütlerinden izole edilen streptokok ve stafilokok etkenlerinde genetik polimorfizmin araştırılması, Doktora Tezi, *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Elazığ.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger P.C., Winn, W.C., 1997, Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, Fifth Eddition, Lippincott, Philadelphia, New York.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K. ve ark., 2006, The Real-Time polymerase chain reaction, *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2-3), 95-125.
- Küplülü, Ş., Vural, R., İzgür, H., Kılıçoğlu, Ç., Baştan, A., ve ark., 1995 Subklinik mastitislerin tanısında milk checker'in kullanılması, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 42 (3), 281-284.
- Lina, G., Piémont, Y., Godail-Gamot, F., Bes, M., Peter, M.O., Gauduchon, V., Vandenesch, F., and Etienne, J., 1999, Involvement of Pantone-Valentine Leukocidin-Producing *Staphylococcus aureus* in Primary Skin Infections and Pneumonia, *Clinical Infectious Diseases*, 29, 1128-32.
- Lipman, L.J., de Nijs A, Lam, T.J., Rost, J.A., van Dijk L., Schukken, Y.H., Gaastra, W., 1996 Genotyping by PCR, of *Staphylococcus aureus* strains, isolated from mammary glands of cows, *Veterinary Microbiology*, 48 (1-2), 51-55.
- Loeffler, D.A., and Norcross, N.L., 1985, Enzyme linked immunosorbent assay for detection of milk immunoglobulins to leukocidin toxin of *Staphylococcus aureus*, *American Journal of Veterinary Research*, 46 (8), 1728-1732.
- Maniatis, R., Fritsh, E.F., Sambrook, J., 1982, In Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbos, New York.
- Maslow, J.N., Mulligan, M.E., Arbeit, R.D., 1993, Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms, *Clinical Infectious Diseases*, 17 (2), 153-164.

- Matthews, K.R., Jayarao, B.M., Oliver, S.P., 1992, Plasmid pattern analysis of *Staphylococcus* species isolated from bovine mammary secretions, *Journal of Dairy Science*, 75 (12), 3318-3323
- Melles, D.C., Gorkink, R.F., Boelens, H.A., Snijders, S.V., Peeters, J.K., Moorhouse, M.J., et al., 2004, Natural population Dynamics and expansion of pathogenic clones of *Staphylococcus aureus*, *Journal of Clinical Invest.*, 114, 1732-40.
- Melles, D.C., van Leeuwen, W.B., Boelens, H.A.M., Peeters, J.K., Verbrugh, H.A., van Belkum, A., 2006, Panton-Valentine leucocidin Genes in *Staphylococcus aureus*, *Emerging Infectious Diseases*, 12.
- Moussa, I.M., and Shibl, A.M., 2008, Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* recovered from outpatient clinics in Riyadh, Saudi Arabia. *Saudi Med. J.*, 30 (5), 611-617.
- Musser, J., and Kapur, V., 1992, Clonal analysis of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains from intercontinental sources: association of the mec gene with divergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination, *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 2058-2063.
- Muto, C.A., Jernigan, J.A., Ostrowsky, B.E., Richèt, H.M., Jarvis, W.R., Boyce, J.M. ve Farr, B.M., 2003, SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus*, *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 24 (5), 362-386.
- Narita, S., Kaneko, J., Chiba, J., et al., 2001, Phage conversion of Panton-Valentine leucocidin in *Staphylococcus aureus*: molecular analysis of a PVL-converting phage, Φ SLT. *Gene*, 268, 195-206.
- Nickerson, S.C., 1989, Immunological aspects of mammary involution, *Journal of Dairy Science*, 72 (6), 1665-1678.
- Oliver, S.P., and Sordillo, L.M., 1988, Udder Health in the periparturient perio, *Journal of Dairy Science*, 71 (9), 2584-2606.
- Özbek, U., 2008, Real-Time PCR Teknolojisi ile Kantitatif Gen Analizleri, *Real-Time PCR Çalıştayı*, İstanbul, 18-23.
- Persing, D.H., 2006, Moleküler Mikrobiyoloji, Tanı Prensipleri ve Uygulamalar, Tekeli, A., Ustaçelebi, Ş., (ed), 71, *Palme Yayınevi*, Ankara.
- Philpot, W.N. and Nickerson, S.C., 1991, Mastitis: Counter attack. Babson Bros. Co. Naperville, Illinois, USA.
- Prévost, G., Couppié, P., Prévost, P., et al., 1995a, Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins, *Journal of Medicine Microbiology*, 42, 237-45.

