



T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY
ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIĞIR, KOYUN VE KEÇİ SÜTLERİNDEN İZOLE EDİLEN
STAPHYLOCOCCUS AUREUS İZOLATLARINDA METİSİLİN
VE ANTİSEPTİK DİRENÇ GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim Azra DEMİRCİ ÖZDEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Dilek ÖZTÜRK

BURDUR- 2023

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIĞIR, KOYUN VE KEÇİ SÜTLERİNDEN İZOLE EDİLEN
STAPHYLOCOCCUS AUREUS İZOLATLARINDA METİSİLİN
VE ANTİSEPTİK DİRENÇ GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Azra DEMİRCİ ÖZDEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Dilek ÖZTÜRK

Bu Araştırma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 0867-YL-23/2017K12-41003 proje numarası ile desteklenmiştir.

BURDUR- 2023

TEŞEKKÜR

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesinde almış olduğum lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca kendimi geliştirmemde öğretici ışığından her zaman fazlasıyla faydalanmamı sağlayan ve her konuda destek olan başta değerli danışman hocam Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Dilek ÖZTÜRK'e, eğitim sürem boyunca eğitimime katkıda bulunan saygıdeğer hocalarım Sayın Prof. Dr. Faruk PEHLİVANOĞLU'na, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ezgi ŞABABOĞLU BAYTAROĞLU'na, desteğini, yardımlarını, tavsiyelerini ve bilgilerini benden hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Öğr. Gör. Sibel YAMAN'a, hayatım boyunca elini hep omzumda hissettiren, küçüklüğümde beri maddi manevi her zaman yanımda olan, varlığıyla güç veren ve bugünlere gelmemde büyük emekleri bulunan anneannem Tayyibe HELVACI'ya, annem Güler DEMİRCİ'ye, babam Selim DEMİRCİ'ye, çalışmam için süt örnekleri toplamamda ve sonrasında her türlü zorluğu aşmamda büyük emekleri olan, tez sürem boyunca stresimi, heyecanımı paylaşan ve bu süreci en güzel şekilde sonlandırmamı sağlayan eşim Mehmet Numan ÖZDEMİR'e, en küçüğünden en büyüğüne üzerimde emeği olan tüm aileme, arkadaşlarıma ve büyüklerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK SAYFASI	i
KABUL VE ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
BEYAN SAYFASI	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
TÜRKÇE ÖZET	x
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	xi
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. <i>Staphylococcus aureus</i> 'un (<i>S. aureus</i>) Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması	5
2.3. <i>S.aureus</i> 'un Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri	5
2.4. <i>S. aureus</i> 'un Metisilin Direnci ve Direnç Mekanizmaları	6
2.4.1. Penisilin Bağlayan Protein 2/2a (PBP2/2a) Varlığı ile Oluşan Direnç	6
2.4.1.1. İntrensek Direnç	9
2.4.1.1.1. Homojen Direnç	9
2.4.1.1.2. Heterojen Direnç	9
2.4.1.2. Sınırdaki (Borderline) Metisilin Direnci	10
2.4.1.3. Mevcut PBP'lerde Beta Laktam Antibiyotik Afinitesinde Azalma ile Oluşan Metisilin Direnç	10
2.5. <i>S.aureus</i> 'un Antiseptiklere Direnç Mekanizması	10
2.5.1. Doğal (İntrensek) Direnç	12
2.5.2. Kazanılmış Direnç	12
2.5.2.1. <i>qacA/B</i> Direnç Mekanizması	13
2.5.2.2. <i>smr</i> Direnç Mekanizması	13
2.6. Antiseptik Direncinin Dünya'daki Durumu	14
2.7. Antiseptik Direncinin Türkiye'deki Durumu	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. Gereç	18
3.1.1. Süt Örnekleri	18
3.1.2. İzolasyonda Kullanılan Besiyerleri	20
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	23
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Tampon Solüsyonlar	26
3.2. Yöntem	27
3.2.1. Süt Örneklerinin Toplanması	27

3.2.2. <i>S. aureus</i> 'un İzolasyon ve İdentifikasyonu	27
3.2.2.1. Katalaz Testi	28
3.2.2.2. Lam Koagülaz Testi	28
3.2.2.3. Mannitol Fermentasyonu	28
3.2.2.4. Deoksiribonükleaz (DNase) testi	28
3.2.2.5. Antibiyotik Duyarlılık Testi	29
3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	29
3.2.3.1. DNA Ekstraksiyonu	29
3.2.3.2. <i>S. aureus</i> 'un PZR ile Doğrulanması	30
3.2.3.3. <i>S. aureus</i> 'un Metisiline Direnç Genlerinin Saptanması	31
3.2.3.3.1. <i>mecA</i> Direnç Geninin Saptanması	31
3.2.3.3.2. <i>mecC</i> Direnç Geninin Saptanması	31
3.2.3.4. <i>S. aureus</i> 'un Antiseptiklere Direnç Genlerinin Saptanması	31
3.2.3.4.1. <i>qacA/B</i> ve <i>smr</i> Direnç Genlerinin Saptanması	31
4. BULGULAR	33
4.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları	33
4.2. PZR Bulguları	36
5. TARTIŞMA	39
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	48
KAYNAKLAR	49
ÖZGEÇMİŞ	63

ŞEKİLLER

Şekil 4.1.	Katalaz testi	33
Şekil 4.2.	Koagülaz testi	33
Şekil 4.3.	Mannitol Salt Agar’da <i>Staphylococcus</i> spp. izolatları	34
Şekil 4.4.	DNase agarda <i>S. aureus</i> izolatları	34
Şekil 4.5.	<i>S. aureus</i> izolatlarında <i>nuc</i> gen varlığı	37
Şekil 4.6.	<i>S. aureus</i> izolatlarında <i>mecA</i> gen varlığı	37
Şekil 4.7.	<i>S. aureus</i> izolatlarında <i>mecC</i> gen varlığı	37
Şekil 4.8.	<i>S. aureus</i> izolatlarında <i>qacA/B</i> gen varlığı	38
Şekil 4.9.	<i>S. aureus</i> izolatlarında <i>smr</i> gen varlığı	38

TABLÖLAR

Tablo 3.1.	Süt örneklerinin alındığı işletmeler ve örnek sayıları	19
Tablo 3.2.	<i>S. aureus</i> , metisiline direnç ve antiseptiklere direnci kodlayan genler, primer dizisi ve PZR ürünleri	25
Tablo 4.1.	Süt örneklerinden izole edilen bakteriler ve dağılımları	33
Tablo 4.2.	<i>S. aureus</i> izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları	35
Tablo 4.3.	<i>S. aureus</i> izolatlarında <i>nuc</i> , <i>mecA</i> , <i>mecC</i> , <i>smr</i> , <i>qacA/B</i> genleri	36

SİMGELER ve KISALTMALAR

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
µl	Mikrolitre
µg	Mikrogram
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
attBsc	Bacterial chromosomal attachment site
BHIB	Brain Heart Infusion Broth
BORSA	Borderline <i>Staphylococcus aureus</i>
bp	Baz çifti
cm	Santimetre
dk	dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
fem	Factor essential for methicillin resistance
FTS	Fizyolojik Tuzlu Su
g	Gram
H ₂ O	Su
HCl	Hidroklorik asit
kb	Kilo baz çifti
kDa	Kilodalton
KPS	Koagülaz Pozitif Stafilokok
KNS	Koagülaz Negatif Stafilokok
MDR	Multidrug efflux
MF	Major facilitator
MODSA	Moderately resistant <i>S. aureus</i>
ml	Mililitre
mm	Milimetre
MSA	Mannitol Salt Agar
MSSA	Metisiline duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i>
MRSA	Metisilin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
PBP	Penisilin Bağlayan Protein
PBP2a	Penisilin Bağlayan Protein 2a
pH	Potansiyel hidrojen
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. albus</i>	<i>Staphylococcus albus</i>
SCC	Stafilokokal kaset kromozomu
SCCmec	Stafilokokal kaset kromozomu mec
Smr	Small multidrug resistance
sn	saniye
TAE	Tris Asetat EDTA
<i>T.pyogenes</i>	<i>Truperella pyogenes</i>
TSB	Trypton Soya Broth
UK	Birleşik Krallık
qac	Quaternary ammonium compounds

ÖZET

Çiftlik hayvanlarından mastitis etkeni olarak en sık izole edilen patojenlerin başında *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) gelmektedir. Antibiyotiklere karşı hızla direnç geliştiren *S. aureus* antiseptik ve dezenfektanlara da direnç geliştirmektedir. Direnç genlerini hem kendi türlerine, hem de diğer bakterilere aktarabildikleri için önemli sorunlara yol açmaktadır. Bu çalışmada, Burdur ili ve çevre köylerinde sığır, koyun ve keçilerden toplanan süt örneklerinden fenotipik testler ile *S. aureus* olarak tanımlanan kolonilerin, genotipik olarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile doğrulanması, *S. aureus* izolatlarında metisilin ve antiseptik direnç genlerinin tespit edilmesi ve antibiyotik duyarlılıklarının incelenmesi amaçlandı. Bu amaçla mastitis problemi bulunan işletmelerden 257 hayvandan (90 sığır, 107 keçi, 60 koyun) 694 adet süt örneği toplandı. Fenotipik testler ile (Gram boyama, katalaz, koagülaz, mannitol salt agar, DNase) 75 izolat *S. aureus* olarak tanımlandı ve 60'ı *nuc* genine spesifik primerler kullanılarak yapılan PZR ile *S. aureus* olarak doğrulandı. Bu izolatlarda metisilin (*mecA*, *mecC*) ve antiseptik (*qacA/B*, *smr*) direnç genlerinin varlığı PZR ile araştırıldı. İneklerden izole edilen *S. aureus* suşlarından 1'inde *mecA* geni tespit edilirken, *S. aureus* izolatlarında *mecC* geni saptanamadı. *S. aureus* izolatlarının 3'ünde *qacA/B* geni, 2'sinde ise *smr* geni belirlendi. Yapılan antibiyotik duyarlılık testleri sonucunda fenotipik olarak *S. aureus* olduğu tanımlanan 60 izolatın 24'ü sefkuinoma, 21'i penisiline, 9'u ampisilin sulbaktama 7'si oksitetrasikline, 6'sı amoksisilin klavulanik aside, 3'ü seftiofura, 2'si oksasiline, 1'i sefaperazona, 1'i sefoksitine dirençli bulundu. Sonuç olarak bu çalışma ile, *S. aureus* izolatlarında metisilin ve antiseptik direnç genlerinin düşük oranda saptanması, Burdur ili ve çevre köylerinde metisilin ve antiseptik direnç genlerinin henüz problem olmadığı, ancak bu bakterinin zoonotik öneme sahip olması nedeniyle halk sağlığı açısından önemli olabileceği kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Antiseptik direnç, Metisilin, PZR, *Staphylococcus aureus*, Süt

