



Determination of Virulence Genes in *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Meat and Surface Samples of Different Animal Species

Murat Karahan^{1,a,*}, Seyda Şahin^{2,b}, Mahmut Niyazi Moğulkoç^{3,c}, Recep Kalın^{3,d}

¹Hatay Mustafa Kemal University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, 31060 Hatay, Türkiye

²Sivas Cumhuriyet University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene and Technology, 58140 Sivas, Türkiye

³Sivas Cumhuriyet University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, 58140 Sivas, Türkiye

*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Research Article</p> <p>Received : 09-04-2023 Accepted : 14-06-2023</p> <p>Keywords: <i>S. aureus</i> Food-borne pathogen Meat Virulence genes PCR</p>	<p><i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S. aureus</i>) which is a crucial pathogen both for human and animals, one of the causative agent of food poisonings. In this study, significant virulence genes (coagulase (<i>coa</i>), clumping factor (<i>clfA</i>), and protein A (<i>spa-IgG:spa-x</i>)) in <i>S. aureus</i> strains isolated from meats of various animal species (beef, sheep, goat, and chicken) and food contact surfaces were characterized via molecular methods. With this aim, meat (n=400) and surface swap (50) samples from various premises were collected in Sivas province. Using phenotypic methods, samples were found to be coagulase positive <i>S. aureus</i> isolates. Coagulase-positive isolates were tested for virulence genes using a single or multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR). In total, <i>S. aureus</i> was found in 110 (24.4%) of the 450 samples examined. <i>S. aureus</i> was detected 29%, 24%, 14%, 32% and 22% in cattle, sheep, goat and chicken meat samples as well as swab samples, respectively. <i>coa</i>, <i>clfA</i>, IgG binding region of <i>spa</i>, and X region coding genes were detected in all samples. Polymorphisms were observed in two of these four gen regions. In <i>coa</i>-PCR, all isolates had a single band formation with five distinct molecular lengths ranging from 500 to 1400 bp. In <i>spa</i>-X-PCR, all isolates had a single band formation with seven distinct molecular lengths ranging from 190 to 350 bp. As consequently, it is thought that detecting <i>spa</i> gene polymorphisms by <i>coa</i>-PCR in <i>S. aureus</i> isolates from meat and surfaces can be regarded as a good alternative to traditional methods, contributing to the development of effective staphylococcal infection control strategies and public health protection.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 11(7): 1238-1244, 2023

Farklı Hayvan Türlerine Ait Et ve Yüzey Örneklerinden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarında Virülens Genlerinin Belirlenmesi

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p>Araştırma Makalesi</p> <p>Geliş : 09-04-2023 Kabul : 14-06-2023</p> <p>Anahtar Kelimeler: <i>S. aureus</i> Gıda kaynaklı patojen Et Virülens genleri PZR</p>	<p><i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S. aureus</i>) insanlarda ve hayvanlarda patojen bir tür olup, dünyadaki gıda kaynaklı zehirlenmelerin en önemli nedenlerinden biridir. Bu çalışmada farklı hayvan türlerine (sığır, koyun, keçi ve tavuk) ait etlerde ve gıdaların temas ettiği yüzeylerden elde edilen örneklerde <i>S. aureus</i>'un koagülaz (<i>coa</i>), clumping faktör (<i>clfA</i>) ve protein A (<i>spa-IgG; spa-X</i>) gibi önemli virülens genlerinin moleküler yöntemlerle karakterize edilmesi amaçlandı. Bu amaçla Sivas ilindeki çeşitli işletmelerden et (n=400) ve yüzey svap (n=50) örnekleri toplandı. Örnekler fenotipik yöntemlerle koagülaz pozitif <i>S. aureus</i> olarak tanımlandı. Koagülaz pozitif olarak doğrulanan izolatlar virülens genleri tekli ve multiplaks Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile incelendi. Toplamda 450 örneğin 110'unda (%24,4) <i>S. aureus</i> belirlendi. Bu izolatların %29, %24, %14, %32 ve %22 oranlarında sığır, koyun, keçi ve tavuk et örneklerinin yanı sıra yüzey örneklerinde de bulundu. <i>S. aureus</i> izolatlarının tamamında <i>coa</i>, <i>clfA</i>, <i>spa</i>'nın IgG bağlayan bölgesi ve X bölgesini kodlayan genler tespit edildi. Bu dört gen bölgesinin ikisinde polimorfizmler gözlemlendi. <i>Coa</i>-PZR'da, izolatların tamamında beş farklı moleküler uzunluğa sahip ve 500-1400 bp arasında değişen tek bir bant oluşumu bulundu. <i>spa</i>-X-PZR'da ise izolatların tamamında yedi farklı moleküler uzunluğa sahip ve 190-350 bp arasında değişen tek bir bant oluşumu belirlendi. Sonuç olarak, et ve yüzey orijinli <i>S. aureus</i> izolatlarında <i>coa</i>-PZR ile <i>spa</i> gen polimorfizmleri tespitinin geleneksel yöntemlere karşı iyi bir alternatif olarak kullanılabilmesi, dolayısıyla stafilkokal enfeksiyonlara karşı etkili kontrol stratejilerinin geliştirilmesi ve halk sağlığının korunmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.</p>

^a muratkarahan35@hotmail.com

^b <https://orcid.org/0000-0002-7024-1649>

^c seydashin@cumhuriyet.edu.tr

^d <https://orcid.org/0000-0002-8173-7818>

^e mmmogulkoc@cumhuriyet.edu.tr

^f <https://orcid.org/0000-0003-3407-8132>

^g recep.kalin@gmail.com

^h <https://orcid.org/0000-0002-9173-9550>



Giriş

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) insan ve hayvanlar için patojen bir tür olup, dünyadaki gıda kaynaklı intoksikasyonların en önemli nedenlerinden biridir (Ercoli ve ark., 2017; Castro ve ark., 2018). *S. aureus* gıdalarda sıklıkla bulunmakta ve dünya çapında gıda kaynaklı bakteriyel zehirlenmelerin önde gelen nedenleri arasında yer almaktadır (Normanno ve ark., 2007; EFSA, 2021; Li ve ark., 2022). *S. aureus* hayvansal kaynaklı gıdalardan sığır eti, tavuk eti, balık eti, çiğ süt ve tüketime hazır gıdalardan çoğunlukla izole edilmekte ve stafilokokal intoksikasyonlardan sorumlu tutulmaktadır (Aydın ve ark., 2011; Keyvan ve Özdemir, 2016; Ercoli ve ark., 2017; Li ve ark., 2018; Saka ve Terzi Gülel, 2018; Chen ve Xie, 2019; Sahin ve ark., 2020). Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi'nin (EFSA) raporuna göre gıda kaynaklı salgınlar içinde bakteriyel toksinlerin üst sıralarda yer aldığı ve salgınların %19,6'sına sebep olduğu bildirilmektedir. Nitekim, Avrupa Birliği üye ülkelerinde 2021 yılında, gıda kaynaklı salgınlarda *S. aureus* toksinlerinin en fazla hastaneye yatışa sebep etkenlerden biri olduğu ve 640 gıda kaynaklı salgın rapor edilmiştir (EFSA, 2021).

