

## Mastitisli Sığırlardan İzole Edilen *Staphylococcus aureus* İzolatlarının Virülens Gen Profillerinin Belirlenmesi

Ayşe Rümeysa NALÇA<sup>1,a</sup>, Timur GÜLHAN<sup>1,b,\*</sup>

<sup>1</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı, SAMSUN

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-3947-6511, <sup>b</sup>ORCID:0000-0003-4798-1427

Geliş Tarihi: 03.08.2021

Kabul Tarihi: 12.10.2021

**Özet:** Bu çalışmada anabilim dalı kültür koleksiyonunda bulunan subklinik mastitisli sığır sütlerinden izole edilen 140 adet stafilocok izolatından *Staphylococcus aureus* izolatlarının moleküler identifikasyonu ve bazı önemli virülens genlerinin tespiti amaçlandı. Bu amaçla 140 stafilocok izolatı termonükleaz (*nuc*) gen varlığı yönünden PZR ile incelendi. *nuc* geni (279 bp) tespit edilen 42 izolat *S. aureus* olarak tanımlandı. Ayrıca izolatlarda lökotoksin geni (*pvl*), stafilocokal klasik enterotoksin genleri (*sea*, *seb*, *sec*), ekfoliyatif toksin genleri (*eta*, *etb*), hemolizin genleri (*hla*, *hly*), adezin faktör genleri (*fnbA*, *fnbB*, *clfa*) ve toksik şok sendrom toksin geni (*tst*) olmak üzere 12 farklı virülens geninin varlığı 3 farklı multipleks PZR kullanılarak araştırıldı. İzolatların 30 (%71.4)'u *clfa*, 24 (%57.1)'ü *hla*, 14 (%33.3)'ü *hly*, 10 (%23.8)'u *fnbB*, 6 (%14.2)'sı *fnbA*, 6 (%14.2)'sı *etb*, 5 (%11.9)'i *sec*, 5 (%11.9)'i *tst*, 3 (%7.1)'ü *sea*, 2 (%4.7)'si *pvl* ve 1 (%2.3)'i *eta* geni açısından pozitif bulundu. İzolatların hiçbirinde *seb* geni saptanamadı. İzolatların 38'inde bir ya da daha fazla virülens geni, 29'unda ise iki ya da daha fazla virülens geni belirlendi. 4 izolatta ise incelenen virülens genlerin hiçbirisi saptanamadı. İncelenen izolatlarda en fazla tespit edilen virülens genleri *clfa* ve *hla* olduğu görüldü. Sonuç olarak sınırlı dahi olsa sığır mastitislerinin patogenezinde rol oynayan virülens gen patternleri ortaya konuldu. Çalışma sonuçlarının sığır mastitislerinin etiyolojisinde önemli rol oynayan *S. aureus*'a ait virülens faktörlerinin karakterizasyon çalışmalarına katkı sağlayacağı kanaatine varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Mastitis, Sığır, *S. aureus*, Virülens gen profili.

### Determination of Virulence Gene Profiles of *Staphylococcus aureus* Isolated from Cattle with Mastitis

**Abstract:** This study aimed to determine the molecular identification of *Staphylococcus aureus* isolates and some important virulence genes from 140 staphylococci samples isolated from cow milk with mastitis in the culture collection of the department. For this purpose, the presence of the thermonuclease (*nuc*) gene in 140 *S. aureus* isolates was examined by PCR. Forty-two isolates that were positive for the *nuc* gene (279 bp) were identified as *S. aureus*. In addition, the isolates were examined for the presence of 12 different virulence genes, including leukotoxin gene (*pvl*), staphylococcal classical enterotoxin genes (*sea*, *seb*, *sec*), exfoliative toxin genes (*eta*, *etb*), hemolysin genes (*hla*, *hly*), adhesin factor genes (*fnbA*, *fnbB*, *clfa*), and toxic shock syndrome toxin gene (*tst*), using three different multiplex PCR. Of the isolates were found to be positive 30 (71.4%) for *clfa*, 24 (57.1%) *hla*, 14 (33.3%) *hly*, 10 (23.8%) *fnbB*, 6 (14.2%) *fnbA*, 6 (14.2%) *etb*, 5 (11.9%) *sec*, 5 (11.9%) *tst*, 3 (7.1%) *sea*, 2 (4.7%) *pvl*, and 1 (2.3%) *eta* genes. The *seb* gene was not detected in any of the isolates. At the same time one or more virulence genes were determined in 38 of 42 isolates, two or more virulence genes in 29 of the isolates. None of the virulence genes examined in 4 isolates could be detected. It was seen that the most detected virulence genes in the analyzed isolates were *clfa* and *hla*. As a result, virulence gene patterns that play a role in the pathogenesis of bovine mastitis, even if limited, were revealed. It was concluded that the results would contribute to the characterization studies of virulence factors belonging to *S. aureus*, which play an important role in the etiology of bovine mastitis.