ABSTRACT

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) is one of the most frequently isolated pathogens as the causative agent of mastitis from farm animals. *S. aureus*, which rapidly develops resistance to antibiotics, also develops resistance to antiseptics and disinfectants. They cause significant problems because they can transfer resistance genes to both their own species and other bacteria. In this study, it was aimed to genotypically confirm the colonies identified as *S. aureus* by polymerase chain reaction (PCR) using phenotypic tests from milk samples collected from cattle, sheep and goats in Burdur province and surrounding villages, to detect methicillin and antiseptic resistance genes and to examine antibiotic sensitivities. For this purpose, 694 milk samples were collected from 257 animals (90 cattle, 107 goats, 60 sheep) from farms with mastitis problems. 75 isolates were identified as *S. aureus* by phenotypic tests (Gram staining, catalase, coagulase, mannitol salt agar, DNase), and 60 were confirmed as *S. aureus* by PCR using *nuc* gene-specific primers. The presence of methicillin (*mecA*, *mecC*) and antiseptic (*qacA/B*, *smr*) resistance genes in these isolates was investigated by PCR. While the *mecA* gene was detected in only 1 isolate, the *mecC* gene was not detected in *S. aureus* isolates. The *qacA/B* gene was detected in 3 of the *S. aureus* isolates and the *smr* gene was detected in 2 of them. As a result of the antibiotic susceptibility tests, 24 of the 60 isolates identified as phenotypically *S. aureus* 24 were cefquinoma, 21 were penicillin, 9 were ampicillin sulbactam, 7 were oxytetracycline, 6 were amoxicillin-clavulanic acid, 3 were ceftiofura, 2 were oxacillin, 1 was found to be resistant to cefoperazone and 1 to ceftiofura. As a result, with this study, it was concluded that methicillin and antiseptic resistance genes were detected at a low rate in *S. aureus* isolates, and that methicillin and antiseptic resistance genes were not yet a problem in Burdur province and surrounding villages, but that this bacterium may be important for public health due to its zoonotic bloom.

Keywords: Antiseptic resistance, Methicillin, Milk, PZR, *Staphylococcus aureus*

1. GİRİŞ

Hayvan yetiştiriciliğinde antibiyotiklerin tedavi gücü nedeniyle bilinçsiz ve sık kullanımı antibiyotiklere dirençli bakterilerin gelişmesine ve yayılmasına sebep olmaktadır. İlk tanımlanan patojenlerden olan stafilokoklar hızla antibiyotiklere karşı direnç geliştirmeleri nedeniyle insan ve hayvan sağlığı açısından büyük önem taşımakta olup hastane enfeksiyonuna sebep olan etkenlerin başında gelmektedir (Yüce, 2001; Lakhundi ve Zhang, 2019). Stafilokoklar, insan ve hayvanların normal floraları, deri, üst solunum yolları ve bağırsak mukozalarında bulunmaktadır (Atlı, 2007). Çevre koşullarına hızla adapte olabilen ve en patojen tür olarak değerlendirilen *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) mastitis, artritis, pyoderma, otitis eksterna gibi ciddi hayvan hastalıklarına neden olabilmektedir (Quinn ve ark., 1999; Lee, 2003; Ozturk ve ark., 2010). Mastitis, meme bezlerinde görülen travmatik, patolojik ya da bakteriyolojik değişiklikler sebebiyle sütte fiziksel ve kimyasal değişikliklere yol açan meme yangısıdır. Hayvan yetiştiriciliğinde, süt veriminde ve süt kalitesinde azalma ile birlikte ekonomik kayıplara yol açan mastitise en çok bakteriyel etkenler neden olmaktadır (Pearson ve Mackie, 1979; Aydın ve ark., 2006; Büyükcangaz ve ark., 2013). Hayvanların çiğ sütünden çoğunlukla izole edilen patojen *S. aureus*'tur. Bu bakteri tedavi amacıyla kullanılan antibiyotiklere hızla direnç geliştirmektedir (Zschöck ve ark., 2004; Ünal, 2012; Öztürk ve ark., 2019). Stafilokoklarda antibiyotik direnci; 1930'lerde kullanılmaya başlanan sülfonamidlere karşı gelişmiş ardından beta laktamaz, metisilin, vankomisin, linezolid ve daptomisin direnci şeklinde devam etmiştir (Sancak, 2011). Metisilin direnci *S. aureus* suşlarında direnç problemlerinin en başında gelmektedir. Stafilokok enfeksiyonlarının tedavisi amacıyla 1959'da klinik kullanıma giren metisiline 2 yıl sonra *S. aureus*'un direnç geliştirdiği bildirilmiştir (Willke, 1992). Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) suşlarının, yarı sentetik penisilinlerin çoğuna karşı düşük afinite gösteren ve bakterinin hücre duvar sentezini sürdürmesini sağlayan farklı bir penisilin bağlayan protein (PBP) ürettiği bildirilmektedir. Üretilen bu proteinin edinilen *mecA* geni tarafından kodlandığı kanıtlanmıştır (Sancak, 2012). Bir diğer metisiline direnç geni 2007 yılında tanımlanmış olup *mecALGA251* olarak adlandırılmış ve 2012'den itibaren de *mecC* olarak tanımlanmıştır (Ito ve ark., 2012).

Antiseptikler ve dezenfektanlar, kontaminasyon ve enfeksiyonları önlemek amacıyla beşeri ve veteriner hekimlik ile gıda sektörü gibi çeşitli alanlarda sıklıkla kullanılmaktadır (Çağlar, 2005). Kullanılan pek çok preparat klorhekzidin ve benzalkonyum klorür gibi katyonik bileşikler içermektedir (İğnak, 2012). Bakteriler adaptasyon yetenekleri sayesinde antibiyotiklere olduğu gibi, antiseptiklere ve dezenfektanlara da direnç geliştirmekte ve canlılıklarını sürdürmektedirler (Çağlar, 2005). Bazı *S. aureus* suslarının çeşitli bileşiklere (klorhekzidin, diamidin, kuaterner amonyum, etidyum bromür, akridin), dezenfektan ve antiseptiklere karşı geliştirdiği dirençten plazmid ile taşınan *qac* genlerinin (*qacA*, *qacB*, *qacC (smr)*, *qacG*, *qacH* ve *qacJ*) sorumlu olduğu belirtilmiştir (Weber ve Rutala, 2006; Poole, 2002). Bu direnç mekanizmasının en iyi stafilokoklarda görüldüğü aynı zamanda stafilokoklar arasında aktarılabilceği de bildirilmiştir (Russell, 1997; McDonnell ve Russel, 1999; Jaglic ve Cervinkova, 2012). Bu sebeple antiseptiklere direncin de antibiyotiklere direnç gibi gelecekte önemli bir problem olacağı öngörülmektedir (Aykan ve ark., 2013).

Bu tez çalışmasında mastitis problemi bulunan sığır, koyun ve keçi işletmelerinden toplanan süt örneklerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarında metisiline (*mecA*, *mecC*) ve antiseptiklere (*qacA/B*, *smr*) direnç genlerinin varlığının polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

İlk kez 1878'de Robert Koch tarafından ışıık mikroskobu altında tanımlanan stafilokoklar üzüüm salkımını andıran küme görünümeleri nedeniyle 1881'de İskoçyalı cerrah Alexander Ogston tarafından “*Staphylococcus*” (*Staphyle*: üzüüm salkımı) olarak isimlendirilmiştir. Koagülaz pozitif bakterilerin en patojeni hastane kaynaklı enfeksiyonların başında gelen *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) olarak bilinmektedir (Quinn ve ark., 1999). İnsan ve hayvanların normal floralarında, derilerinde, üst solunum yollarında, sindirim ve ürogenital sistem mukozalarında bulunan *S. aureus* risk düzeyi değişken çeşitli enfeksiyonlara neden olmaktadır (Bannerman, 2003). Özellikle hayvanların eksternal yüzeylerinden izole edilen *S. aureus*'un en çok meme derisine lokalize olduğu ve mastitisli hayvanların sütünden sıklıkla izole edildiği bildirilmektedir (Roberson ve ark., 1994; Öztürk ve ark., 2019). Mastitis, sütte fiziksel ve kimyasal problemlere yol açan meme dokusunun yangısıdır (Pearson ve Mackie, 1979; Aydın ve ark., 2006; Büyükcangaz ve ark., 2013). *S. aureus*'un sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde antibiyotikler sıklıkla tercih edilmekte olup, bu antibiyotiklere direnç geliştirdiği bildirilmektedir (Kaszanyitzky ve ark., 2003).

Alexander Fleming 1928'de küf mantarının etrafında stafilokokların çoğalmadıklarını gözlemlemiştir. Küf mantarlarından elde ettiği süzüntülerin, çoğu bakteriye etkili olduğunu tespit etmiş ve 1928'de penisilini keşfetmiştir. Chain ve Flarey, 1940'ta *Penicillium notatum* küfünün salgıladığı maddelerin bakterisid etki gösterdiğini bildirmişlerdir (Doğan ve ark., 2018). Penisilinin 1940'lı yıllarda klinik kullanıma girmesiyle, stafilokok enfeksiyonları tedavi edilmeye başlanmıştır. *S. aureus* izolatlarının beta laktamaz (penisilinaz) enzimi ürettikleri ilk defa 1944 yılında Kirby tarafından bildirilmiştir (Shopsin ve Kreiswirth, 2001). Beta laktamaz üreten izolatların tanımlanmasının ardından penisilin direnci beş yılda %50'ye ulaşmıştır (Kaya, 2011). 2000'li yıllarda ise *S. aureus* izolatlarının neredeyse tümünde beta laktamaz enzimi saptanmıştır (Deurenberg ve Stobbering, 2008). Penisiline direnç gelişiminden sonra yeni antimikrobiyal ajanlar keşfedilmiş ve kullanılmaya başlanmıştır. İlk olarak 1953 yılında keşfedilen vankomisin 1958'de klinik kullanıma

girmiş ve 30 sene sonra İngiltere, Fransa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) vankomisine dirençli enterokok suşları tanımlanmıştır (Vural ve ark., 1999; Alp ve Çetinkaya, 2008). Dirençli enterokokların direnç genlerini stafilokoklara aktarmasıyla birlikte 1995 yılında Fransa'da vankomisine orta derece duyarlı, 2002'de ise ABD'de vankomisin dirençli *S. aureus* izole edildiği bildirilmiştir (Boulton ve ark., 2002; Sancak, 2011). Stafilokok enfeksiyonlarının tedavisine çözüm olarak metisilin 1959'da klinik kullanıma girmiş, 1961 yılında Colindale Hastanesi'nde (İngiltere) ilk Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) izolatları tanımlanmıştır (Stefani ve Goglio, 2010; Sancak, 2011). MRSA'nın 1972 yılında inek sütlerinden ilk izolasyonu bildirilmiştir (Devriese ve ark., 1972). Bu tarihten itibaren farklı evcil ve yabani hayvanlarda varlığı araştırılmıştır (Kireççi ve Çolak, 2002; Silva ve ark., 2004; Turutoglu ve ark., 2009; Stastkova ve ark., 2009). Yapılan bu çalışmalar, MRSA'nın veteriner hekimlikte de artık önemli bir problem olduğunu göstermiştir. Metisiline iki sene içerisinde direnç geliştiren *S. aureus*'lara karşı yeni antimikrobiyal ajanlar geliştirilmiştir. Bunlardan ilki 2000 senesinde klinik kullanıma giren linezolid fakat 2001'de linezolid de dirençli suşlar izole edilmiştir. İkincisi ise 2003 yılında kullanıma sunulan daptomisindir. Bu antimikrobiyal ajana da iki sene içerisinde direnç geliştiği saptanmıştır (Tsiodras ve ark., 2001).