S. aureus birçok hayvan türünde ve insanlarda çeşitli enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Bu etkenin; hayvanlarda apseler, irinli olgular, mastitis, meme impetigosu, dermatitis, artiritis, septisemi ve omfalitise neden olduğu bildirilmektedir (Quinn ve ark., 2002). İnsanlarda ise, *S. aureus* hastane kaynaklı (nozokomiyal) enfeksiyonları oluşturan etkenlerin başında gelmekte olup septisemi, osteomyelitis, meningitis, invazif endokarditis ve toksik şok sendroma (TSS) neden olmaktadır (Li, 2018).

Virulent ve non-virulent suşlar arasındaki farkların bilinmesi mikroorganizmaların potansiyel virülens faktörlerinin halk sağlığına etkilerinin değerlendirilmesi açısından oldukça önemlidir (Li ve ark., 2022). *S. aureus* koagülaz (*coa*), clumping factor (*clfA*), protein A (*spa*) gibi pek çok virülens faktörüne sahiptir (Karahan ve ark., 2011; Jenul ve Horswill, 2018). Ayrıca, *S. aureus*'ün patojenitesine katkıda bulunan ekstraselüler toksinler örneğin stafilokokal enterotoksinler (SEs), eksfoliatif toksinler (ET), Panton-Valentin lökositidin (PVL) ve Toksik şok sendromu toksini (TSST-1) bulunmaktadır (Dinges ve ark., 2000; Pereira ve ark., 2009; Sahin ve ark., 2020).

Günümüzde de *S. aureus* izolatlarında fenotipik olarak koagülaz üretimi varlığının tespiti bu etkenin patojen olduğunun göstergesi olarak kabul edilmektedir (Tiwari ve ark., 2008; Thomas ve ark., 2019). Ancak, PZR gibi moleküler yöntemlerin geliştirilmesiyle hem koagülaz geni hem de diğer virülens faktörlerinin (*clfA* ve *spa*) varlığının ortaya konulması daha çok kabul görmüştür (Salasia ve ark., 2004). Stafilokokal Protein A (*spa*), IgG'nin kristalize olan olan fragment (Fc) kısmını bağlayarak virülense katkıda bulunduğu düşünülen önemli bir hücre duvarı komponentidir. Aynı zamanda *spa*'nın IgG bağlayan bölgesinin bulunması sonucunda polimorf nükleer lökositlerin fagositozisinde zayıflama veya inhibisyon meydana geldiği tespit edilmiştir (Fox ve ark., 2000). *Spa*'yı kodlayan gen fonksiyonel olarak; Fc bağlayan bölge, X bölgesi ve C terminalinde hücre duvarına tutunmayı sağlayan bir bölgeden oluşmaktadır. Bu protein A'nın (*spa*) değişken ve tekrar bölgelerinin tiplendirilmesi ile dirençli izolatların analizinin yanı sıra salgın ve

enfeksiyon kontrolünde yaygın olarak kullanılabilceği belirtilmektedir (Frenay ve ark., 1996; Latifpour ve ark., 2022; Maeda ve ark., 2022).

Clumping faktör A (*clfA*) özellikle *S. aureus* enfeksiyonlarının erken fazları esnasında rol alan ve önemli bir virülens faktör olarak kabul edilmektedir. Hem çözünebilir hem de sabit fibrinojeni ve fibrini bakteriyel bağlama yeteneğinde olan clumping faktörün fenotipik olarak tespitinde yanlış negatif sonuçlar elde edildiği için bu faktörü kodlayan genin (*clfA*) moleküler yöntemler ile ortaya konması oldukça önemlidir. Özellikle yeni ilaçların belirlenmesinde *S. aureus* virülens faktörlerinin tespiti bu alandaki çalışmalar için önemli bir yaklaşım olmuştur (Wang ve ark., 2016; Thomas ve ark., 2019).

Et örneklerinden izole edilen *S. aureus* suşlarında *coa*-PZR ile *spa* gen polimorfizmleri tespitinin konvansiyonel yöntemlere karşı iyi bir alternatif olarak kullanılabilceği ve dolayısıyla stafilokokal enfeksiyonlara karşı etkili stratejilerin geliştirilmesi yönünde faydalı veriler sağlayacağı düşünülmektedir. Daha önceki çalışmamızda tüketime sunulan farklı hayvan türlerine (sığır, koyun, keçi ve tavuk) ait etler, çalışanların el svap örnekleri ve gıdaların temas ettiği yüzeylerden elde edilen örneklerde Stafilokokal Enterotoksin (SE) ve Toksik Şok Sendrom Toksin (*tsst*) gen varlığı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile saptanmıştı (Sahin ve ark., 2020). Bu çalışmada ise farklı hayvan türlerine (sığır, koyun, keçi ve tavuk) ait etlerden ve gıdaların temas ettiği yüzeylerden elde edilen örneklerde *S. aureus*'ün önemli virülens genlerinden koagülaz (*coa*), clumping faktör (*clfA*) ve protein A (*spa*)'nın moleküler yöntemlerle araştırılması amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Materyal ve Metot

Örneklerin Alınması

Bu çalışma, Sivas ilindeki işletmeler (mezbaşa, gıda üretim tesisleri), marketler, kasaplar, yerel pazarlar ve çeşitli satış noktalarından sığır, koyun, keçi ve tavuk eti olmak üzere her bir hayvan türünden 100 adet olmak üzere toplamda 400 et örneği toplandı. Gıda maddelerine ek olarak gıda üretim yerlerindeki yüzeylerden (n=50) de örnekler alındı. Gıda maddelerinin üretildiği yüzeylerden örnek alınmasında da svap-rins tekniği kullanıldı (Legnani ve ark., 2004; Aydın ve ark., 2007). Bu amaçla steril svap çubukları, aseptik koşullarda Brain Heart Infusion Broth içerisine daldırılarak ıslatıldı, yaklaşık 100 cm (10×10 cm) yüzeylere 20 saniye boyunca sürüldü ve daha sonra taşıma besiyerleri içerisine konuldu. Alınan örnekler soğuk zincirde (+4°C) laboratuvara getirilerek en kısa sürede izolasyon ve identifikasyon işlemleri gerçekleştirildi.