**Keywords:** Bovine, Mastitis, *S. aureus*, Virulence gene profile.

### Giriş

Mastitis, meme dokusunun ve meme bezinin bakteriyel, viral, fungal ve paraziter etkenler nedeniyle yangılanmasıdır. Enfeksiyon genellikle hijyenik ve yönetimsel uygulamaların yokluğunda, sağım sırasında enfekte ineklerden enfekte olmayan ineklere yayılabilmektedir (Kotzamanidis ve ark., 2021).

Sığır mastitislerinden en sık izole edilen etkenlerin başında *Staphylococcus (S.) aureus* gelmektedir. Etken hem insanların hem de

hayvanların derisinde, burnunda ve solunum yollarında bulunan kommensal mikrobiyotanın bir parçasını oluşturmaktadır. *S. aureus*, yüzeysel deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarından yaşamı tehdit eden septisemiye kadar, birçok ciddi hastalık oluşturan bir patojendir. Diğer yandan süt endüstrisi için oldukça maliyetli klinik ve subklinik sığır mastitisinin en yaygın etiyolojik ajanıdır (Ren ve ark., 2020).

*S. aureus*, adezinler, kapsüller bir polisakkarit ve ekzoenzimler gibi çok sayıda virülens faktörü üretme kapasitesine sahiptir. Etken aynı zamanda hemolizinler, koagülaz, slime ve protein A gibi meme bezine kolonize olma kabiliyetine katkıda bulunan ekzoproteinler de üretebilmektedir.  $\alpha$  ve  $\beta$ -hemolizinler, mastitisin patogenezinde önemli virülens faktörlerdir. *S. aureus* izolatlarının patojenitesi; adherens özellikleri, çeşitli toksinler, enzimler, yapısal ve ekstraselüler faktörler gibi özelliklerle ilişkilidir. Konakçı hücre dışı matriks bileşenlerine yapışmayı sağlamak, konakçı hücelere zarar vermek ve bağışıklık sistemini güçlendirmek için salgılanan ve hücre yüzeyiyle ilişkili virülens faktörleri enfeksiyonun gelişimine katkı sağlamaktadır. Etkenin dokulara yapışmasını sağlayan en az 25 farklı toksin, adezin matriks molekülleri ile ilişkisi olan 15 mikrobiyal yüzey bileşeni, 20 immunsüpresif molekül ve diğer birçok virülens faktörü bilinmektedir (Fursova ve ark., 2020).

*S. aureus* izolatlarının moleküler karakterizasyonunda koagülaz geni (*coa*), metisilin direnç geni (*femA*) ve termonükleaz geni (*nuc*) gibi tür spesifik genler kullanılmaktadır. Hem *coa* hem de *femA* yüksek polimorfizm gösterir ve teşhis amaçları için uygun değildir. Aksine *nuc*, hem insan hem de hayvan izolatlarında türe özgü bir markör olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca bu gen *S. aureus* suşları arasında yüksek oranda korunmaktadır (Ronco ve ark., 2018).

Bu çalışmada mastitisli sığır sütlerinden elde edilen *S. aureus* izolatlarının *nuc* geni yönünden tür düzeyinde moleküler tanımlanması ve mastitisin patogenezinde rol oynayan lökotoksin, stafilokokal klasik enterotoksin, eksofoliyatif toksin, hemolizin, adezin faktör, toksik şok sendrom toksini oluşumundan sorumlu *pvl*, *sea*, *seb*, *sec*, *eta*, *etb*, *hla*, *hlb*, *fnbA*, *fnbB*, *clfa* ve *tst* genlerimPZR ile incelenmesi amaçlandı.

## Materyal ve Metot

**Staphylococcus spp. İzolatları:** Çalışmanın materyalini Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı kültür koleksiyonu içerisinde yer alan, 2016-2020 arasında subklinik mastitisli sığırlardan izole edilmiş 140 stafilokok izolatı kullanıldı. Çalışma kapsamında kültür koleksiyonunda yer alan izolatlar kullanılması sebebiyle örnek toplama ve saha çalışması yapılmamıştır. Bu nedenle herhangi bir etik kurul iznine ihtiyaç duyulmamıştır. İzolatların canlandırılması %5 Koyun kanlı agar kullanılarak yapıldı ardından DNA ekstraksiyonunun yapılması için üreyen saf koloniler TSA'da pasajlandı.

## Moleküler İdentifikasyon

**DNA Ekstraksiyonu:** İzolatlardan bakteriyel DNA ekstraksiyonu için kaynatma yöntemi kullanıldı (Vurucu ve ark., 2019). Bu amaçla, saf kültürden 4 koloni seçilerek 200  $\mu$ l steril su içerisinde süspansiyon edildi. Örnekleri içeren süspansiyonlar 100°C'de 15 dakika kaynatıldı, 10.000 g'de 10 dakika santrifüj sonrası elde edilen süpernatant kalıp DNA olarak kullanılmak üzere nanodrop spektrofotometre ile ölçülerek 50 ng/ $\mu$ l olacak şekilde ayarlanarak -20°C'de saklandı.