MRSA izolatları antibiyotiklere ek olarak antiseptik ve dezenfektanlara (biyosit) karşı da direnç oluşturmaktadır (Aykan ve ark., 2013). Doğru kullanımla enfeksiyon riskini azalttığı bilinen biyositlere karşı direnç, özellikle tavsiye edilen yoğunluğun altında ve sık kullanımları sonucu gelişmektedir (Aykan ve ark., 2013). Bu direncin gelişiminden plazmidler üzerinde taşınan kuaterner amonyum bileşikler (*qac*) genlerinin sorumlu olduğu tespit edilmiştir (Fraise, 2002). Bu genlerin birçok tipi olup özellikle biyositlere dirençle ilişkili olan *qacA/B* ve *smr* (*qacC*, *qacD*, *ebr*) genlerinin antiseptik ve dezenfektan direnci ile güçlü bir bağlantısı olduğu ve bu genlere ilk kez insandan izole edilen MRSA ve koagülaz negatif stafilokok (KNS) izolatlarında rastlandığı bildirilmiştir (Lyon ve Skurray, 1987; Tennent ve ark., 1989; Paulsen ve ark., 1996; Heir ve ark., 1999; Mayer ve ark., 2001).

2.2. *Staphylococcus aureus*'un (*S. aureus*) Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması

S. aureus, Bergeys'in 1986 yılı sistematik bakteriyoloji sınıflandırmasında ve *Micrococcaceae* aile grubunda bulunan *Staphylococcus*'un 35 türünden biridir (Peacock, 2015). *S. aureus* sağlıklı hayvanların deri ve mukozalarında bulunmaktadır. İnsan ve hayvanların klinik örneklerinden sıklıkla izole edilen *S. aureus*, antibiyotiklere, antiseptiklere ve dezenfektanlara direnciyle bilinen ve ciddi enfeksiyonlara sebep olan patojen bir bakteridir (Roberson ve ark., 1994). Supuratif hastalıklar, mastitis, artrit, nekrotizan fasciit, üriner sistem enfeksiyonları, otitis eksterna ve pyoderma gibi ciddi hayvan hastalıklarına neden olabilmektedir (Lee, 2003; Ozturk ve ark., 2010). İnsanlarda ise gıda zehirlenmeleri, pnömoni, bakteriyemi, endokardit, osteomyelit gibi çeşitli sistem hastalıklarına yol açtığı bilinmektedir (Ozel ve ark., 2017).

2.3. *S. aureus*'un Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

S. aureus, Gram pozitif, kok şeklinde, katalaz ve koagülaz pozitif, oksidaz negatif, hareketsiz, sporsuz, fakültatif anaerob, %10 tuz konsantrasyonunda üreyebilen, 0.5-1.5 mm çapında patojen bir bakteridir (Quinn ve ark., 2000). Kanlı agar, triptik soy agar, beyin kalp infüzyon agar, nutrient agar gibi çeşitli besiyerlerinde 30-37°C'de 18-24 saat içerisinde üreyebilmektedir. Kobay ve fareler için patojen olduğu bildirilen stafilokokları Rosenbach 1884 yılında insandan izole ederek besiyerinde oluşturdukları koloni renklerine göre ayırmış ve beyaz kolonilere *S. albus* (albus: beyaz), sarı kolonilere *S. aureus* (aureus: sarı) adını vermiştir (Bilgehan, 2000; Bannerman, 2003; Peksel, 2006). Kolonileri düzgün, yuvarlak ve parlak olan mikroorganizma mikroskopta çoğunlukla üzüm salkımına benzeyen gruplar oluşturmakta, kimi zaman zincir görünümüyle streptokoklar ile karıştırılabilmekte olup katalaz pozitif olmaları ile farklılık göstermektedir. Ayrıca bazı *S. aureus* izolatları kanlı agarda beta hemoliz yaparak zon oluşturmaktadır (Bannerman, 2003). *Staphylococcus* spp.'ler laktoz, sükröz, mannoz, trehaloz, maltozu fermente edebilir ve fermantatif olarak glukozu parçalayarak laktik asit oluşturabilirler.

Ek olarak diğerk *Staphyloccus* spp.'lerden farklı olarak *S. aureus* mannitolü de fermente etmektedir (Bilgehan, 2004).

2.4. *S. aureus*'un Metisilin Direnci ve Direnç Mekanizmaları

Beta laktam grubu antibiyotikler, bakterilerde peptidoglikan sentezi için gerekli olan transpeptidaz enzimini inhibe ederek etki göstermektedir (Erturan ve Güven, 1989). Dirençli bakteriler tarafından üretilen beta laktamaz (penisilinaz), beta laktam halkasının yapısını bozarak bakterinin antibiyotiğek karşı direncinden sorumlu enzimdir (Watt ve Salmon, 1997). Bu enzim sayesinde stafilokoklar başta penisilin olmak üzere beta laktam grubu antibiyotiklere karşı direnç geliştirmektedir. Penisilin direncinin 1940'larda %40'larda olduğı, 30 sene içerisinde ise %85'e yükseldiğı bildirilmiştir (Demirtürk ve Demirdal, 2004). *S. aureus* enfeksiyonlarının tedavisi amacıyla 1958 yılında penisilin türevi metisilin klinik kullanıma sunulmuş, 1961 yılında da MRSA'ların izole edildiğı bildirilmiştir (Jevons, 1961). Stafilokoklarda metisiline direnç mekanizmaları çeşitli yollarla meydana gelebilmektedir.

2.4.1. Penisilin Bağlayan Protein 2/2a (PBP2/2a) Varlığı İle Oluşan Direnç

Beta laktam antibiyotikler; bakteri hücre duvarına, peptidoglikan sentezini engelleyen penisilin bağlayan proteinler (PBP) aracılığı ile bağlanarak etki göstermektedir (Deurenberg ve Stobbering, 2008). *mecA*, 78 kDa ağırlığındaki PBP 2/2a (PBP2/2a)'yı kodlayan stafilokokların metisiline ve diğerk antibiyotiklere direncine yol açan gendir (Sancak, 2012). Stafilokokların yapısında bakterinin hücre duvarını oluşturan polimerleri hücre duvarına taşıyarak bağlamakla görevli olan 5 adet PBP bulunmaktadır (Doğank ve ark., 2018). Fonksiyonlarını ve peptidoglikan sentezini antibiyotik varlığında kaybeden PBP'ler antibiyotik tarafından bloke edilmektedir. MRSA'larda ise 5 adet PBP'e ek olarak PBP2/PBP2a adı verilen yeni bir protein sentezlenmektedir. PBP2/PBP2a beta laktam antibiyotiklere düşük duyarlılığı sayesinde antibiyotik karşısında bloke olan diğerk PBP'lerin görevini üstlenmektedir. Bu şekilde bakteri antibiyotik varlığında hücre duvarı sentezini sürdürebilmektedir (Deurenberg ve ark., 2007; Deurenberg ve Stobberingh, 2008).

Metisilin direncinin oluşabilmesi için *mecA* geni varlığının yeterli olmadığı, bu genin aktifleşmesi gerektiği bildirilmektedir (Ryffel ve ark., 1992). Genlerin ekspresyon süreci her bakteride farklılık gösterebildiği için *mecA* genine sahip olduğu halde metisiline farklı düzeylerde dirençli veya duyarlı stafilokoklar olabilmektedir. Metisiline direnç oluşumunu *mecA* geninin ekspresyonunu kontrol eden *faktör X*, *fem A/B*, *mec I/R* gibi genler de etkilemektedir (Ünal, 1996).

mecA geni, baskılayıcı protein *MecI* ve beta laktamı algılayarak sinyal dönüştüren *mecRI* proteinlerini kodlayan, 2 regülatör gen *mecI* ve *mecR1* kontrolü altında ekspre edilmektedir. Bu genlerin beta laktamaz regülatörleri olan *blaR1* ve *blaI* genleri ile mekanizmasal benzerlikleri olduğu belirtilmektedir (Kuwahara-Arai ve ark., 1996). *MecI* beta laktam antibiyotiğin yokluğunda hem *mecA* hem de *mecR1*'in transkripsiyonunu represör özelliği ile inhibe etmektedir (Deurenberg ve Stobberingh, 2008). Transmembran yerleşimli *mecR1* beta laktam antibiyotiğinin varlığında otokatalitik olarak bölünerek parçalanmakta ve bu sayede *mecR1*'in sitoplazmik kısmında yer alan metalo-proteaz alanı aktifleşmektedir. Aktifleşen metalo-proteaz, *mecA*'nın operatör bölgesine bağlı *mecI*'yi katalize edererek *mecA*'nın transkripsiyonuna ve PBP2a üretimine dolayısıyla dirence neden olmaktadır (Berger ve Rohrer, 2002). *mecI* ve *mecR1*'in, IS431 veya IS1272 insersiyon dizileri tarafından delesyona uğrama ihtimali olduğu ve *mecA* geni üzerindeki baskının azaldığı bildirilmektedir (Katayama ve ark., 2001). Stafilocokal kaset kromozomu (staphylococcal cassette chromosome, SCC) stafilocokların kendi aralarındaki genetik madde aktarımında görevli bir yapıdır (Hansen ve Ericson, 2006). *mecA* geni, büyüklükleri 20kb ile 67 kb arası değişen Stafilocokal Kaset Kromozomu *mec* (*SCCmec*) üzerinde bulunmaktadır (Wiolders ve ark., 2002). *SCCmec* kasetinin *S. aureus*'larda, "bacterial chromosomal attachment site" (*attBsc*) isimli, replikasyon başlangıcının (*oriC*) yakınındaki *orfX*'in 3' ucundaki kromozomal bölgeye entegre olduğu bilinmektedir (Turlej ve ark., 2011). Tanımlanmış 11 adet *SCCmec* tipi (Tip I-XI) mevcuttur (Turlej ve ark., 2011; Sancak, 2012).