S. aureus İzolasyon ve İdentifikasyonu

Örneklerden *S. aureus* izolasyonu EN ISO 6881-1'e göre gerçekleştirildi (ISO 6888-1:1999). Soğuk zincirde laboratuvara getirilen her bir örnekten aseptik koşullarda 25'er g tartılıp steril stomacher poşetlerine konuldu. Örneklerin üzerine 225'er ml steril peptonlu su ilave edilerek, karışım stomacher'da 2 dk süre ile homojenize edildi. Elde edilen homojenizat ve hazırlanan dilüsyonlardan yumurta sarısı içeren Baird Parker Agar'a (BPA Oxoid CM 1127; Egg Yolk Tellurite Emulsion SR0054) yayma plak (0.1 ml) yöntemiyle ekim yapıldı.

Plaklar 37°C'de 24-48 saat aerob koşullarda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda siyah, parlak, konveks, 1-1,5 mm çapında, etrafında dar beyaz bir kuşak ve bunu çevreleyen berrak zon oluşturan lesitinaz pozitif koloniler *S. aureus* şüpheli olarak değerlendirildi. Üreyen şüpheli koloniler fenotipik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla Brain Heart Infuzyon Broth (BHI Oxoid CM 1135) besi yerine inokule edilip 37°C'de 24 saat inkube edildi. BHI'da üreyen şüpheli kültürlerle Gram boyama, katalaz ve koagülaz testleri uygulandı. Elde edilen şüpheli *S. aureus* izolatları ileri analizler için %20 gliserinli Tryptone Soya Broth'a (TSB, Oxoid CM0876) alınarak -20°C'de muhafaza edildi.

DNA Ekstraksiyonu ve Tür Spesifik PZR

Bakterinin genomik DNA ekstraksiyonu Şahin ve ark. (2020)'ın belirttiği şekilde gerçekleştirildi (Karahan ve ark., 2009; Sahin ve ark., 2020). *S. aureus* izolatlarının PZR ile doğrulanmasında Riffon ve ark. (2001) tarafından bildirilen ve etkenin 23S rRNA genine ait primer çifti kullanıldı (Çizelge 1). Toplam 50 µl'lik hacimde hazırlanan PZR karışımına 5 µl 10X PZR buffer, 5 µl 25 mM MgCl₂, deoksiniükleotitlerin her birinden 250 µM, 1.25 U Taq DNA Polymerase enzimi (MBI, Fermentas), etkenin 23S rRNA geninden üretilen primer çiftinin her birinden 50 pmol ve 25 ng template DNA ilave edildi. PZR reaksiyonları BioRad gradient thermalcycler (Biorad-T100TMT Thermal Cycler, USA) cihazında gerçekleştirildi. PZR amplifikasyonunda 94°C'de 2 dk ön denaturasyon aşamasını takiben, toplam 35 PZR siklusu 94°C'de 45 sn denaturasyon, 64°C'de 1 dk hibridizasyon ve 72°C'de 2 dk sentez olarak gerçekleştirildi. Son siklusu takiben 72°C'de 10 dk ekstra sentez işlemi yapıldı. Amplifiye edilen PZR ürünleri %1.5'lük agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutulduktan sonra ethidium bromide (10 mg/ml) ile 30 dk süreyle boyandı ve Ultra Viole (UV) transilluminatörde (Vilber Lourmat Quantum ST4) incelenerek sonuçlar gözlemlendi. Oluşan bantların moleküler ağırlığını saptamak amacıyla 100 bç'lik DNA ladder (MBI, Fermentas SM0321) kullanıldı. PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi neticesinde oluşan 1318 bç moleküler uzunluğundaki bantlar *S. aureus* olarak kabul edildi. Tüm PZR uygulamalarında pozitif kontrol olarak ATCC 25923 referans *S. aureus* suşu ve negatif kontrol olarak distile su kullanıldı (Riffon ve ark., 2001). Çalışmada kullanılan primer sekanslarının listesi Çizelge 1'de verildi. Ayrıca, *S. aureus*'a ait olduğu belirlenen DNA örneklerinde koagülaz (*coa*) geninin varlığı da belirlendi (Goh ve ark., 1992). Amplifikasyon işlemi; 95°C'de 2 dk ön denaturasyon

aşamasını takiben, toplam 30 siklus 95°C'de 30 sn denaturasyon, 58°C'de 2 dk hibridizasyon ve 72°C'de 2 dk sentez olarak gerçekleştirildi. Son siklustan sonra 72°C'de 10 dk ekstra sentez işlemi uygulandı.

Clumping Faktör (*clfA*) Geninin PZR Amplifikasyonu

Toplam 50 µl'lik hacimde hazırlanan PZR karışımına 5 µl 10X PZR buffer (750 mM Tris-HCl, pH 8,8, 200 mM (NH₄)₂SO₄, %0,1 Tween-20), 5 µl 25 mM MgCl₂, deoksiniükleotitlerin her birinden 250 µM, 1.25 U Taq DNA Polymerase enzimi (MBI, Fermentas), Stephan ve ark. (2001) tarafından bildirilen ve *clfA* spesifik oligonükleotid primer çiftinin (Çizelge 1) her birinden 20 pmol ve 25 ng template DNA ilave edildi. PZR reaksiyonları BioRad gradient thermalcycler cihazında gerçekleştirildi. PZR amplifikasyonunda 94°C'de 5 dk ön denaturasyon aşamasını takiben, toplam 35 PZR siklusu 94°C'de 1 dk denaturasyon, 57°C'de 1 dk hibridizasyon ve 72°C'de 1 dk sentez olarak gerçekleştirildi. Son siklusun ardından 72°C'de 5 dk ekstra sentez işlemi yapıldı.