***S. aureus* İzolatlarının Tür Düzeyinde İdentifikasyonu:** İzolatların *S. aureus* olarak identifikasyonlarının doğrulanması amacıyla *S. aureus* spesifik *nuc* geni için PZR yapıldı (Sezener ve ark., 2019). Bu amaçla 25  $\mu$ l'lik bir PZR karışımı, DEPC-treatedwater, 1X PZR solüsyonu, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM her bir dNTP, 1,0 U Taq DNA polimeraz, 0,04  $\mu$ M primer (*nuc* 1, GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT; *nuc* 2, AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC) ve 5  $\mu$ l template DNA kullanıldı. PZR karışımları 94°C'de 5 dk ön denatürasyonu takiben 94°C'de 1 dk denatürasyon, 58°C'de 30 saniye primer bağlanma, 72°C'de 90 dk uzama olmak üzere 35 siklus ve 72°C'de 10 dk son uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu. Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2 $\mu$ g/ml) içeren %1,5'lik agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör (Vilber Lourmat) ile görüntüldü. Görüntüleme sonrasında *nuc* geni için 279 bp'lik bir bandın görülmesi *S. aureus*'un göstergesi olarak kabul edildi.

***S. aureus* İzolatlarının Virülens Genlerinin Belirlenmesi:** İzolatlarda, mastitisin patogenezinde rol oynayan bazı önemli virülens genlerinin belirlenmesi amacıyla multiplex PZR (mPZR) çalışmaları yapıldı. Lökotoksin geni (*pvl*), stafilokokal klasik enterotoksin genleri (*sea*, *seb*, *sec*), eksofoliyatif toksin genleri (*eta*, *etb*), hemolizin genleri (*hla*, *hlb*), adezin faktör genleri (*fnbA*, *fnbB*, *clfa*) ve toksik şok sendrom toksin geni (*tst*) Tablo 1, Tablo 2 ve Tablo 3'de belirtilen spesifik primerler ve PZR koşulları kullanılarak incelendi. mPZR çalışmaları Li ve ark. (2018)'nin bildirdiği metodun modifikasyonu ile gerçekleştirildi. PZR koşulları: 94°C'de 5 dakika ilk denatürasyon, 94°C'de 30 saniye denatürasyon, her gen için spesifik primer bağlanma (annealing) ısısında (55-56°C) 45 saniye, 72 °C'de benzer şekilde spesifik uzama zamanında 30 siklus, son uzama 72°C'de 10 dakika olacak şekilde gerçekleştirildi. Amplifikasyon ürünleri etidumbromid (2 $\mu$ g/ml) içeren %1.5'lik agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntüldü. PZR çalışmalarında pozitif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 23235, negatif kontrol olarak *E. coli* ATCC 25922 kullanıldı.

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

Gen	Primer	Nükleotid sekans (5'-3')	Ürün (bp)	Annealing ısısı	Miktar(µl)	
<i>pvl</i>	PVL-F	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA	433	55°C	0.2	
	PVL-R	GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAAGC				
<i>etb</i>	ETB-F	CAGATAAAGAGCTTTATACACACATTAC	612			
	ETB-R	AGTGAACCTATCTTTCTATTGAAAAACACTC				
<i>sea</i>	SEA-F	GAAAAAAGTCTGAATTGCAGGGAACA	560			
	SEA-R	CAAATAAATCGTAATTAACCGAAGGTTTC				
<i>clfa</i>	CLFA-F	ATTGGCGTGGCTTCAGTGCT	292			
	CLFA-R	CGTTTCTCCGTAGTTGCATTTG				
					Master mix	12.5
					Steril distile su	8.7
					Template DNA	2
					<b>Toplam hacim</b>	<b>25</b>

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

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

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

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

Tablo 4. *S. aureus* izolatlarında belirlenen virülens genlerin dağılımı.

İzolat no	Virülens Genleri											
	<i>clfa</i>	<i>hla</i>	<i>hly</i>	<i>fnbB</i>	<i>fnbA</i>	<i>etb</i>	<i>sec</i>	<i>tst</i>	<i>sea</i>	<i>pvl</i>	<i>eta</i>	<i>seb</i>
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	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Toplam</b>	<b>30</b>	<b>24</b>	<b>14</b>	<b>10</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>%</b>	<b>71.4</b>	<b>57.1</b>	<b>33.3</b>	<b>23.8</b>	<b>14.2</b>	<b>14.2</b>	<b>11.9</b>	<b>11.9</b>	<b>7.1</b>	<b>4.7</b>	<b>2.3</b>	<b>0</b>

**Tablo 5.** *S. aureus* izolatlarında belirlenen çoğul virülens gen profili.

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

## Bulgular

### *S. aureus* İzolatlarında *nuc* Geni Hedefli PZR

**Sonuçları:** Mevcut *S. aureus* izolatlarının genotipik identifikasyonunun belirlenmesi için toplam 140 stafilokok izolatının termonükleaz (*nuc*) geni varlığı PZR ile incelendi. *nuc* genine spesifik primerle yapılan PZR sonrasında, 42 izolatta 279 bp'lik PZR ürünü elde edilip izolatların *S. aureus* oldukları belirlendi (Şekil 1).