2007 yılının Mayıs ayında, İngiltere'de bir çiftlikten alınan tank sütü örneğinde *S. aureus* LGA251 ve *S. aureus* LGA254 saptanmış olup, yapılan PZR testlerinde bu

izolatların *mecA* ile % 70 DNA uyumlu bir *mec* geni olduğu belirlenmiştir (Garcia-Alvarez ve ark., 2011). *mecALGA251* olarak adlandırılan gen, 2012 yılında *mecC* olarak yeniden adlandırılmıştır (Ito ve ark., 2012). *mecC*'nin DNA'sının %69, amino asit kompozisyonunun ise %63 oranında *mecA* geni ile benzerlik gösterdiği açıklanmaktadır (Ito ve ark., 2012). *mecC* genine sahip MRSA'lar ile *mecA* genine sahip MRSA'ların yol açtıkları enfeksiyonlar ve bu enfeksiyonların tedavisi aynıdır (Laurent ve ark., 2012). *mecC* betalaktam direnci ile de ilişkilendirilmektedir. *mecC* geninin kodladığı PBP'ler, *mecA* geninin kodladığı PBP'lere oranla beta laktamlara karşı daha çok affinite göstermektedir (Kim ve ark., 2012). Kodlanan *mecA* ve *mecC* gen proteinlerinin arasındaki farklılıkların tespitini sağlamak amacıyla çalışmaların devam ettiği bildirilmektedir (Tsubakishita, 2010). *mecC* geni, PBP2a benzeri bir PBP ile dirence sebep olmaktadır (Gülmez, 2014).

Birçok Avrupa ülkesinde insan ve hayvanlardan izole edilen MRSA suşlarında *mecC* gen varlığı araştırılmıştır (Garcia-Garrote ve ark., 2014). Sığır, koyun, kuş, rat, kirpi, kedi, köpek, vaşak, su samuru gibi evcil ve yabani hayvanların MRSA izolatlarında *mecC* geni tespit edilmiştir (Eriksson ve ark., 2013; Loncaric ve ark., 2013; Medhus ve ark., 2013). İspanya, Fransa, İsveç, Belçika ve Finlandiya'da 2012-2014 yılları arasında yapılan çalışmalarda mastitisli koyun ve inek sütlerinde *mecC* genine rastlandığı bildirilmiştir (Laurent ve ark., 2012; Unnerstad ve ark., 2013; Gindonis ve ark., 2013; Ariza-Miguel ve ark., 2014). Avusturalya'da sığır ve koyunlardan, İspanya'da ise Alageyikten alınan burun sıvılarından izole edilen MRSA'ların da *mecC* pozitif olduğu belirlenmiştir (Loncaric ve ark., 2013; Gomez ve ark., 2015).

Türkiye'de çiftlik hayvanlarının süt ve süt ürünlerinden izole edilen *S. aureus* suşlarında *mecC* genini ortaya koymaya yönelik sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Doğan ve ark., 2016; Sayın ve ark., 2016; Taban ve ark., 2021). Doğan ve ark. (2016) 2011-2013 yılları arasında Burdur ve Aydın'daki Veteriner Fakülteleri tarafından mastitisli çiftlik hayvanlarından (94 sığır, 45 koyun ve 38 keçi) izole edilen 177 *S. aureus* izolatında *mecA* ve *mecC* gen varlığını araştırdıkları çalışmada, 45 izolatta *mecA* geni saptadıklarını, *mecC* ise belirleyemediklerini rapor etmişlerdir. Sayın ve ark. (2016) mastitisli ineklerden izole edilen 150 *S. aureus* izolatının 7'sinde *mecC*

saptadıklarını bildirmişlerdir. Taban ve ark. (2021) ise süt ve süt ürünlerinde metisiline direnç genlerini (*mecA*, *mecC*) araştırdıkları çalışmada süt örneklerinin 2'sinden *mecA*, pasta kremasının 2'sinde *mecC* ve pasta kremasının 1'inde *mecA* ve *mecC* genlerini birlikte belirlediklerini rapor etmişlerdir.

Epidemiyolojik olarak MRSA enfeksiyonları hastane kaynaklı, toplum kaynaklı ve çiftlik hayvanları ile ilişkili MRSA enfeksiyonları olmak üzere 3 başlıkta incelenmektedir (Gindonis ve ark., 2013). Hastane kaynaklı MRSA'lar *SCCmec* kasetleri üzerinde alt tip I-II-III'ü, toplumsal kaynaklı MRSA'lar alt tip IV-V'i içermektedir. Çiftlik hayvanları ile ilişkili MRSA'lar ise *SCCmec* tip XI üzerinde yer almaktadır (Doğan ve ark., 2018).

2.4.1.1. İntrensek Direnç

2.4.1.1.1. Homojen Direnç

Kolonideki tüm bakterilerin aktif *mecA* genine sahip olmaları şeklinde tanımlanmakta ve bu bakteriler yüksek düzeyde direnç göstermektedir. Bu direncin çevresel faktörler (ortamın pH'sı, ısısı, tuz konsantrasyonu, inkübasyon süresi) ile bir bağlantısı bulunmamaktadır (Chambers, 1997; Biçer, 2009).

2.4.1.1.2.Heterojen Direnç

Bakterilerin tamamı *mecA* geni taşımasına rağmen 10^6 - 10^8 bakteriden yalnız birinde yüksek direnç belirlenmektedir (Ünal, 1996). Bunun *mecA* haricindeki genetik elemanlarda meydana gelen mutasyonlardan ileri geldiğine ve *mecA* genini kontrol ettiği düşünülen *fem* faktörleri (*factor essential for methicillin resistance* = *fem A*, *faktör X* veya *mecR*, *mecI*) genleriyle bir ilişkisinin olduğuna ihtimal verilmektedir (Ünal, 1996). Heterojen direnç çevresel faktörler ile ilişkilendirilmekte olup, bu nedenle tespitinin zorlaştığı bildirilmektedir. Heterojen direncin tam olarak ne sebeple şekillendiği ise tam olarak bilinmemektedir (Chambers, 1997; Biçer, 2009).

2.4.1.2. Sınırdaki (Borderline) Metisilin Direnci

Bu mekanizma stafilokokların aşırı miktarda beta laktamaz üretimiyle metisilini parçalaması şeklinde meydana gelmektedir. Bakteri metisiline sınırdaki direnç gösterdiğinden dolayı bu mekanizma ile direnç kazanan suşlara borderline *S. aureus* (BORSA) adı verilmektedir (Willke, 1992). Beta laktamaz enzimini kodlayan genlerin çoğu plazmidlerde bulunmaktadır (Kaya, 2011). BORSA suşları PBP2a oluşturmamaları ve plazmide bağımlı olmaları sebebiyle MRSA'lerden ayrılmaktadır (Willke, 1992).

2.4.1.3. Mevcut PBP'lerde Beta-laktam Antibiyotik Afinitesinde Azalma ile Oluşan Metisilin Direnci

mecA geni taşımayan ve beta laktamaz negatif olan stafilokoklarda, PBP'lere bağlı metisiline duyarlılıklarının azalması şeklinde direnç tespit edilmiş ve bu stafilokoklara Moderately resistant *S. aureus* (MODSA) adı verilmiştir. PBP'lerde nokta mutasyonları ya da PBP4'ün aşırı yapımının bu dirence sebep olabileceği düşünülmektedir (Willke, 1992; Rice ve ark., 2003).

2.5. Antiseptiklere Direnç Mekanizmaları

Bakteriler antibiyotiklere direnç mekanizmalarına benzer şekilde antiseptik ve dezenfektanlara da direnç geliştirirler (Çağlar, 2005). Biyositler (antiseptik ve dezenfektanlar) patojen mikroorganizmaların yayılmasını önlemek amacıyla çeşitli alanlarda kullanılmaktadır (İğnak, 2012). MRSA, antibiyotiklerin yanı sıra antiseptiklere de direnç göstermektedir (Aykan ve ark., 2013). Ancak biyositler antibiyotiklerin aksine birden çok hedefe yönelik aktivite göstermektedir. Hücre içine dezenfektan madde girişini engelleyen sistemlerde bulunmaktadır. Permeabilite değişiklikleri hücre içerisinde biyositlerin birikmesini engelleyerek direnç oluşturmaktadır. Bu hücredeki permeabilite; hücre yüzeyinin hidrofobik yapısındaki değişiklikler, dış membran ultrastrüktüründeki değişiklikler, dış membran protein kompozisyonundaki değişiklikler ve dış membran yağ asidi kompozisyonundaki değişikliklerden etkilenmektedir. Biyositlere karşı direnç mekanizmasında önemli bir

rolü olan “Multidrug efflux (MDR)” sistemleri bakterilerde bulunur ve birçok farklı yapıdaki maddeyi hücre dışına atmayı sağlayan sistemlerdir (Çağlar, 2005). Bakteriyel duyarlılığın azalmasına bir dizi efflux pompası proteinin etkinliği bilinmektedir. Bu ürünlerden olan kuaterner amonyum proteinleri bunlardan biridir (Çağlar, 2005). Yapılan çalışmalara göre, MRSA suşlarının povidon-iyot, klorheksidin, kuaterner amonyum bileşikler gibi maddelere dirençli olduğu saptanmıştır (Atlı, 2007; Nakipoğlu ve ark., 2012). *S. aureus* suşlarında, bu antiseptik maddelere direnç oluşumundan sorumlu genler “*qac* (*quaternary ammonium compounds*) genleri” olarak adlandırılmıştır (Nakipoğlu ve ark., 2012). Stafilocokların kuaterner amonyum bileşiklerine dirençleri, plazmidler üzerinde bulunan *qac* genleri (*qacA*, *qacB*, *qacC* (*smr*), *qacG*, *qacH* ve *qacJ*) tarafından kodlanmakta olup (Jaglic ve Cervinkova, 2012), stafilocok türleri arasında aktarılabileceği bildirilmiştir (Russell, 1997). *qac* genlerinin [*qacA*, *qacB* ve *qacC* (*smr*)] ilk olarak insan kaynaklı *S. aureus* suşlarında, ardından yiyecek ve yiyecek üretim ortamlarından izole edilen stafilocok türlerinde saptandığı bildirilmiştir (Nakipoğlu ve ark., 2012). MRSA suşlarında *qacA/B* geni, dezenfektan ve antiseptik direnci ile yüksek derecede ilişkilidir. *qacA/B* direnç genleri plazmidler üzerinde taşındığı için, bu genlerin bulunması aynı zamanda antibiyotik direnci ile de ilişkili olabilmektedir (Aykan ve ark., 2013). *Staphylococcus* spp. suşlarının *qac* direnç genlerini plazmidler aracılığı ile diğer bakterilere de aktarabileceği öngörülmektedir (İğnak, 2012). Böylece antiseptiklere direncin de, antibiyotiklere direnç gibi gelecekte önemli bir problem olarak karşımıza çıkacağı düşünülmektedir.