Protein A (*spa*) Geninin PZR Amplifikasyonu

S. aureus izolatlarında *spa* geninin IgG bağlayan bölgesinin varlığını araştırmak amacıyla Seki ve ark. (1998) tarafından bildirilen bir çift spesifik primer kullanılarak PZR işlemi gerçekleştirildi (Çizelge 1). PZR karışımı yukarıda bildirilen yoğunluklarda hazırlandıktan sonra amplifikasyon işlemi; 94°C'de 5 dk ön denaturasyon aşamasını takiben, toplam 30 siklus 94°C'de 1 dk denaturasyon, 58°C'de 1 dk hibridizasyon ve 72°C'de 1 dk sentez olarak gerçekleştirildi. Son siklustan sonra 72°C'de 5 dk ekstra sentez basamağı uygulandı.

S. aureus izolatlarında *spa* geninin X bölgesinin varlığını araştırmak amacıyla Frenay ve ark. (1996) tarafından bildirilen bir çift spesifik primer (Çizelge 1) kullanılarak PZR işlemi gerçekleştirildi. PZR karışımı yukarıda bildirilen yoğunluklarda hazırlandıktan sonra amplifikasyon işlemi; 94°C'de 5 dk ön denaturasyon aşamasını takiben, toplam 30 siklus 94°C'de 1 dk denaturasyon, 60°C'de 1 dk hibridizasyon ve 72°C'de 1 dk sentez olarak gerçekleştirildi. Son siklustan sonra 72°C'de 5 dk ekstra sentez basamağı uygulandı.

Çalışma kapsamında amplifiye edilen PZR ürünleri %1,5'lük agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutulduktan sonra ethidium bromide (10 mg/ml) ile 30 dk süreyle boyandı ve Ultra Viole (UV) transilluminatör altında incelendi.

Çizelge 1. PZR analizlerinde genlere özgü kullanılan oligonükleotid primerler

Table 1. The genes spesific oligonucleotide primers used in PCR analysis

Primer	Gen Bölgesi	Sekans (5'-3')	Büyükük (bç)	Kaynak
Sau327	23S rRNA	GGACGACATTAGACGAATCA	1318	(Riffon ve ark., 2001)
Sau1645	23S rRNA	CGGGCACCTATTTTCTATCT		
Coa-1	<i>coa</i>	CGAGACCAAGATTCAACAAG	Polimorfizm	(Goh ve ark., 1992)
Coa-2	<i>coa</i>	AAAGAAAACCACTCACATCA		
ClfA-1	<i>clfA</i>	GGC TTC AGT GCT TGT AGG	Polimorfizm	(Stephan ve ark., 2001)
ClfA-2	<i>clfA</i>	TTTTTCAGGGTCAATATAAGC		
Spa-1	<i>spa</i>	CACCTG CTG CAA ATG CTG CG	Polimorfizm	(Seki ve ark., 1998)
Spa-2	<i>spa</i>	GGC TTG TTG TTG TCT TCC TC		
Spa-III	<i>spa</i>	CAA GCA CCA AAA GAG GAA	Polimorfizm	(Frenay ve ark., 1996)
Spa-IV	<i>spa</i>	CAC CAG GTT TAA CGA CAT		

Çizelge 2. *coa* pozitif *Staphylococcus aureus* izolatlarında *spa*-X gen bölgesinin PZR sonuçlarıTable 2. PCR amplification results of X domain of *spa* gene in *coa*-positive *Staphylococcus aureus* isolates

İzolat sayısı (%)	Amplikon büyüklüğü (bç)	Tekrar ünitesi
60 (54,5)	290	10
18 (16,3)	350	12
13 (11,8)	320	11
9 (8,2)	210	7
4 (3,6)	190	6
3 (2,7)	240	8
3 (2,7)	270	9

Bulgular

Farklı hayvan türlerine (sığır, koyun, keçi ve tavuk) ait et ve gıdaların hazırlandığı yüzey örneklerinden oluşan toplam 450 numunenin %24,4'ü (110/450) kültür ve biyokimyasal test sonucu *S. aureus* olarak tanımlandı. Bu izolatlardan 29'u (29/100; %29) sığır, 24'ü (24/100; %24) koyun, 14'ü (14/100; %14) keçi, 32'si (32/100; %32) tavuk ve 11'i (11/50; %22) yüzey orijinli örneklerden elde edildi.

Bu çalışmada farklı hayvan türlerine (sığır, koyun, keçi ve tavuk) ait et ve gıdaların hazırlandığı yüzey örneklerinden elde edilen 110 adet *S. aureus* izolatın (%24,4) tamamının *coa* genine özgü bantlar oluşturduğu saptandı. Yaklaşık olarak 800 bç moleküler uzunlukta tek bant oluşturan PZR ürünü toplam 45 (%40,9) izolatla saptandı ve en yaygın profil olduğu gözlemlendi. Bu profili sırasıyla 30 (%27,2) izolatla 750 bç, 17 (%15,5) izolatla 950 bç, 11 izolatla (%10) 700 bç, 7 izolatla (%6,4) 1400 bç'lik bant veren profiller oluşturdu. Bant oluşturan *coa* pozitif izolatlarda beş farklı moleküler uzunlukta amplifikasyon ürünleri tespit edildi (Şekil 1).

Farklı hayvan türlerine (sığır, koyun, keçi ve tavuk) ait et ve gıdaların hazırlandığı yüzey örneklerinden elde edilen *S. aureus* izolatların tamamının *clfA* geni taşıdığı da belirlendi. Bu *clfA* genlerinin herhangi bir polimorfizm göstermedikleri tespit edildi. İzolatların moleküler uzunluğu 1000 bç olan amplifikasyon ürünleri saptandı (Şekil 2).

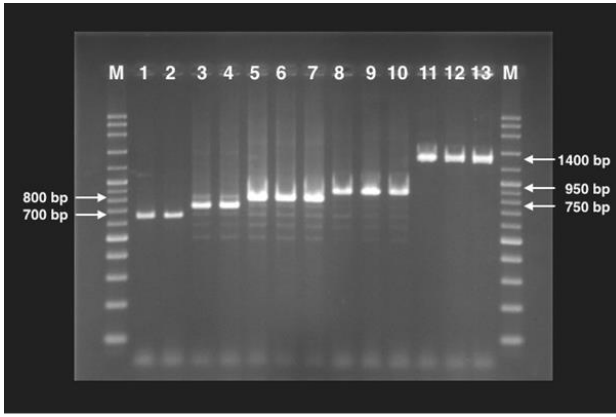
Et ve yüzey örneklerinden elde edilen *S. aureus* izolatlarının (n=110) tamamında *spa*-IgG bağlayan bölgesini kodlayan gen yönünden 920 bp moleküler uzunlukta amplifikasyon ürünleri bulundu (Şekil 3).