**Şekil 1.** *S. aureus* izolatlarının *nuc* geni spesifik PZR ürünü. M: Moleküler ağırlık marker (Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus, Fermentas, Litvanya). 1,2,3,5,6: *nuc* geni pozitif (279 bp) örnekler. 4: Negatif örnek. 7: Pozitif kontrol (*S. aureus* 23235) 8: Negatif kontrol (*E. coli* ATCC 25922).

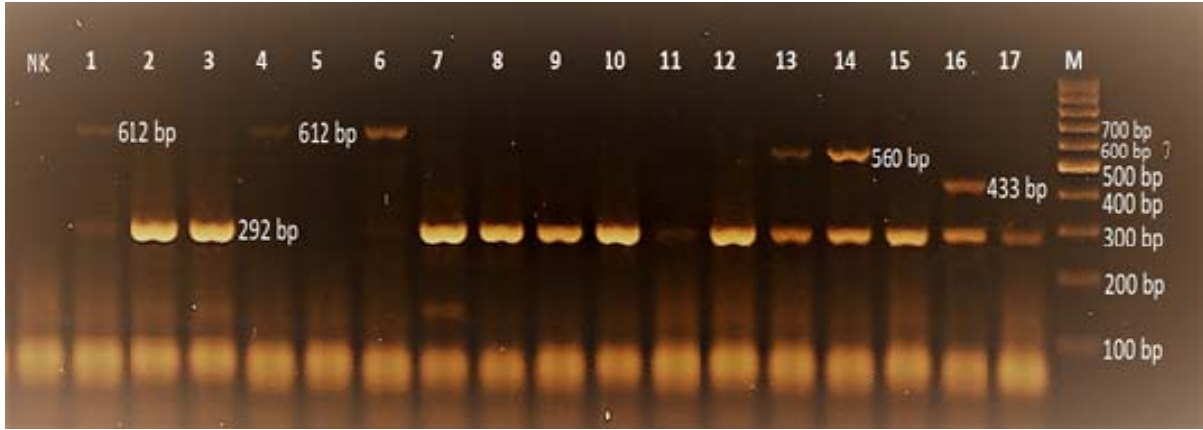
***S. aureus* İzolatlarında Virülens Gen Profili:** Bu çalışmada *nuc* geni ile *S. aureus* oldukları

doğrulanmış 42 izolatın lökotoxin geni (*pvl*), stafilokokal klasik enterotoksin genleri (*sea*, *seb*, *sec*), eksfoliyatif toksin genleri (*eta*, *etb*), hemolizin genleri (*hla*, *hlb*), adezin faktör genleri (*fnbA*, *fnbB*, *clfa*) ve toksik şok sendrom toksin geni (*tst*) varlığı 3 farklı mPZR ile incelendi. *pvl*, *etb*, *sea* ve *clfa* genlerine ait mPZR 1 sonuçları Şekil 2, *sec*, *tst*, *seb* ve *eta* genleri için mPZR 2 sonuçları Şekil 3 ve *fnbB*, *fnbA*, *hla* ve *hlb* genleri için mPZR 3 sonuçları Şekil 4'de gösterildi.

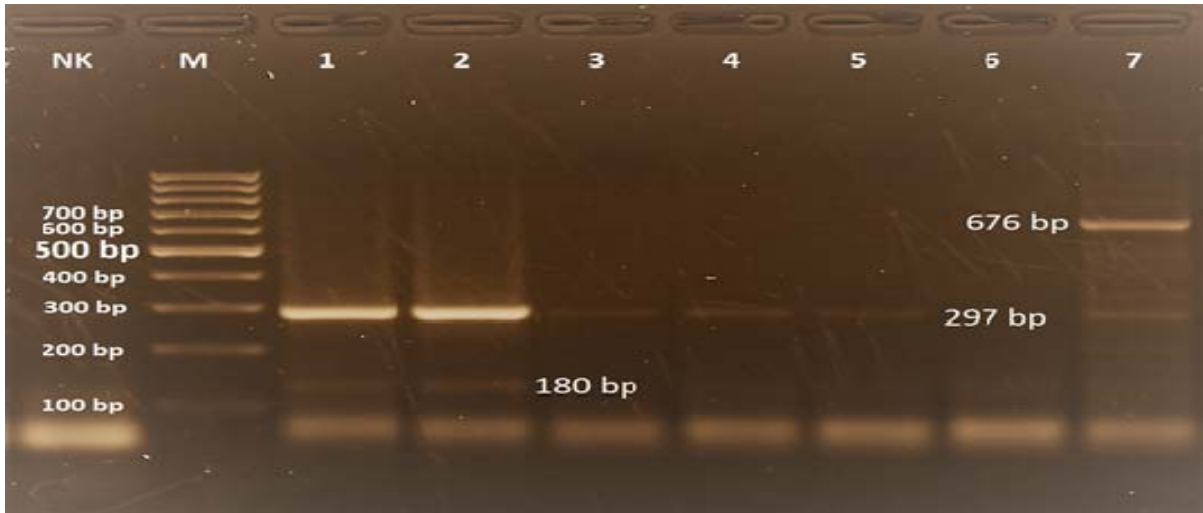
İzolatların 30 (%71,4)'unda *clfa*, 24 (%57,1)'ünde *hla*, 14 (%33,3)'ünde *hlb*, 10 (%23,8)'unda *fnbB*, 6 (%14,2)'sında *fnbA*, 6 (%14,2)'sında *etb*, 5 (%11,9)'inde *sec*, 5 (%11,9)'inde *tst*, 3 (%7,1)'ünde *sea*, 2 (%4,7)'sinde *pvl* ve 1 (%2,3)'inde *eta* geni tespit edildi. İzolatların hiçbirinde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