Biyositlerin yanlış kullanımının (kullanım sıklığı, yoğunluk, süre, sıcaklık) direnç gelişimine zemin hazırladığı, ayrıca mikroorganizmaların adaptasyon yetenekleri ile antiseptik ve dezenfektanlara da direnç kazandığı bilinmektedir (Çağlar, 2005). Biyositlere dirençli bakteriler antibiyotiklere daha az duyarlılık göstermektedir (Weber ve Rutala, 2006; Aykan ve ark., 2013). Stafilocok plazmidleri ile aktarılan aminoglikozid, eritromisin, trimetoprim gibi çeşitli antibiyotiklere direnç genleri ve *qac* direncinden sorumlu genler arasında bir ilişki olduğu belirtilmiştir (Noguchi ve ark., 2005). Yapılan çalışmalarda, *qacA/B* genleri, MRSA suslarında %2-80, metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) suslarında ise %2-12 oranında saptanmıştır (Mayer ve ark., 2001; Miyazaki ve ark., 2007; Opacic ve ark., 2010; Longtin ve ark., 2011).

Biyosit direnci doğal (intrensek) direnç ve kazanılmış direnç olmak üzere başlıca iki şekilde oluşmaktadır (İğnak, 2012).

2.5.1. Doğal (İntrensek) Direnç

Bakterinin doğal yapısında bulunan enzimler tarafından biyosit lize edilerek hücreden dışarı atılır ve bu şekilde hedef bölgede etki edebilecek yoğunluğa ulaşamayan biyosite karşı direnç şekillenir. İntrensek direnç kromozomlar tarafından şekillenmektedir ve çoğunlukla Gram negatif bakteriler, sporlar ve mikobakterilerin bu mekanizma ile direnç kazandığı rapor edilmiştir (Maillard, 2007). Gram negatif bakterilerin magnezyum içerikli güçlü bağlara sahip olmasının hücre içerisine biyosit alınma oranını azalttığı açıklanmaktadır (İğnak, 2012). İntrensek direnç içerisinde bulunan bir diğer mekanizma ise, fizyolojik adaptasyon sonucu şekillenen biyofilm oluşumudur. Cansız yüzeyler ya da canlı hücreler ile bakterinin teması biyofilm tabakasının oluşumuna sebep olmaktadır (Cappitelli ve ark., 2014). Biyofilm içerisindeki bakteriler sıvı ortamdaki bakterilere oranla antiseptiklere daha fazla direnç göstermektedir. Biyofilm tabakası bakterinin hücre duvarının biyosit ile temasını engellemektedir. Biyofilm tabakasına sahip bakterilerin tabaka uzaklaştırıldıktan sonra sıvı kültüre bırakılması ile biyositlere duyarlı hale geldikleri gösterilmiştir (Kartal, 2007). Biyofilm tabakası varlığı ile oluşan dirence genellikle Gram negatif bakterilerde ve *Candida* spp.'de rastlanmaktadır (Russel, 2004; Çağlar, 2005; Maillard, 2007).

2.5.2. Kazanılmış Direnç

Kazanılmış direnç, hareketli genetik elemanlar (plazmid, transpozon) veya mutasyonlar sonucu meydana gelmektedir (Russel, 2004). Hedef bölge mutasyonuna bağlı direnç gelişimi oldukça nadirdir. Bunun nedeni olarak, dezenfektanların bakteri hücresinde etki gösterebileceği birçok hedef molekülünün bulunması gösterilmektedir (Çağlar, 2005; İğnak, 2012). Klorheksidin, diamidin, kuaterner amonyum, etidyum bromür, akridin bileşiklerine *S. aureus*'un direnç geliştirdiği ve bu dirence plazmid üzerinde taşınan *qac* genlerinin (*qacA*, *qacB*, *smr* (*qacC*, *qacD*, *ebr*) sebep olduğu bilinmektedir (McDonnal ve Russel, 1999; Weber ve Rutala, 2006).

Biyosit direnciyle ilişkilendirilen *qacA*, *qacB*, *smr* genlerine ilk defa insandan izole edilen *S. aureus* ve KNS suşlarında rastlanmış, gıda sektöründe de bu genlere sahip suşların mevcut olduğu bildirilmiştir (Lyon ve Skurray, 1987; Heir ve ark., 1999). Stafilokoklar haricindeki Gram pozitif bakterilerin plazmid direnci henüz bildirilmemiştir (Çağlar, 2005).

2.5.2.1. *qacA/B* Direnç Mekanizması

Antiseptiklere karşı dirençte tanımlanan ilk genetik determinantın *qacA* geni olduğu bildirilmektedir (Lyon ve Skurray, 1987). Antiseptik direnç genleri olarak bilinen *qacA* ve *qacB* genleri “Major facilitator (MF)” ailesi proton bağımlı efluks pompa proteini kodlamaktadır (Weber ve Rutala, 2006). Efluks pompalarında görevli genleri ise çoğunlukla plazmidler kodlamaktadır (Çağlar, 2005). *qacA*’nın ürettiği protein; ağır metal ve beta laktam direnç plazmidlerinde kodlanmaktadır. Bu protein genellikle pSK1 multidirenç plazmid ailesi çoğul ilaç direnç plazmidleri ile taşınmaktadır. Çoğul ilaç transport proteinlerinden olan major facilitator (MF) süper ailesi, çeşitli substratların taşınmasında görevlidir. *qac* proteini MF ailesinin 14 transmembran segment (TMS) içeren proteinlerinden biridir. (Putman ve ark., 2000; Mayer ve ark., 2001; Kumar ve Schweizer, 2005; Hassan ve ark., 2007). *qacB* ise monovalen organik katyonların hücre dışına atılmasında görevlidir. Birçok plazmidde bulunmakla birlikte ağır metal direnci ile ilişkilendirilen *psK23* plazmidini ile taşınmaktadır (Poole, 2002; Poole, 2005). *qacA* ve *qacB* genleri arasında tek aminoasitlik fark olduğu, bu nedenle de PZR’da iki genin ayrı ayrı tespit edilemediği bildirilmektedir (Paulsen ve ark., 1996). Efluks pompaları “multidrug efflux (MDR)” sistemleri adıyla tanınmaktadır ve benzalkonyum klorür, setrimit, klorhekzidin gibi çeşitli biyositlerin hücre dışına atılmasını sağlamaktadır (Çağlar, 2005).

2.5.2.2. *smr* Direnç Mekanizması

smr geni stafilokok türlerinde konjugatif olan ve olmayan plazmidler üzerinde taşınmaktadır. Kuaterner amonyum bileşiklerine ve etidyum bromür gibi boyalara direnci *smr* geninin varlığı ile ilişkilendirilmektedir.

smr geninin, *qacC*, *qacD* ve *abr* genleri ile aynı olduğu sekans analizlerinde doğrulanmıştır (Poole, 2002; Poole, 2005). Bu direnç, small multidrug resistance (*smr*) ailesi eflüks pompa proteinlerinin *pSK89* veya *pSK41* gibi büyük ve küçük plazmidlerde kodlanarak taşınması ile kazanılmaktadır (Lyon ve Skurray, 1987; Grinius ve ark., 1992; Sasatsu ve ark., 1995).

2.6. Antiseptik Direncinin Dünya'daki Durumu

Dünyanın farklı birçok bölgesinde, insan (Noguchi ve ark., 1999; Mayer ve ark., 2001; Alam ve ark., 2003; Miyazaki ve ark., 2007; Smith ve ark., 2008; Vali ve ark., 2008; Wang ve ark., 2008; Opacic ve ark., 2010; Longtin ve ark., 2011) ve hayvanlardan (Ebner ve ark., 2013; Monecke ve ark., 2013; Wong ve ark., 2013; Turchi ve ark., 2020) izole edilen *S. aureus* izolatlarında kuaterner amonyum bileşiklerine direncin ortaya konulmasına yönelik çok sayıda araştırma rapor edilmiştir.

Mayer ve ark. (2001) 1997-1999 yılları içerisinde 14 Avrupa ülkesinin 24 üniversite hastanesinden rastgele örnekler toplamışlardır. Kan kültürlerinden, deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarından izole ettikleri 297 MRSA ve 200 MSSA suşunda yaptıkları çalışmada, MRSA'ların 186'sında *qacA/B* ve 19'unda *smr*, MSSA'ların ise 24'ünde *qacA/B* ve 10'unda *smr* direnç geni saptamışlardır. Vali ve ark. (2008) İskoçya'da 120 MRSA'nın 10'unu *qacA/B*, 53'ünü *smr* dirençli bulmuştur. Opacic ve ark. (2010) Belgrad Hastanesi'nden izole ettikleri 50 MRSA izolatının 16'sının, 50 MSSA'nın ise yalnız bir tanesinin *qacA/B* pozitif olduğunu saptamışlardır. Longtin ve ark. (2011), Kanada'da iki yoğun bakım ünitesinden 4 yıl boyunca izole edilen 334 MRSA izolatının 7'sinde *qacA/B* ve 23'ünde *smr* geni tespit etmiştir. Brezilya devlet hastanelerinden 2002-2003 yıllarında izole edilen 74 MRSA suşunun %80'inin *qacA/B* geni bulundurduğu bildirilmiştir (Miyazaki ve ark., 2007).

Japonya'da 522 klinik *S. aureus* suşu ile yapılan çalışmada, MRSA suslarının %32,6'sı *qacA/B* ve %3,3'ü *smr*, MSSA suşlarının ise %7,5'inde *qacA/B* ve %5,9'unda *smr* geni saptanmıştır (Alam ve ark., 2003).