Bu çalışmada *spa*-X bölgesini kodlayan gene spesifik primerler ile yapılan PZR sonucunda izolatların tamamında bu genin varlığı saptandı. *spa*-X gen bölgesinin yaklaşık olarak 190, 210, 240, 270, 290, 320 ve 350 bç arasında değişen yedi farklı moleküler uzunlukta amplifikasyon ürünleri tespit edildi. Çalışma kapsamında 290 bç büyüklüğünde 10 tekrar birimli ürün oluşturan izolatlar baskın olarak belirlendi (n=60; %54,5). Diğer taraftan, 10'dan az izolatın sırasıyla 210, 190, 240 ve 270 bç moleküler uzunluklarda yedi, altı, sekiz ve dokuz tekrar birimi elde edildi (Çizelge 2) (Şekil 4).

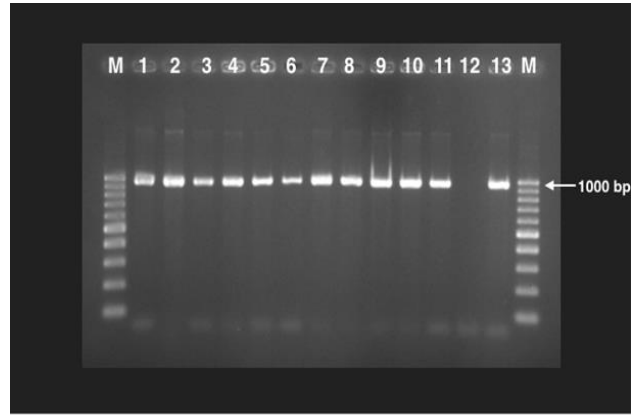
Tartışma

S. aureus hem insan hem de hayvanlar için patojen bir tür olup, gıda kaynaklı intoksikasyonların en önemli nedenlerinden biridir. *S. aureus* izolatlarının virülens genlerinin belirlenmesi patojenik türlerin identifikasyonunda fenotipik yöntemlerin yanı sıra

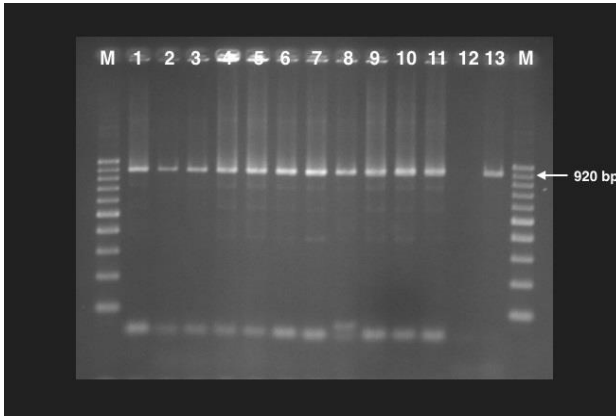
belirleyici olarak kullanılmaktadır (Tiwari ve ark., 2008; Thomas ve ark., 2019). Bu amaçla koagülaz, clumping faktör ve protein A gibi önemli virülens genleri kullanılmaktadır (Wang ve ark., 2016). Nitekim, koagülaz fibrinojeni fibrine dönüştürerek plazmayı pıhtılaştırıcı hücre dışı bir proenzimdir. *S. aureus* için patojenite kriteri olarak kabul edilen bu enzimin saptanması, patojen stafilkokları koagülaz negatif stafilkoklardan ayırt etmek için rutin test olarak kullanılmaktadır (Tiwari ve ark., 2008; Thomas ve ark., 2019). Fenotipik olarak *S. aureus* olarak tanımlanan izolatlarda *coa* gen varlığının ve bu geni taşıyan suşlardaki genetik polimorfizmin belirlenmesi ile koagülaz üretiminin fagositoz gibi konakçı savunmasıyla karşılaştığında bakteriyel üremeyi sağladığı ve dolayısıyla enfeksiyonu arttırdığı göz önüne alınacak olursa, bu faktördeki genetik yapı farklılıklarının ortaya konmasının önemi anlaşılabilir (Aarestrup ve ark., 1995; Noerem ve ark., 2020). Ayrıca, *coa* geninin PZR amplifikasyonu, tüp koagülaz testi ile karşılaştırıldığında altın standart olarak kabul edilmektedir (Tiwari ve ark., 2008; Kadiroğlu ve ark., 2019). Bu çalışmada, örneklerden elde edilen koagülaz pozitif *S. aureus* izolatlarının yaklaşık %68,2'sinde 800 bç (%40,9) ve 750 bç (%27,2) moleküler ağırlığa sahip amplifikasyon ürünleri elde edildi. Aynı yöntem ve COAG2 - COAG3 primerleri kullanılarak yapılan önceki çalışmalarda hayvan orijinli *S. aureus* izolatlarında sadece tek banttan oluşan amplifikasyon ürünleri saptanmıştır (Schlegelova ve ark., 2003). Ancak, *Coa*-PZR'da çift bant oluşması, insan orijinli bazı izolatlarda gözlemlenmiş olup (Goh ve ark., 1992; Naorem ve ark., 2020), bu durum çalışan kişilerin ellerinden kaynaklanan bir kontaminasyonu akla getirmektedir. Ancak yine de bulaşmada önemli bir rolü bulunan personelin gerekli hijyenik tedbirleri almasıyla, özellikle çıplak elle işlem yapılan işletmelerde, bulaşmaların minimum seviyelere indirilmesinin sağlanabileceği ve dolayısıyla gıda zehirlenmelerine karşı yapılan kontrol ve eradikasyon çalışmalarında bu durumun göz önünde bulundurulması gerektiği kanısına varıldı. Bu çalışmada çift bant amplifikasyon ürünü gözlemlenmedi. Ancak, Gökdağ ve Çiftçi (2021) tarafından mastitisli sığırlardan izole edilen stafilkoklarda virülens gen profillerini inceledikleri bir çalışmada 86 *S. aureus* izolatının 61 (%70,9)'inde *coa* geni tespit edilmiş ve *coa* geni pozitif izolatlarda on farklı gen polimorfizmi tespit edilmiştir. Araştırmacılar, mastitisli sığırlardan elde edilen *S. aureus* izolatlarında *coa* geni açısından polimorfizmlerin bulunmasının izolatların farklı olması ile açıklamışlardır.