## Tartışma ve Sonuç

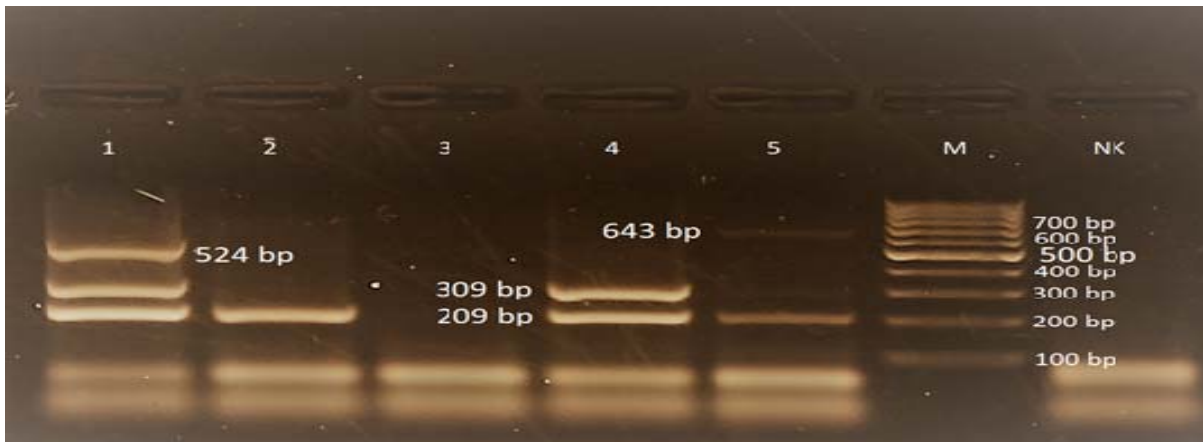
*S. aureus* nedenli mastitis oluşumu farklı patojenez mekanizmalarına sahip enterotoksinler, hemolizinler, clumping faktör, fibrinolektin bağlayan proteinler gibi çeşitli virülens faktörlerin üretimine bağlıdır (Boynukara ve ark., 2008). *S. aureus* suşlarının patojenisitesindeki farklılıklar coğrafi dağılımdan, konakçı ve doku ile ilgili özelliklerden kaynaklanmaktadır. Virülens genlerinin sayısı ve kombinasyonu, *S. aureus* suşlarının patojenik potansiyeline önemli katkılar sağlamaktadır (Kot ve ark., 2016).