- Prévost, G., Criebier, B., Couppié, P., et al., 1995b, Panton-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infection Immunology*, 63,4121-4129.
- Pyorala, S. and Syvajarvi, J., 1987, Bovine acute mastitis. Part 1. Clinical aspects and parameters inflammation in mastitis caused by different pathogens, *Journal of Veterinary Medicine*, 34, 373-584.
- Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B., Carter, G.R., 1994, Clinical Veterinary Microbiolog, *Blackwell Science Ltd*, Oxford.
- Rainard, P., Corrales, J.C., Barrio, M.B., Cochard, T. and Poutrel, B., 2003, Leucotoxic activities of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows, ewes, and goats with mastitis: importance of LukM/LukF'- PV Leukotoxin, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10 (2), 272-7.
- Reinoso, E., Bettera, S., Frigerio, C., Di Renzo, M., Calzolari, A., Bogni, C., 2004, RAPD-PCR analysis of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine and human hosts, *Microbiological Research*, 159 (3), 245-255.
- Rhem, M.N., Lech, E.M., Pati, J.M., McDavid, D., Hook, M., Jones, D.B., et al., 2000, The collagen-binding adhesin is a virulence factor in *Staphylococcus aureus* keratitis Infection and Immunity, 68 (6), 3776-3779.
- Rişvanlı, A. and Kalkan, C., 2002. Sütçü İneklerde Yaş ve Irkın Subklinik Mastitisli Memelerin Sütlerindeki Somatik Hücre Sayıları ile Mikrobiyolojik İzolasyon Oranlarına Etkisi, *Yüzüncü Yıl Üniveritesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 13 (1-2), 84-87.
- Rodenburg, J., 1990, Mastitis Prevention: environmental control: Ontario. Ministry of Agricultura and Food Factsheet, AGDEX 410-662.
- Rodistis, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C., Handerson, J.A., 1979, A Textbook of The Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats. 10th Edition, Bailliere Tindall, London.
- Schroeder, J.W., 1997, Mastitis control programs: Bovine mastitis and milking management, North Dakota State University Extension Service, AS-1129.
- Schuberth, H.J., Krueger, C., Zerbe, H., Bleckmann, E., Leibold, W., 2001, Characterization of leukocytotoxic and superantigen-like factors produced by *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis, *Veterinary Microbiology*, 71, 53-58.
- Sugimoto, M., Fujikawa, A., Womack, J. E. and Sugimoto, Y., 2006, Evidence that bovine forebrain embriyoniczinc finger-like gene influences immune response associated with mastitis resistance, *Proceedings of the National Academy of Sciences Online*, 103 (17), 6454- 6459.