Çin’ de 2003-2004 yıllarında yapılan bir çalışmada beş farklı hastaneden toplanan 131 klinik MRSA suşunun 80’inde *qacA/B* geni varlığı belirlenmiştir (Wang ve ark., 2008). İngiltere’de 2008 yılında izole edilen hastane ve toplum kaynaklı 94 *S. aureus* suşunun %14,89’unda *qacA*, %4,26’sında ise *smr* gen varlığı bildirilmiştir (Smith ve ark., 2008). Asya’nın 11 farklı ülkesinden çeşitli örneklerden izole edilen 894 MRSA suşunun 344’ünde *qacA/B*, 28’inde hem *smr* hem *qacA/B* genlerinin bulunduğu açıklanmıştır (Noguchi ve ark., 1999) Stafilokok türlerinde *qacA/B* genlerinin yaygın olduğu, Avrupa ve Asya’da MRSA izolatlarında özellikle bu gen çiftine sıklıkla rastlandığı bildirilmiştir (Noguchi ve ark., 2006; Wang ve ark., 2008; Schlett ve ark., 2014). *qacA/B* geninin görülme oranları Asya kıtasında %41,61, Kanada’da %2, Brezilya’da %80 ve İskoçya’da %8,3 olarak rapor edilmiştir (Noguchi ve ark., 2005; Miyazaki ve ark., 2007; Vali ve ark., 2008; Longtin ve ark., 2011).

S. aureus izolatlarının kuaterner amonyum bileşiklerine direnci farklı hayvan türlerinde saptanmıştır. Bjorland ve ark. (2001) 10 yıl boyunca mastitisten korunma amacıyla her gün kuaterner amonyum bileşikleri içeren bir meme başı kremi kullanan bir işletmeden izole edilen *S. aureus* izolatlarından 3 tanesinin penisilin, tetrasiklin ve *qac* dirençli *S. aureus* olduğu, ayrıca ve 3 izolatın *smr* geni taşıyan plazmide sahip olduğu bildirilmiştir (Bjorland ve ark., 2001). Ebner ve ark. 2012 yılının Eylül-Kasım ayları arasında İsviçre’de bulunan iki mezbahadan tavuk karkaslarının boyun derilerini toplamışlar ve bu örneklerden 34 adet stafilokok izolatı elde etmişlerdir. Yaptıkları çalışma ile izolatların %65’inin DNA mikroarray analizi ile *smr* genine sahip olduğunu belirlemişlerdir (Ebner ve ark., 2013). Başka bir benzer çalışmada da tavuk karkaslarından izole edilen 131 adet MRSA izolatında aynı analiz yöntemi ile 15’inde *smr* gen varlığı bildirilmiştir (Monecke ve ark., 2013). Wong ve ark. (2013) domuz karkaslarından izole ettikleri 100 MRSA izolatının 45’inde PZR ile *smr* geninin bulunduğunu rapor etmişlerdir. İtalya’nın Toskana bölgesinde yapılan çalışmada ise 120 adet küçükbaş hayvanın tank sütünden izole edilen 73 KNS izolatının %12,3’ünün *qac* genlerine ve %9,6’sının *smr* genine sahip olduğu belirtilmiştir (Turchi ve ark., 2020).

2.7. Antiseptik Direncinin Türkiye’deki Durumu

Türkiye’de antiseptik direncini ortaya koymaya yönelik ilk araştırma 2006 yılında Gazi Üniversitesi’nde Aykan ve ark. (2013) tarafından yapılmıştır. Araştırmacılar 69 MRSA insan izolatının 8’inde *qacA/B* geni saptamışlardır. İstanbul Üniversitesi’nin Tıp Fakültesinde Nakipoğlu ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada idrar, burun sıvabı, apse gibi çeşitli klinik örneklerden izole edilen 50 MRSA izolatının 18’inde *smr* ve 50 MSSA’nın 2’sinde *qacA/B* direnci belirlenmiştir. İğnak ve ark. (2012) İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi kliniklerinden Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarlarına gönderilen örneklerden izole ettikleri 69 enterokok ve 69 stafilokok izolatında antiseptiklere direnci araştırmışlar, 10 MRSA izolatının 1’inde ve 19 MSSA izolatının 3’ünde *smr* geni bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar enterokoklarda ise direnç genlerini tespit edemediklerini rapor etmişlerdir (İğnak ve ark., 2012).

Hatay’da 2019 yılında yapılan bir çalışmada, subklinik mastitisli keçilerden izole edilen 30 stafilokok suşunda PZR yöntemi ile çeşitli antibiyotik ve antiseptik direnç genlerinin varlığı araştırılmıştır. İzolatların 2’sinde *mecA* ve 1’inde *qacA/B* direnç geni tespit edilmiş, *smr* genine ise rastlanmamıştır (Cantekin ve ark., 2019). Akın ve ark. (2020) tavuk karkasından, sığır tank sütünden, klinik mastitisli sığırlardan ve peynirlerden izole ettikleri 90 stafilokok izolatında PZR ile %22 *smr*, %18.8 ise *qacA/B* geni saptamıştır. Bu çalışma ile klinik mastitisli sığırlarda ve peynirlerde *qacA/B*’ye, tavuk karkaslarında ise *smr* direnç genine rastlandığı belirtilmiştir (Akın ve ark., 2020).

Bischoff ve ark. (2012) süt ve süt ürünlerinden, çiftlik hayvanlarının dışkılarından, hastanede yatan insanların kan ve dışkılarından izole ettikleri *Enterococcus faecalis* izolatlarında *qac* genlerini PZR yöntemi ile araştırmışlardır. İnsan kanından ve sığırdan izole edilen suşlarda *qacA/B*, insan dışkısı ve peynirden izole edilen suşlarda ise *smr* gen varlığını bildirmişlerdir. Bu çalışma *qacA/B* geninin tespit edildiği ilk çalışma olması bakımından önem taşımaktadır (Bischoff ve ark., 2012).

Plazmid ve transpozonlar gibi hareketli genetik elemanlar sayesinde bakteri türleri arasında direnç aktarımının gerçekleştiği bilinmektedir (Eraksoy, 2011). Vankomisin direncinde de görüldüğü gibi özellikle stafilokoklar ve enterokoklar arasında aktarım yaygındır bu sebeple enterokoklarda da antiseptik direnç genlerinin tespit edilmiş olmasının direnç yayılım riskini arttıracakı düşünülmektedir (Derbentli, 2005).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Süt Örnekleri

Çalışma Eylül 2022-Haziran 2023 tarihleri arasında gerçekleştirildi. Burdur ili ve çevre köylerinde mastitis problemi olan sığır, koyun ve keçi işletmelerinden her hayvan türü için en az 5 farklı işletmeden ve her işletmeden 10-25 adet hayvanın tüm memelerinden süt örnekleri alındı. Toplamda 19 farklı işletmeden 257 hayvandan (90 sığır, 60 koyun, 107 keçi) 694 süt örneği toplandı. İşletmelerde hayvan sayıları 12-90 arasında değişmekteydi. Alınan süt örneklerinin ve alındıkları işletmelerin sayısı Tablo 3.1’de verildi. Örnekler soğuk zincir koşullarında laboratuvara getirildi.

Bu araştırma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu Başkanlığı’nın (MAKÜ- HADYEK/ 2017-314) onayı ile gerçekleştirildi.

Tablo 3.1. Süt örneklerinin alındığı işletmeler ve örnek sayıları

Hayvan Türü	Çiftlik No	İlçe-Köy	Hayvan Sayısı	Örnek Sayısı	Sürü Büyüklüğü
İnek	1	Merkez	15	60	15
İnek	2	Bucak	21	84	37
İnek	3	Bucak	16	64	30
İnek	4	Bayındır	12	48	25
İnek	5	Bayındır	12	48	12
İnek	6	Karacaören	14	56	20
Koyun	7	Halebi	12	24	38
Koyun	8	Halebi	12	24	39
Koyun	9	Merkez	12	24	45
Koyun	10	Merkez	12	24	35
Koyun	11	Bayındır	12	24	20
Keçi	12	Cezaevi	16	32	85
Keçi	13	Müslümler	16	32	47
Keçi	14	Müslümler	15	30	25
Keçi	15	Soğanlı	12	24	66
Keçi	16	Soğanlı	12	24	90
Keçi	17	Örtülü	12	24	30
Keçi	18	Merkez	12	24	34
Keçi	19	Merkez	12	24	25

3.1.2. İzolasyonda Kullanılan Besiyerleri

Kanlı Agar (Oxoid, UK)

Lab-lemco tozu.....	10 g
Nötralize pepton.....	10 g
Sodyum klorit... ..	5 g
Agar.	15 g
Distile su.	1000 ml

İçerik distile suya ilave edildikten sonra eritildi ve pH $7,3 \pm 0,2$ 'ye ayarlandı. Otoklavda 121°C 'de 20 dakika (dk) steril edildi ve besiyeri 50°C 'ye soğutulduktan sonra içerisine %5-10 defibrine koyun kanı eklendi ve steril petrilere 25-30 ml dağıtıldı.

MacConkey Agar (Merck, Almanya)

Pepton.	20 g
Laktoz.	10 g
Safra tuzları.....	5 g
NaClO_2 (Sodyum klorit).....	5 g
Nötral red.	0,075 ml
Agar.	12 g
Distile su.	1000 ml

İçerik distile suya ilave edildikten sonra eritildi ve pH $7,1 \pm 0,2$ 'ye ayarlandı. Otoklavda 121°C 'de 20 dk steril edildi ve besiyeri $45-50^{\circ}\text{C}$ 'ye soğutulduktan sonra steril petrilere 25-30 ml dağıtıldı.

Nutrient Agar (Oxoid, UK)

Lab-lemco tozu... ..	1 g
Maya ekstraktı	2 g
Pepton... ..	5 g

Sodyum klorit	5 g
Distile su.....	1000ml
Agar... ..	15 g

İçerik distile suya ilave edildikten sonra eritildi ve pH $7,4 \pm 0,2$ 'ye ayarlandı. Otoklavda 121°C 'de 20 dk steril edildi ve besiyeri $45-50^{\circ}\text{C}$ 'ye soğutulduktan sonra steril petrilere 25-30 ml dağıtıldı.

Mueller-Hinton Agar (Merck, Almanya)

Et infüzyonu... ..	2 g
Kazein hidrolizatı.....	17,5 g
Nişasta... ..	1,5 g
Distile su.....	1000 ml
Agar agar... ..	13 g

İçerik distile suya ilave edildikten sonra eritildi ve pH $7,4 \pm 0,2$ 'e ayarlandı. Otoklavda 121°C 'de 20 dk steril edildi ve besiyeri $45-50^{\circ}\text{C}$ 'ye soğutulduktan sonra steril petrilere 25-30 ml dağıtıldı.

Brain Heart Infusion Sıvı Besiyeri (BD, Almanya)

Beyin-Kalp infüzyonu	6 g
Hayvan dokularının peptik dijesti.....	6 g
Dekstroz.....	3 g
Sodyum klorit	5 g
Kazeninin pankreatik dijesti	14,5 g
Disodyumfosfat.....	2,5 g
Distile su.....	1000 ml

İçerik distile suya ilave edildikten sonra eritildi ve pH $7,4 \pm 0,2$ 'ye ayarlandı. Otoklavda 121°C 'de 20 dk steril edildi ve besiyeri $45-50^{\circ}\text{C}$ 'ye soğutulduktan sonra steril tüplere 2-3 ml dağıtıldı.