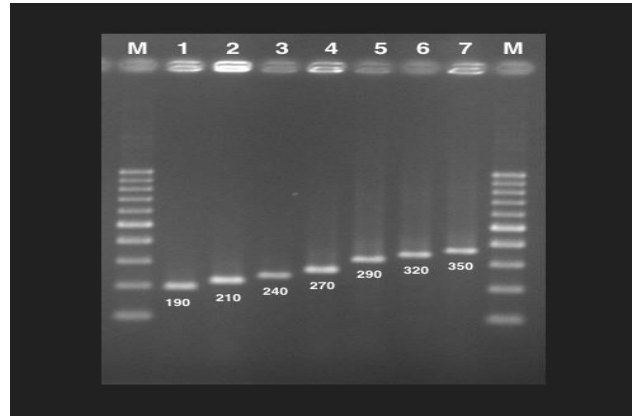
Şekil 1. *Staphylococcus aureus* izolatlarının *coa*-PZR ürünlerinin elektroforez jel görüntüsü (M: DNA Ladder (100 bç), 1-2: 700 bç amplifikasyon ürünleri, 3-4: 750 bç amplifikasyon ürünleri, 5-7: 800 bç amplifikasyon ürünleri, 8-10: 950 bç amplifikasyon ürünleri, 11-13: 1400 bç amplifikasyon ürünleri).
Figure 1. Agarose gel electrophoresis of *coa*-PCR results in *Staphylococcus aureus* isolates. (M: 100 bp DNA Ladder, 1-2: Isolates forming bands at the size of 700 bp; 3-4: 750 bp, 5-7: 800 bp, 8-10: 950 bp, 11-13: 1400 bp).



Şekil 2. *Staphylococcus aureus* izolatlarının *clfA* genine ait elektroforez jel görüntüsü (M: 100 bç DNA Ladder, 1-11: 1000 bç bant oluşturan örnekler, 12: Negatif Kontrol, 13: Pozitif Kontrol (ATCC 25923)).
Figure 2. Agarose gel electrophoresis of *clfA* PCR results in *Staphylococcus aureus* isolates. (M: 100 bp DNA Ladder, 1-11: Isolates forming bands at the size of 1000 bp; 12: Negative control, 13: Positive control-ATCC 25923).



Şekil 3. *Staphylococcus aureus* izolatlarının Protein A (*spa*)'nın IgG bağlayan bölgesini kodlayan genin elektroforez jel görüntüsü (M: 100 bç DNA Ladder, 1-11: 920 bç bant oluşturan örnekler, 12: Negatif Kontrol, 13: Pozitif Kontrol (ATCC 25923)).
Figure 3. Agarose gel electrophoresis of Protein A *spa*-IgG PCR results in *Staphylococcus aureus* isolates. (M: 100 bp DNA Ladder, 1-11: Isolates forming bands at the size of 920 bp; 12: Negative control, 13: Positive control-ATCC 25923)



Şekil 4. *Staphylococcus aureus* izolatlarının Protein A'nın *spa-X* bölgesini kodlayan genin elektroforez jel görüntüsü (M: 100 bç DNA Ladder, 1: 190 bç, 2: 210 bç, 3: 240 bç 4: 270 bç 5: 290 bç, 6: 320 bç, 7: 350 bç).
Figure 4. Agarose gel electrophoresis of Protein A *spa-X* PCR results in *Staphylococcus aureus* isolates. (M: 100 bp DNA Ladder, 1: 190 bp; 2: 210 bp, 3: 240 bp 270 bp 5: 290 bp, 6: 320 bp, 7: 350 bp).

Bu çalışmada *S. aureus* izolatının tamamının *clfA* genini taşıdığı tespit edildi. Daha önce yapılan çalışmaların büyük çoğunluğunda da *coa* geni yönünden pozitif *S. aureus* izolatlarının hepsinde *clfA* geninin de pozitif olduğu rapor edilmiştir (Reinoso ve ark., 2008; Karahan ve ark., 2011). Farklı hayvan türlerine (sığır, koyun, keçi ve tavuk) ait et ve gıdaların hazırlandığı yüzey örneklerinden elde edilen *S. aureus* izolatlarında *clfA* geni yönünden pozitif bulunan örneklerin tamamı yaklaşık olarak 1000 bç moleküler uzunluğunda bant oluşturdu. Bu çalışmaya benzer şekilde Salasia ve ark. (2004) inceledikleri izolatların tamamında yaklaşık olarak 1000 bç'lik bir amplikon elde etmişler ve bu gen bölgesi için herhangi bir polimorfizme rastlamamışlardır. Ancak, bazı çalışmalarda bulunan sonuçlarda incelenen izolatların çoğunda 1000 bç moleküler uzunluğundaki amplikonların yanı sıra az sayıdaki izolatta yaklaşık olarak 900-950 bç uzunluğunda amplikonlar da tespit edilmiştir (Reinoso ve ark., 2008; Karahan ve ark., 2011).

S. aureus'un kolonizasyonu konakçı hücre yüzeyine tutunması ile başlar ve bu bakteride bulunan adezinler aracılığıyla gerçekleşmektedir. *S. aureus*'ta bulunan adezinlerin çoğu, Protein A (*spa*) olarak adlandırılan hücre peptidoglikanlarında bulunan proteinlerdir (Berry ve ark., 2022). *S. aureus* izolatlarında hem *spa*'nın IgG bağlayan bölgesinin hem de X bölgesinin PZR ile amplifikasyonu ve ardından tekrar ünitelerinin sayısının analiz edilmesi özellikle farklı orijinli izolatların ayrımı için uygun bir metot olarak kabul edilmektedir (Frenay ve ark., 1996; Latifpour ve ark., 2022). Çalışma kapsamında farklı hayvan türlerine ait et ve gıdaların hazırlandığı yüzey örneklerinden elde edilen izolatların tamamında yaklaşık olarak 920 bç moleküler uzunlukta amplikonlar tespit edildi. Karahan ve ark. (2011) tarafından önceki çalışmada *spa*-IgG'nin 920 bç ve 750 bç uzunluğunda amplikon oluşturan ürünler içerdikleri bildirilmiştir. Ancak, Reinoso ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada, sığırlardan elde edilen izolatların tamamında 920 bç'lik amplikon tespit ederken

insan izolatlarında 750 bç'lik ampikonları da gözlemlediklerini bildirmişlerdir (Reinoso ve ark., 2008). Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre hem yüzey hem de et örneklerinden sadece 920 bç'lik ampikonlar elde edildi ve daha önce yapılan çalışmaların sonuçları birlikte değerlendirildiğinde sığır mastitislerinden elde edilen *S. aureus* izolatları ile insan izolatları arasında bir ilişkinin bulunabileceği düşünülebilir. Bu durum muhtemelen et işleme üretimi esnasında gıda işçileri tarafından kaynaklanan bir kontaminasyondan dolayı olabilmektedir.