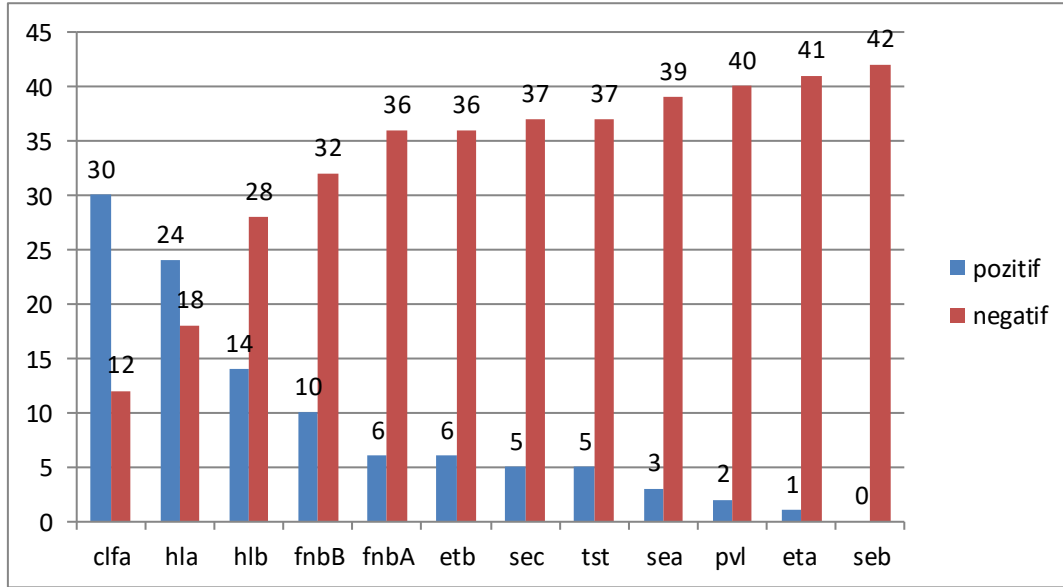
**Şekil 2.** *pvl*, *etb*, *sea* ve *clfa* genlerine ait mPZR 1 sonuçları. M: Moleküler ağırlık marker (Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus, Fermentas, Litvanya). NK: Negatif kontrol (DNase-RNasefree PZR suyu); 1: *clfa* ve *etb* genleri (292 bp ve 612 bp) pozitif örnekler; 2,3,7,8,9,10,11,12,15,17: *clfa* geni (292 bp) pozitif örnekler; 4 ve 6: *etb* geni (612 bp) pozitif örnekler; 5: tüm genler (*pvl*, *etb*, *sea* ve *clfa*) açısından negatif örnek; 13 ve 14: *clfa* ve *sea* genleri (292 bp ve 560 bp) pozitif örnekler; 16: *clfa* ve *pvl* genleri (292 bp ve 433 bp) pozitif örnek.



**Şekil 3.** *sec*, *tst*, *seb* ve *eta* genleri için mPZR 2 sonuçları. M: Moleküler ağırlık marker (Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus, Fermentas, Litvanya). NK: Negatif kontrol (DNase-RNasefree PZR suyu); 1,2: *sec* ve *tst* genleri (297 bp ve 180 bp) pozitif örnekler; 3,4,5: *sec* geni (297 bp) pozitif örnek; 7: *eta* geni (676 bp) pozitif örnek; 6: tüm genler (*sec*, *tst*, *seb* ve *eta*) açısından negatif örnek.



**Şekil 4.** *fnbB*, *fnbA*, *hla* ve *hlb* genleri için mPZR 3 sonuçları. M: Moleküler ağırlık marker (Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus, Fermentas, Litvanya). NK: Negatif kontrol (DNase-RNase free PZR suyu); 1: *hla* (209 bp), *hlb* (309 bp) ve *fnbB* (524 bp) genleri pozitif örnek; 2: *hla* (209 bp) pozitif örnek; 3: tüm genler (*fnbB*, *fnbA*, *hla* ve *hlb*) açısından negatif örnek; 4: *hla* (209 bp) ve *hlb* (309 bp) genleri pozitif örnek; 5: *hla* (209 bp) ve *fnbA* (643 bp) genleri pozitif örnek.



Şekil 5. *S. aureus* izolatlarında belirlenen virülens genlerin dağılımı.

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

Bu çalışmada incelenen *S. aureus* izolatlarında sıklıkla belirlenen virülens genlerinin *cfa* (Fursova ve ark., 2020; Ote ve ark., 2011; Xu ve ark., 2015; Yang ve ark., 2020; Zhang ve ark., 2018 ), *hla* (Artursson ve ark., 2016; Fursova ve ark., 2018; Kreausukon ve ark., 2012; Ronco ve ark., 2018; Wang ve ark., 2016 ), *sea* (Grispoldi ve ark., 2019; Liu ve ark., 2017; Seyoum ve ark., 2016 ), *fnbA* (Pereyra ve ark., 2016; Yang ve ark., 2012; Zuniga ve ark., 2015), *fnbB* (Bar-Gal ve ark., 2015; Kot ve ark., 2016), *pvl* (Wang ve ark., 2014) *tst* (Wang ve ark., 2017) *sec* (Kotzamanidis ve ark., 2021) olduğu bildirilmiştir. Araştırmalarda *S. aureus* kökenli siğir mastitislerinin patogenezinde bu genlerin önemli rol oynadığına dikkat çekilmiştir.

Konuyla ilgili farklı ülkelerde siğir mastitis vakalarından izole edilen *S. aureus* izolatlarında virülens genlerin tespitine yönelik yapılan çalışmalarda patogeneze rol oynayan faktörlerin çok değişken olduğu ortaya konulmuştur. Bazı çalışmalarda primer olarak belirlenen genlerin *cfa* ve *hla* olduğu görülmektedir. Bu çalışmada incelenen *S. aureus* izolatlarında belirlenen en önemli virülens genlerinin *cfa* ve *hla* olması literatür verileriyle paralellik göstermektedir (Coelho ve ark., 2011; Fitzgerald ve ark., 2000; Monecke ve ark., 2007; Oteve ark., 2011). Araştırma verileri arasındaki farklılıklar bölgesel, metodik, izolat sayısı ve çeşitliliği, popülasyon yapısı gibi birçok faktöre bağlı şekillenebilmektedir. Diğer yandan pek çok araştırma verilerinde sunulduğu

gibi, siğir mastitislerinin oluşumuna katılan *S. aureus* izolatlarının farklı virotiplere sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle siğir mastitislerinin etiolojisini detaylı bir şekilde ortaya koymak için, daha kapsamlı epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Böylece siğir mastitislerin önlenmesinde koruyucu aşılama programları ve daha kapsamlı aşı içeriklerinin hazırlanması mümkün olabilecektir.