- Şeker, İ., Rişvanlı A., Kul S., Bayraktar M., Kaygusuzoğlu E., 2000, İsviçre Esmeri ineklerde meme özellikleri ve süt verimi ile CMT skoru arasındaki ilişkiler, *Lalahan Hayvan Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 40 (1), 29–38.
- Şenünver, A. and Kirşan, İ., 1995, Evcil hayvanlarda mastitis, *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Masaüstü Yayın*, İstanbul.
- Smyth, D.S., Hartigan, P.J., Meaney, W.J., Fitzgerald, J.R., C.F., Deobald, Bohach, G.A., Symth, C.J., 2005, Superantigen genes encoded by the *egc* cluster and SaPIbov are predominant among *Staphylococcus aureus* isolates from cows, goats, sheep, rabbits, and poultry, *Journal of Medicine Microbiology*, 54, 401-411.
- Temizkan, G., Gürel, F., Albayrak, G., Günel, T., Kığ, C., 2008, *Real-Time PCR Çalıştırı*, İstanbul, 4-25.
- Tenover, F.C., Arbeit, R., Archer, G., Biddle, J., Byrne, S., Goering, R., Hancock, G., Herbert, G.A., Hill, B., Hollis, R., Jarvis, W.R., Kreiswirth B., Eisner, W., Maslow, J., McDougal, L.K., Miller, J.M., Mulligan, M., Pfaller, M.A., 1994, Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*, *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 407-415.
- Tomita, T. and Kamio, Y., 1997, Molecular biology of teh pore-forming cytolysin from *Staphylococcus aureus*, α and γ -hemolysins and leukocidin, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61, 565-572.
- Uzmay, C., Kaya, İ., Akbaş, Y., Kaya, A., 2003, Siyah Alaca İneklerde meme ve meme başı formu ile laktasyon sırası ve laktasyon döneminin subklinik mastitis üzerine etkisi, *Türk J. Vet. Anim. Sci.*, 27, 695– 701.
- van Belkum, A., Kluytamans, van Leeuwen, W., Bax, R., Quint, W., Peters, E., Fluit, A., Vandenbroucke-Grauls, C., van den Brule, A., Koelman, H. 1995 Multicenter evaluation of arbitrarily primed PCR for typing of *Staphylococcus aureus* strains, *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 1537-1547.
- van der Velden, V.H., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J., van Dongen, J.J., 2003, Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by Real-Time Quantitative PCR: Principles, approaches, and laboratory aspects, *Leukemia*. 17, 1013-34.
- Wagner, G.E., 1992, Stafilokoklar, Streptokoklar ve diğer Gram olumlu koklar, Serter D. (ed), Mikrobiyoloji 2. baskı, *Saray Tıp Kitapevleri*, İzmir, 81-86.
- Ward, P.D., Adlam, C., McCartney, A.C., Arbuthnott, J.P. and Thorley, C.M., 1979, A histopathological study of the effects of highly purified staphylococcal alpha and beta toxins on the lactating mammary gland and skin of the rabbit, *Journal of Comparative Pathology*, 89 (2), 169-177.
- Watts, J.L., 1988, Etiological Agents of Bovine Mastitis, *Veterinary Microbiology*, 16, 41-66.

- White, M.E., Glickman, T.L., Barnes-Pallesen, F.D., Stem, E.S., Dinsmore, P., Powers, M.S., Powers, P., Smith, M.C., Montgomery, M.E., Jasko, D., 1986, Accuracy of a discriminant analysis model for prediction of coliform mastitis in dairy cows and a comparison with clinical prediction, *Cornell Veterinary*, 76 (4), 342-347.
- Yamada, T., Tochimaru, N., Nakasuji, S., Hata, E., Kobayashi, H., Eguchi, M., Kaneko, J., Kamio, Y., Kaidoh, T., ve Takeuchi, S., 2005, Leukotoxin family genes in *Staphylococcus aureus* isolated from domestic animals and prevalence of lukM–lukF-PV genes by bacteriophages in bovine isolates, *Veterinary Microbiology* 110, 97–103.
- Zadoks, R., van Leeuwen, W., Barkema, H., Sampimon, O., Verbrugh, H., Schukken, Y., van Belkum, A., 2000, Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 1931-1939.
- Zecconi, A., Cesaris, L., Liandris, E., Daprà, V. and Piccinini, R., 2006, Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland, *Microbial Pathogenesis*, 40, 117-183.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Serengül LADİKLİ
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
Doğum Yeri ve Tarihi : Ankara-1984
Telefon : (0) 537 4862325
Faks :
e-mail : serengul.l@hotmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Konya Lisesi, Selcuklu, Konya	2001
Üniversite	: Selçuk Üniversitesi, Selcuklu, Konya	2007
Yüksek Lisans	: Selçuk Üniversitesi, Selcuklu, Konya	2011
Doktora	:	

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2009-	S.Ü. Meram Tıp Fak. Hast. Kan Merkezi	Biyolog

UZMANLIK ALANI

Yüksek lisans eğitimi devam etmekte olup ders aşamasını 95/100 ortalama ile tamamladı. Öğrendiği ve uygulayabildiği moleküler teknikler; DNA izolasyonu, Yatay ve dikey elektroforez yöntemlerinin uygulaması, Protein izolasyonu, Real-Time PCR uygulaması, PCR uygulaması.

YABANCI DİLLER

İngilizce

Orta seviyede

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

Staj-Çalışma ve Seminer

03.09.2009 tarihinde S.Ü. Meram Tıp Fakültesi Kan Merkezi'nde çalışmaya başladı ve halen orda çalışıyor.

Ladikli, S., 2008, Nutrisyonel Genomik, *S.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü*, Konya.