Et ve yüzey örneklerinde elde edilen izolatların tamamında *spa*'nın X bölgesinde yaklaşık olarak 190, 210, 240, 270, 290, 320 ve 350 bç moleküler uzunlukta ve sırasıyla 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12 tekrar ünitesine sahip olan ampikonlar elde edildi. *spa*'nın X bölgesinin çoğaltılması *S. aureus* izolatları arasındaki farklılıkların çok kısa bir sürede ortaya konması için uygun bir hedef gen bölgesi olarak gösterilmiştir (Reinoso ve ark., 2008; Karahan ve ark., 2011). Özellikle tekrar ünitesinin sayısına göre farklı orijinli izolatlar ilişkilendirilebilir veya aynı orijinli izolatlarda dağılımın ne oranda olduğu tespit edilmek suretiyle coğrafik olarak farklı bölgelerdeki izolatlar arasındaki ilişkiler ortaya konabilir. Bu çalışmada predominant olarak 290 bç büyüklüğünde 10 tekrar ünitesine sahip izolatlar baskın olarak belirlendi (n=60; %54,5). Bunu sırasıyla 12, 11 ve 7 tekrar ünitesine sahip izolatlar izledi. Karahan ve ark. (2011) sığır orijinli izolatlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, bu çalışmada elde edilen bulgulara yakın bulgular tespit etmişlerdir (n=56; %60,9). Bu çalışma ile Türkiye'deki *S. aureus* izolatları arasında yediden daha fazla tekrar ünitesine sahip olan suşların daha yaygın olduğu belirlendi. *spa*'nın X bölgesi PZR sonuçlarına bakıldığında; 6-12 arasında değişen sayıda tekrar ünitesine sahip yedi farklı moleküler uzunlukta ampikon tespit edilmesi, bu bölgenin amplifikasyonunun *coa*-PZR amplifikasyonuna göre ayırım gücünün daha yüksek olduğu kanısını doğurmaktadır.

Sonuç

Sivas ilinden toplanan farklı hayvan türlerine ait et ve yüzey örneklerinden elde edilen *S. aureus* izolatlarında, önemli virülens genlerinden koagülaz (*coa*), clumping faktör (*clfA*) ve protein A (*spa*)'nın IgG ile *spa*-X bölgesinin de bulunduğu tespit edildi. Bu gen bölgelerindeki polimorfizmlerin saptanması ve elde edilen bulguların değerlendirilmesiyle, özellikle *spa* geninin X bölgesinin PZR amplifikasyon sonuçlarının *S. aureus* izolatlarının dağılımı hakkında detaylı bilgiler edinilmesi açısından son derece faydalı bir metot olarak *coa* genine alternatif olarak kullanılabilir. Ayrıca, *S. aureus* izolatlarındaki virülens genlerinin geleneksel yöntemlere göre çok sayıda örneğin hızlı bir şekilde tespit edilmesi stafilokokal enfeksiyonlara karşı etkili kontrol stratejilerinin geliştirilmesi ve halk sağlığının korunmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Farklı kaynaklardan elde edilen Stafilokok izolatları ile daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Teşekkür

Bu çalışma, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından CÜBAP V-014 numaralı grup araştırma projesi olarak desteklenmiştir.

Çıkar Çatışması

Yazar/Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

Kaynaklar

- Aarestrup FM, Dangler CA, Sordillo LM. 1995. Prevalence of coagulase gene polymorphism in *Staphylococcus aureus* isolates causing bovine mastitis. Canadian Journal of Veterinary Research, 59: 124-128.
- Aydin A, Sudagidan M, Muratoglu K. 2011. Prevalence of staphylococcal enterotoxins, toxin genes and genetic-relatedness of foodborne *Staphylococcus aureus* strains isolated in the Marmara Region of Turkey. International Journal of Food Microbiology, 148(2): 99-106. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.007.
- Aydın A, Aksu H, Arun ÖÖ. 2007. Evaluation of hygienic properties of food handlers and equipment in food production and sales units. Medycyna Weterynaryjna, 63(9): 1067-1070.
- Berry KA, Verhoef MT, Leonard AC, Cox G. 2022. *Staphylococcus aureus* adhesion to the host. Annals of the New York Academy of Sciences Journal, 1515(1): 75-96. DOI: 10.1111/nyas.14807.
- Castro A, Silva J, Teixeira P. 2018. *Staphylococcus aureus*, a food pathogen: Virulence factors and antibiotic resistance. In: Holban AM, Grumezescu AM (editors). Foodborne Diseases, Academic Press, pp. 213-238, ISBN 978-0-12-811444-5.
- Chen Q, Xie S. 2019. Genotypes, enterotoxin gene profiles, and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* associated with foodborne outbreaks in Hangzhou, China. Toxins, 11: 307. DOI: 10.3390/toxins11060307.
- Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clinical Microbiology Reviews, 13(1): 16-34.
- EFSA/ECDC, 2022. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. EFSA Journal 20(12): 7666, 273. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7666>, [Erişim Tarihi: 14 Ocak 2023].
- Ercoli L, Gallina S, Nia Y, Auvray F, Primavilla S, Guidi F, ... Scuto S. 2017. Investigation of a staphylococcal food poisoning outbreak from a Chantilly cream dessert, in Umbria (Italy). Foodborne Pathogens and Disease, 14(7): 407-413. DOI: 10.1089/fpd.2016.2267.
- Fox LK, Ferens WA, Bohach GA, Bayles KW, Davis WC. 2000. *Staphylococcus aureus*: Super Mastitis Pathogen. Proc. 39th Annual Meeting National Mastitis Council, Inc. Atlanta, GA. 98-103.
- Frenay HM, Bunschoten AE, Schouls LM, van Leeuwen WJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Verhoef J, Mooi FR. 1996. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of Protein A gene polymorphism. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 15: 60-64.
- Goh S, Byrne SK, Zhang JL, Chow AW. 1992. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. Journal of Clinical Microbiology, 30 (7): 1642-1645.
- Gökdağ MO, Çiftçi A. 2021. Antibiotic resistance and virulence gene profiles in *Staphylococci* isolated from cattle with mastitis. Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences, 6(3): 395-402. DOI:10.35229/jaes.954156.
- Jenul C, Horswill AR. 2018. Regulation of *Staphylococcus aureus* virulence. Microbiology Spectrum, 7(2): 7-2. DOI:10.1128/microbiolspec.GPP3-0031-2018.