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

Sonuç olarak bu çalışma ile sınırlı dahi olsa siğir mastitislerinin patogenezinde rol oynayan virülens gen paternleri ortaya konuldu. Çalışma sonuçlarının siğir mastitislerinin etiolojisinde önemli rol oynayan *S. aureus*'a ait virülens faktörlerinin karakterizasyonu çalışmalarına katkı sağlayacağı kanaatine varıldı. Siğir mastitislerinin önlenmesine yönelik hazırlanacak aşı kompozisyonunun

şekillendirilmesinde *S. aureus* virülens gen çeşitliliğinin bilinmesi önem arz etmektedir. Bu nedenle kullanılacak aşının çok sayıda virülens faktörüne sahip suşlardan oluşturulması gerekmektedir. Bu çalışmada incelenen *S. aureus* izolatlarının çoğunun farklı virülens gen profiline sahip olması, izolatların aşı suşu olarak kullanılabilir potansiyelde olduğunu göstermektedir. Ancak izolatların aşı suşu potansiyelinin tam olarak ortaya konulması için ileri seviyede karakterizasyon çalışmaları yapılmalıdır. Sığır mastitislerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının mastitis patogenezesinde rol oynayan virülens gen çeşitliliğinin ortaya konulması amacıyla daha fazla izolat içeren epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

### Teşekkür

Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından PYO.VET.1904.20.015 nolu proje kapsamında maddi olarak desteklenmiş ve aynı isimli yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

### Kaynaklar

- Artursson K, Söderlund R, Liu L, Monecke S, Schelin J, 2016: Genotyping of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis and correlation to phenotypic characteristics. *Vet Microbiol*, 193, 156-161.
- Bar-Gal GK, Blum SE, Hadas L, Ehrlich R, Monecke S, Leitner G, 2015: Host-specificity of *Staphylococcus aureus* causing intramammary infections in dairy animals assessed by genotyping and virulence genes. *Vet Microbiol*, 176,143-154.
- Boynukara B, Gulhan T, Alisarli M, Gurturk K, Solmaz H, 2008: Classical enterotoxigenic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Van, Turkey. *Int J Food Microbiol*, 125(2), 209-211.
- Coelho SMO, Pereira IA, Soares LC, Pribul BR, Souza MMS, 2011: Short communication: Profile of virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *J Dairy Sci*, 94, 3305-3310.
- Fitzgerald JR, Hartigan PJ, Meaney WJ, Smyth CJ, 2000: Molecular population and virulence factor analysis of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infection. *J Appl Microbiol*, 88, 1028-1037.
- Fursova KK, Shchannikova MP, Loskutova IV, Shepelyakovskaya AO, Laman AG, Boutanaev AM, Sokolov SL, Artemeva OA, Nikanova DA, Zinovieva NA, Brovko FA, 2018: Exotoxin diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows with subclinical mastitis in Central Russia. *J Dairy Sci*, 101, 4325-4331.
- Fursova, K, Sorokin A, Sokolov S, Dzhelyadin T, Shulcheva I, Shchannikova M, Nikanova D, Artemeva O, Zinovieva N, Brovko F, 2020: Virulence factors and phylogeny of *Staphylococcus aureus* associated with bovine mastitis in Russia based on genome sequences. *Front Vet Sci*, 7(135), doi: 10.3389/fvets.2020.00135.
- Grispoldi L, Massetti L, Sechi P, Iulietto MF, Ceccarelli M, Karama M, Popescu PA, Pandolfi F, Cenci-Goga BT, 2019: Short communication: Characterization of enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. *J Dairy Sci*, 102, 1059-1065.
- Kot B, Szweida P, Frankowska-Maciejewska A, Piechota M, Wolska K, 2016: Virulence gene profiles in *Staphylococcus aureus* isolated from cows with subclinical mastitis in eastern Poland. *J Dair Res*, 83, 228-235.
- Kotzamanidis C, Vafeas G, Giantzi V, Anastasiadou S, Mygdalias S, Malousi A, Loukia E, Daniel S, Zdragas A, 2021: *Staphylococcus aureus* isolated from ruminants with mastitis in Northern Greece dairy herds: genetic relatedness and phenotypic and genotypic characterization. *Toxins*, 13 (3), 176, <https://doi.org/10.3390/toxins13030176>.
- Krausukon K, Fetsch A, Kraushaar B, Alt K, Müller K, Krömker V, Zessin KH, Käsbohrer A, Tenhagen BA, 2012: Prevalence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from bulk tank milk of dairy herds. *J Dairy Sci*, 95, 4382-4388.
- Li X, Fang F, Zhao J, Lou N, Li C, Huang T, Li Y, 2018: Molecular characteristics and virulence gene profiles of *Staphylococcus aureus* causing bloodstream infection. *Braz J Infect Dis*, 22, 487-494.
- Liu H, Li S, Meng L, Dong L, Zhao S, Lan X, Wang J, Zheng N, 2017: Prevalence, antimicrobial susceptibility, and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy herds in northern China. *J Dairy Sci*, 100, 8796-8803.
- Monecke S, Kuhnert P, Hotzel H, Slickers P, Ehrlich R, 2007: Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle. *Vet Microbiol*, 125, 128-140.
- Ote I, Taminiau B, Duprez JN, Dizier I, Mainil JG, 2011: Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. *Vet Microbiol*, 153, 285-292.
- Pereyra EAL, Picech F, Renna MS, Baravalle C, Andreotti CS, Russi R, Calvino LF, Diez C, Dallard BE, 2016: Detection of *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm-producing genes and their expression during internalization in bovine mammary epithelial cells. *Vet Microbiol*, 183, 69-77.
- Ren Q, Liao G, Wu Z, Lv J, ChenW, 2020: Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from subclinical bovine mastitis in southern Xinjiang, China. *J Dairy Sci*, 103(4), 3368-3380.
- Ronco T, Klaas IC, Stegger M, Svenes L, Astrup LB, Farre M, Pedersen K, 2018: Genomic investigation of *Staphylococcus aureus* isolates from bulk tank milk