DNase Agar (Oxoid, UK)

Triptoz	20 g
Deoksiribonükleik asit.....	2 g
Sodyum klorit... ..	5 g
Agar... ..	12 g
Distile su... ..	1000 ml

İçerik distile suya ilave edildikten sonra eritildi ve pH 25°C’de $7,3 \pm 0,2$ ’e ayarlandı. Otoklavda 121°C’de 15 dk steril edildi ve besiyeri 45-50°C’ye soğutulduktan sonra 90 mm çapında steril petrilere 25-30 ml dağıtıldı.

Mannitol Salt Agar (MSA) (Oxoid, UK)

Lab- Lemco tozu.....	1 g
Pepton... ..	10 g
Mannitol.....	10 g
Sodyum klorit... ..	75 g
Fenol kırmızısı	0,025 g
Agar... ..	15 g
Distile su... ..	1000ml

İçerik distile suya ilave edildikten sonra eritildi ve pH 25°C’de $7,5 \pm 0,2$ ’e ayarlandı. Otoklavda 121°C’de 20 dk steril edildi ve besiyeri 45-50°C’ye soğutulduktan sonra 90 mm çapında steril petrilere 25-30 ml dağıtıldı.

Trypton Soya Broth (TSB) (Oxoid, UK)

Kazeinin pankreas sindirimi	17 g
Soya fasulyesinin enzimatik sindirimi... ..	3 g
Sodyum klorit	5 g
Dipotasyum hidrojen fosfat... ..	2,5 g
Glukoz	2.5 g

İçerik distile suya ilave edildikten sonra eritildi ve pH 25°C’de $7,3 \pm 0,2$ ’e ayarlandı. Otoklavda 121°C’de 20 dk steril edildi ve besiyeri 45-50°C’ye soğutulduktan sonra steril tüplere 2-3 ml dağıtıldı.

3.1.3 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Elektroforez Jel Tankı

Elektrik akımı yardımı ile nükleik asitlerin ayrışmasını sağlamak amacıyla kullanıldı (Serva, BM100, İngiltere).

Etüv

Bakterilerin izolasyon ve identifikasyon sürecinde bakterilerin üreyebilmeleri için gerekli koşulları sağlamak amacıyla kullanıldı (Thermo Scientific, ABD).

Görüntüleme Cihazı

Ultraviyole ışığı altında jelde yürütülen DNA fragmentlerinin görüntülenebilmesi için kullanıldı (EDAS 290, Kodak, ABD).

Güç Kaynağı

Elektroforez jel tankının nükleik asitleri ayrıştırması ve DNA’yı yürütebilmesi için gerekli elektrik akımını sağlamak amacıyla kullanıldı (Teko, İtalya).

Fotoğraf Makinası

Görüntüleme cihazı ile görüntülenen ürünlerin fotoğraflanarak bilgisayara aktarılması için kullanıldı (Digital Graphic Printer, Kodak, ABD).

Isı Döngü Cihazı (Thermal cycler)

Genomik DNA'nın istenen bölgesinin çoğaltılması için kullanıldı (Biorad, T100, Almanya).

Jel Elektroforez Ünitesinin Tarakları

Jel üzerinde 7µl hacim alan ve 16 adet kuyucuk açan 1-2 mm kalınlığında 2 adet tarak kullanıldı (Scie-plas, HU10, İngiltere).

Manyetik Karıştırıcı

Besiyerlerinin hazırlanması sırasında eklenen toz besiyerlerinin tamamen erimesi amacıyla kullanıldı (Isolab, Almanya).

Mikrodalga Fırın

Agarozun Tris Asetat EDTA (TAE) içerisinde erimesi için gerekli ısıyı sağlamak amacıyla kullanıldı (Beko, Türkiye).

Otoklav

Cam malzemelerin ve besiyerlerinin steril edilmesi için kullanıldı (Hirayama, Japonya).

Otomatik pipetler

0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl'lik otomatik pipetler kullanıldı (Thermo Scientific, Finlandiya).

PZR Kabini

PZR uygulamalarının steril ortamda yapılabilmesi için kullanıldı (Biosan, Riga, Letonya).

Primerler

S. aureus'un doğrulanması, metisiline ve antiseptiklere direnç genlerinin gösterilmesi için kullanıldı (Tablo 3.2.).

Tablo 3.2. *S. aureus*, metisiline direnç ve antiseptiklere direnci kodlayan genler, primer dizisi ve PZR ürünleri.

Primer	Primer dizisi	PZR ürünü (bp)	Referans
<i>nuc</i>	5'-GCGATTGATGGTGATACGGTT-3' 5'-AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC-3'	279 bp	Aksakal ve ark. (2022)
<i>mecA</i>	5'-CCT AGT AAA GCT CCG GAA-3' 5'-CTA GTC CAT TCG GTC CA-3'	314 bp	Ardic ve ark. (2006)
<i>mecC</i>	5'-GAAAAAAAGGCTTAGAACGCCTC-3' 5'-GAAGAT CTTTCCGTTTTCAGC-3'	138 bp	Stegger ve ark. (2012)
<i>qacA/B</i>	F-5'-CCTTTTAATGCTGGCTTATACC-3' R-5'-AGCCKTACCTGCTCCAACTA-3'	220 bp	Akin ve ark. (2020)
<i>smr</i>	5'-GGCTTTTCAAAATTTATACCATCCT-3' 5'-ATGCGATGTTCCGAAAATGT-3'	249 bp	Akin ve ark. (2020)

bp: baz çifti

Safe Dye

Jel elektroforez aşamasında PZR ürünlerinin, %1,5 agarozda safe dye boyası ilave edilerek DNA'nın ultraviyole ışığı altında görüntülenmesi için kullanıldı (Jena Bioscience, Almanya).

Tartım Cihazı

Besiyerleri, agaroz ve kimyasal maddelerin gerekli miktarlarda hazırlanabilmesi için kullanıldı (Sartorius, Almanya).

Vorteks

Koleksiyon tüplerindeki süspansiyonu karıştırarak homojenize etmesi için kullanıldı (MS1 Minishaker IKA, ABD).

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Tampon Solüsyonlar

Agaroz

DNA fragmentlerinin elektroforez tankında yürütülmesi için lineer bir polimer olan agaroz %1,5 olacak şekilde distile suda hazırlanarak kullanıldı (Sigma-Aldrich Low EEO, 9012-36-6, ABD).

Elektroforez Tamponu

Jel ortamında DNA'nın hareketinin sağlanabilmesi için 10xTAE buffer solüsyonu 1'e 9 oranında distile su ile hazırlanarak kullanıldı (Thermo Scientific, ABD).

Genomik DNA Ekstraksiyon Kiti

S. aureus olarak identifiye edilen bakteri kolonilerinden genomik DNA ekstraksiyonu için hazır ticari kit kullanıldı (NucleoGene Genomic DNA Extraction Kit, Türkiye).

Katalaz Test Ayıracı

H₂O₂..... 300 ml

Distile su. 1000 ml

Stok %30'luk H₂O₂ (Şifa Kimya, Türkiye) 1 ml üzerine 9 ml distile su eklenerek %3'lük test ayıracı hazırlandı.

Marker

Elektroforezde yürütülen DNA'ların ve kalıp DNA'nın büyüklüğünü ölçmek için 100 bp'lık marker kullanıldı (Thermo Scientific, ABD).

PZR Master Mix

Polimerizasyon reaksiyonu için içerisinde dNTP ve yüksek ısıya dayanıklı enzim olan Taq DNA polimeraz olan karışım kullanıldı (Thermo Scientific, ABD).

Yükleme Solüsyonu

DNA örneği ile karıştırılarak jelde yürütme sağlamak için kullanıldı (6x Loading Dye, NM0410 Thermo Scientific, ABD).

3.2. Yöntem

3.2.1. Süt Örneklerinin Toplanması

Burdur ili ve merkez köylerinde mastitis problemi bulunan sığır, koyun ve keçi işletmelerindeki hayvanlardan süt örnekleri toplandı. Bu amaçla, meme uçları %70 alkolle silinerek temizlendi, birkaç damla dışarı sağıldıktan sonra her meme lobundan olmak üzere ayrı ayrı steril tüplere 5-10 ml süt örneği alındı. Her tüpün üzerine alındığı hayvan ve meme lobuna dair bilgiler yazıldı. Süt örnekleri soğuk zincir altında Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına getirildi.

3.2.2. *S. aureus*'un İzolasyon ve İdentifikasyonu

Süt örnekleri %5-7 defibrine koyun kanı içeren kanlı agar (Merck, Almanya) ve MacConkey agar (Merck, Almanya)'a ekildi. Petriler aerobik ortamda 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Üreyen koloniler koloni morfolojisi, Gram boyama, katalaz, koagülaz, DNase gibi konvansiyonel bakteriyolojik yöntemlerle *S. aureus* olarak tanımlandı ve nutrient agara pasajları yapıldı. Saf kolonilerden gliserin içeren Brain

Heart Infusion broth (BHIB)'a alınarak DNA ekstraksiyonunda kullanılmak üzere - 80°C'de saklandı.

3.2.2.1. Katalaz Testi

Lam üzerine 1 damla test ayıracı H₂O₂ damlatıldı ve kanlı agardan öze ile alınan şüpheli *S. aureus* kolonisi test ayıracına değdirildi. Katalaz pozitif olan bakteriler hidrojen peroksiti su ve oksijene ayrıştırarak hava kabarcıkları oluşturdular. Katalaz negatif olan bakterilerde ise herhangi bir değişiklik gözlenmedi (Bannerman, 2003; Alen ve ark., 2006).

3.2.2.2. Lam Koagülaz Testi

Koagülaz pozitif stafilocokları, koagülaz negatif stafilocoklardan ayırt etmek için uygulandı. Bu amaçla temiz lam üzerine yan yana olacak şekilde eşit miktarda fizyolojik tuzlu su (FTS) ve tavşan plazması (Millipore, ABD) konuldu. Öze ile alınan koloni önce FTS ile sonrasında tavşan plazması ile karıştırıldı. Lam on saniye (sn) elde dairesel hareketlerle döndürüldü. Gözle görülen beyaz kümeleşmeler koagülaz pozitif olarak kabul edildi (Bannerman, 2003; Alen ve ark., 2006).

3.2.2.3. Mannitol Fermentasyonu

Besiyerinin içeriğindeki yüksek tuz konsantrasyonu, birçok Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerin üremesini engellemektedir. *S. aureus* şüpheli koloniler öze ile alınarak MSA'a ekildi ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Mannitolden asit oluşturarak besiyerinin fenol kırmızısı rengini sarıya dönüştüren bakteriler *S. aureus* olarak doğrulandı. Koloni etrafında renk değişimi olmayan bakteriler ise Koagülaz negatif stafilocok (KNS) olarak tanımlandı (Bilgehan, 2000; Alen ve ark., 2006).