- ISO, 1999. International Organization for Standardization, (EN ISO 6888-1), Microbiology of food and animal feeding stuffs: Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species). Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium. ISO, Geneva, Switzerland.
- Kadiroğlu P, Korel F, Ceylan Ç. 2019. Identification of *Staphylococcus aureus* cheese isolates with respect to virulence properties, genetic relatedness and antibiotic resistance profiles. Food and Health, 5(3): 149-159. DOI: 10.3153/FH19016.
- Karahana M, Acik MN, Cetinkaya B. 2011. Investigation of virulence genes by PCR in *Staphylococcus aureus* isolates originated from subclinical bovine mastitis in Turkey. Pakistan Veterinary Journal, 31(3): 249-253.
- Karahana M, Acik MN, Cetinkaya B. 2009. Investigation of toxin genes by polymerase chain reaction in *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Turkey. Foodborne Pathogens and Disease, 6 (8): 1029-1035. DOI: 10.1089/fpd.2009.0304.
- Keyvan E, Ozdemir H. 2016. Sığır Karkaslarında *Staphylococcus aureus*'un varlığı, enterotoksijenik özellikleri ve antimikrobiyal dirençliliği. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 63: 17-23.
- Latifpour M, Narimani T, Sadeghi A, Niakan M. 2022. Determination of virulence factors and resistance profile of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains among different types of spa, agr, and SCCmec. BioMed Research International, 2022, 1-8. DOI: 10.1155/2022/5863310.
- Legnani P, Leoni E, Berveglieri M, Mirolo G, Alvaro N. 2004. Hygienic control of mass catering establishments, microbiological monitoring of food and equipment. Food Control, 15 (3): 205-211. DOI: 10.1016/S0956-7135(03)00048-3.
- Li X, Zhang J, Zhang H, Shi X, Wang J, Li K, ... Zhao C. 2022. Genomic analysis, antibiotic resistance, and virulence of *Staphylococcus aureus* from food and food outbreaks: A potential public concern. International Journal of Food Microbiology, 16: 377, 109825. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109825.
- Li S, Wan, P, Zhao J, Zhou L, Zhang P, Fu C, ... Wang X. 2018. Characterization of toxin genes and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* from retail raw chicken meat. Journal of Food Protection, 81(4): 528-533. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-17-309.
- Li Z. 2018. A review of *Staphylococcus aureus* and the emergence of drug-resistant problem. Advances in Microbiology, 8(1): 65-76. DOI: 10.4236/aim.2018.81006.
- Maeda R, Kobayashi H, Higashidani M, Matsuhisa T, Sawa A, Miyake K, ... Yamanaka H. 2022. Molecular epidemiological and pharmaceutical studies of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated at hospitals in Kure City, Japan. Access Microbiology, 4(2): 000319. doi: 10.1099/acmi.0.000319.
- Naorem RS, Urban P, Goswami G, Fekete C. 2020. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* through genomics approach. 3 Biotech, 10(9): 401. doi: 10.1007/s13205-020-02387-y.
- Normanno G, Corrente M, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, Parisi A, Greco G, Bellacicco AL, Virgilioc S, Celano GV. 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. International Journal of Food Microbiology, 117(2): 219-222. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.04.006.
- Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. 2002. Veterinary Microbiology and Microbial Diseases. Wiley-Blackwell Science Ltd, Oxford.
- Pereira V, Lopes C, Castro A, Silva J, Gibbs P, Teixeira, P. 2009. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. Food Microbiology, 26(3): 278-282. DOI: 10.1016/j.fm.2008.12.008
- Reinos EB, El-Sayed A, Lammler C, Bogni C, Zschock M. 2008. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. Microbiological Research, 163(3): 314-322. DOI: 10.1016/j.micres.2006.05.013.
- Riffon R, Sayasith K, Khalil H, Dubreuil P, Drolet M, Lagace J. 2001. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. Journal of Clinical Microbiology, 39(7): 2584-2589. DOI: 10.1128/JCM.39.7.2584-2589.2001.
- Sahin, S, Mogulkoc MN, Kalin R, Karahana M. 2020. Determination of the important toxin genes of *Staphylococcus aureus* isolated from meat samples, food handlers and food processing surfaces in Turkey. Israel Journal of Veterinary Medicine, 75(2): 42-49.
- Saka E, Terzi Gulel G. 2018. Detection of enterotoxin genes and methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from water buffalo milk and dairy products. Journal of Food Science, 83(6): 1716-1722. DOI: 10.1111/1750-3841.14172.
- Salasia SIO, Khusnan Z, Lämmler C., Zschöck M. 2004. Comparative studies on pheno and genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in Central Java in Indonesia and Hesse in Germany. Journal of Veterinary Science, 5(2): 103-109.
- Schlegelova J, Dendis M, Benedik J, Babak V, Rysanek D. 2003. *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cows and humans on a farm differ in coagulase genotype. Veterinary Microbiology, 92(4): 327-334. DOI: 10.1016/s0378-1135(02)00409-1.
- Seki K, Sakurada J, Seong HK, Murai M, Tachi H, Ishii H, Masuda S. 1998. Occurrence of coagulase serotype among *Staphylococcus aureus* strains isolated from healthy individuals special reference to correlation with size of protein-A gene. Microbiology and Immunology, 42(5): 407-409. DOI: 10.1111/j.1348-0421.1998.tb02302.x.
- Stephan R, Annemuller C, Hassan AA, Lammler C. 2001. Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in North-East Switzerland. Veterinary Microbiology, 78(4): 373-382. DOI: 10.1016/s0378-1135(00)00341-2.
- Thomas S, Liu W, Arora S, Ganesh V, Ko YP, Höök M. 2019. The complex fibrinogen interactions of the *Staphylococcus aureus* coagulases. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 16; 9: 106. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00106. eCollection 2019.
- Tiwari HK, Sapkota D, Sen MR. 2008. Evaluation of different tests for detection of *Staphylococcus aureus* using coagulase (*coa*) gene PCR as the gold standard. Nepal Medical College Journal, 10(2): 129-131.
- Wang D, Zhang L, Zhou X, He Y, Yong C, Shen M, ... Han B. 2016. Antimicrobial susceptibility, virulence genes, and randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from bovine mastitis in Ningxia, China. Journal of Dairy Science, 99(12): 9560-9569. DOI: 10.3168/jds.2016-11625.