- and dairy cows with clinical mastitis. *Vet Microbiol*, 215, 35-42.
- Seyoum ET, Mekonene TK, Woldetsadik DA, Zewudie BM, Gebreyes WA, 2016: Enterotoxin gene profile of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine milk produced in central Ethiopia. *J Infect Dev Cttries*, 10(2), 138-142.
- Sezener MG, Fındık A, Ergüden VE, Akgöz S, Gülhan T, Çiftci A, 2019: Mastitis izolatu *Staphylococcus aureus* suşlarında antibiyotik dirençliliğinin ve bazı virülens genlerinin araştırılması. *J Anatol Environ Animal Sci*, 4(2), 182-187.
- Vurucu N, Savaşan S, Sezener MG, 2019: Determination of virulence genes and genetic similarities of mastitic milk originated *Escherichia coli* isolates. *East African Scholars J Agri Life Sci*, 2(1), 31-35.
- Wang D, Zhang L, Zhou X, He Y, Yong C, Shen M, Szenci O, Han B, 2016: Antimicrobial susceptibility, virulence genes, and randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from bovine mastitis in Ningxia, China. *J Dairy Sci*, 99, 9560-9569.
- Wang D, Zhang L, Yong C, Shen M, Ali T, Shahid M, Han K, Zhou X, Han B, 2017: Relationships among superantigen toxin gene profiles, genotypes, and pathogenic characteristics of *Staphylococcus aureus*. *J Dairy Sci*, 100(6), 4276-4286.
- Wang X, Wang X, Wang Y, Guo G, Usman T, Hao D, Tang X, Zhang Y, Yu Y, 2014: Antimicrobial resistance and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* strains from Holstein milk. *Lett Appl. Microbiol*, 58, 527-534.
- Xu J, Tan X, Zhang X, Xiaoli X, Sun H, 2015: The diversities of staphylococcal species, virulence and antibiotic resistance genes in the subclinical mastitis milk from a single Chinese cow herd. *Microb Pathog*, 88, 29-38.
- Yang FL, Li XS, Liang XW, Zhang XF, Qin GS, Yang BZ, 2012: Detection of virulence associated genes in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis milk samples in Guangxi. *Trop Anim Health Prod*, 44, 1821-1826.
- Yang F, Zhang S, Shang X, Li H, Zhang H, Cui D, Wang X, Wang L, Yan Z, Sun Y, 2020: Detection and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis cases in China. *J Dairy Sci*, 103, 840-845.
- Zhang L, Gao J, Barkema HW, Ali T, Liu G, Deng Y, Naushad S, Kastelic JP, Han B, 2018: Virulence gene profiles: alpha-hemolysin and clonal diversity in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine clinical mastitis in China. *Vet Res*, 14(63), <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1374-7>.
- Zuniga E, Melville PA, Saldenbergs ABS, Laes MA, Gonsales FF, Salaberry SRS, Gregori F, Brandao PE, dos Santos FGB, Lincopan NE, Benites NR, 2015: Occurrence of genes coding for MSCRAMM and biofilm-associated protein Bap in *Staphylococcus spp.* isolated from bovine subclinical mastitis and relationship with somatic cell counts. *Microb Pathog*, 89, 1-6.

## \*Yazışma Adresi: Timur GÜLHAN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye.

e-mail: timur.gulhan@omu.edu.tr