3.2.2.4. Deoksiribonükleaz (DNase) Testi

S. aureus olarak tanımlanan koloniler DNase agara (Oxoid, UK) ekildi ve 37°C'de 48-72 saat inkübe edildi. Kolonilerin üzerini kaplayacak şekilde 1N HCl

eklendi. Birkaç dk içerisinde pozitiflik veren kolonilerin etrafında şeffaf zonların oluşması pozitif olarak değerlendirildi (Bridson, 2006).

3.2.2.5. Antibiyotik Duyarlılık Testi

Biyokimyasal yöntemler ile *S. aureus* oldukları belirlenen izolatların bakteri kültürlerinden saf koloniler alındı. Her izolat için ayrı ayrı tüplere TSB dağıtılarak alınan saf koloniler TSB içerisine eklendi. Hazırlanan bakteri süspansiyonu Müller-Hinton agarın her yerine eküvyon çubuğu ile yayıldı. Kuruması beklendikten sonra aralarında 2 cm olacak şekilde antibiyotik diskleri amoksisilin klavulanik asit (Oxoid, İngiltere), 30µg sefaperazon (Oxoid, İngiltere), 10µg penisilin G (Oxoid, İngiltere), 30µg sefkuinom (Oxoid, İngiltere), 10/10 µg ampisilin-sulbaktam (Oxoid, İngiltere), 30µg sefoksitin (Oxoid, İngiltere), 30µg oksitetrasiklin (Oxoid, İngiltere), 30µg seftiofur (Oxoid, İngiltere), 30µg gentamisin (Oxoid, İngiltere) ve 1µg oksasilin (Oxoid, İngiltere) yerleştirildi, 37°C’de 24 saat inkübe edildi ve zon çapları ölçülerek antibiyotik duyarlılıkları Clinical and Laboratory Standards Institutes (CLSI) referans değerlerine göre değerlendirildi (Jorgensen ve Turnidge, 2003; CLSI, 2013). *S. aureus* ATCC 25923 suşu kontrol olarak kullanıldı.

3.2.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

3.2.3.1. DNA Ekstraksiyonu

Biyokimyasal testler ile *S. aureus* olduğu belirlenen izolatların DNA ekstraksiyonu, ticari bir DNA ekstraksiyon kiti (NucleoGene Genomic DNA Extraction Kit, NGE001, Türkiye) kullanılarak yapıldı. Kit içerisinde çıkan yıkama bufferları kit prosedürüne göre hazırlandı ve DNA izolasyonu kit prosedürüne göre uygulandı. İzolatlar nutrient agara pasaj geçildi ve 37°C’de 24 saat inkübe edildi. Besiyerinde üreyen bakteriler öze yardımı ile 2 ml Brain Heart Infusion Broth (BHIB) içeren tüplere alınarak 37°C’de 24 saat bekletildi ve ependorf tüplerine aktarıldı. 5000

rpm’de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısım atıldı ve ardından bakteriyel hücre peleti üzerine 100µl Tris EDTA (TE) ve 20µl lizozim (Sigma, ABD) eklenerek 37°C’de 30 dk karıştırılarak inkübe edildi. Üzerine 400 µl lizis buffer ve 20 µl proteinaz K (Thermo Scientific, Litvanya) eklenerek 60 °C’de karıştırılarak 30 dk bekletildi. İnkübasyon sonrası 400µl binding buffer eklendi, karışım 15 sn vorteksle karıştırıldı. Karışımdan 800µl spin kolonuna aktararak 10000 rpm’de 2 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpteki sıvı atıldı ve spin kolonu yeni tüpe transfer edildi. Spin kolonuna 500µl Wash Buffer-I eklenerek 10000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi. Daha sonra spin kolonunun içerisinde bulunan tüp atılarak spin kolonu yeni koleksiyon tüpüne yerleştirildi. Spin kolonuna 750µl Wash Buffer-II eklenerek 10000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi, alttaki tüp atıldı ve spin kolonu yeni koleksiyon tüpüne yerleştirildi. Bu işlem 2 kez tekrarlandıktan sonra spin kolonu bir şey eklenmeden etanolün ayrışması amacıyla 10000 rpm’de 3 dk santrifüj edildi ve steril 1.5ml mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Daha sonra spin kolonunun merkezine 200µl elution buffer eklenerek oda ısısında 1 dk inkübe edildi ve 10000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi. Elde edilen DNA’lar -20°C’ye kaldırıldı.

3.2.3.2. *S. aureus*’un PZR ile Doğrulanması

Biyokimyasal testler sonucunda *S. aureus* olarak tanımlanan izolatlar *nuc* genini kodlayan primerler kullanılarak, PZR ile doğrulandı. Bu amaçla 25 µl’lik PZR karışımı, 5µl hedef DNA, 12,5µl PZR mastermix, 5,5µl PZR H₂O, 1µl primer R ve 1µl primer F içerecek şekilde hazırlandı. Amplifikasyon işlemi ısı döngü cihazında 95°C’de 10 dk başlangıç denatürasyonunu takiben, 45 siklus (94°C’de 45 sn, 55°C’de 30 sn ve 72°C’de 45 sn) devamında 72°C’de 7 dk şeklinde uygulandı. PZR ürünleri %1,5 agaroz jel içeren TAE (Thermo Scientific, ABD)’de safe dye ile boyanarak yürütüldü ve 279 bp’da oluşan bantların ait olduğu izolatlar *S. aureus* pozitif olarak değerlendirildi (Aksakal ve ark., 2022). Pozitif kontrolde *S. aureus* 25923 DNA’sı, negatif kontrolde ise bidistile su kullanıldı.

3.2.3.3. *S. aureus*'un Metisiline Direnç Genlerinin Saptanması

3.2.3.3.1. *mecA* Direnç Geninin Saptanması

PZR ile doğrulanan *S. aureus* suşlarında *mecA* gen varlığı araştırıldı. Bu gen bölgesinin amplifikasyonu için karışım 5µl template DNA, 12,5µl PZR Mastermix, 5,5µl PZR H₂O, 1µl Primer F (100 pmol) ve Primer R (100 pmol) toplam hacim 25µl olacak şekilde hazırlandı. Isı döngü cihazında 95°C'de 5 dk, 30 siklus (95°C'de 2 dk, 54°C'de 30 sn, 72°C'de 30 sn) devamında 72°C'de 5 dk tutuldu. PZR ürünleri %1,5 agaroz jel içeren TAE'de safe dye ile boyanarak yürütüldü ve 314 bp'da oluşan bantların ait olduğu izolatlar *mecA* pozitif metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) olarak değerlendirildi (Ardic ve ark., 2006). Pozitif kontrol olarak *S. aureus* 27 R, negatif kontrol olarak bidistile su kullanıldı.

3.2.3.3.2. *mecC* Direnç Geninin Saptanması

S. aureus izolatlarında *mecC* gen varlığını belirlemek için amplifikasyon karışımı 5µl template DNA, 5,5µl PZR H₂O, 12,5µl PZR mastermix, 1µl primer F (100 pmol) ve primer R (100 pmol) toplam hacim 25µl olacak şekilde hazırlandı. Isı döngü cihazında 94°C 5 dk ön denatürasyon ve 30 siklus 94°C 30 sn, 59°C 1 dk, 72°C 1 dk ardından 72°C 10 dk son zincir uzaması gerçekleştirildi. PZR ürünleri %1,5 agaroz jel içeren TAE'de safe dye ile boyanarak yürütüldü ve 138 bp'da oluşan bantların ait olduğu izolatlar *mecC* pozitif metisilin dirençli *S. aureus* olarak değerlendirildi (Stegger ve ark., 2012). Pozitif kontrol olarak *S. aureus* NCTC 13552 suşu, negatif kontrol olarak bidistile su kullanıldı.

3.2.3.4. *S. aureus*'un Antiseptiklere Direnç Genlerinin Saptanması

3.2.3.4.1. *qacA/B* ve *smr* Direnç Genlerinin Saptanması

qacA/B gen varlığının araştırılması için amplifikasyon karışımı 25µl hacimde (5µl DNA, 1µl her bir primer, 12,5µl master mix, 5,5µl H₂O) hazırlandı ve amplifikasyon 94°C'de 3 dk başlangıç denatürasyonunu takiben, 94°C'de 45

sn, 56°C’de 45 sn, 72°C’de 1 dk ve 72°C’de 10 dk gerçekleştirildi. PZR rnleri %1,5 agaroz jel içeren TAE’de safe dye ile boyanarak yürütüldü ve 220 bp’da oluşan bantların ait olduğu 3 izolat *qacA/B* pozitif olarak kabul edildi (Akin ve ark., 2020). Pozitif kontrol olarak önceki çalışmalarımızda elde edilen pozitif örneklerin DNA’sı, negatif kontrol olarak ise bidistile su kullanıldı.

smr gen varlığı için hazırlanan amplifikasyon karışımı da *qacA/B* amplifikasyon karışımı ile aynı şekilde 25l hacimde (5l DNA, 1l her bir primer, 12,5l master mix, 5,5l H₂O) hazırlandı. Amplifikasyon 94°C’de 3 dk başlangıç denatürasyon ile başlayarak, 35 siklus 94°C’de 45 sn, 56°C’de 45 sn, 72°C’de 1 dk ve 72°C’de 10 dk son zincir uzaması ile sonlandırıldı. PZR rnleri %1,5 agaroz jel içeren TAE’de safe dye ile boyanarak yürütüldü ve 249 bp’da bant oluşturan 2 izolat *smr* pozitif olarak kabul edildi (Akin ve ark., 2020). Pozitif kontrol olarak önceki çalışmalarımızda elde edilen pozitif örneklerin DNA’sı, negatif kontrol olarak ise bidistile su kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

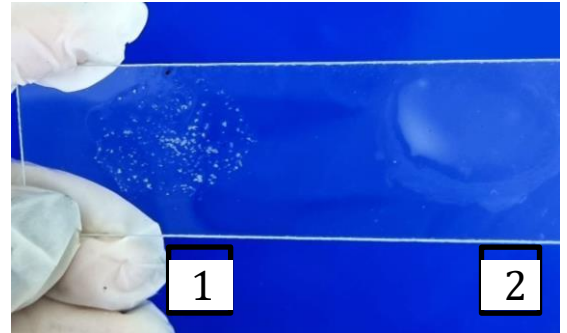
Çalışmada 694 adet süt örneğinden 196 Gram pozitif kok elde edilirken, 18'inden *Corynebacterium* spp., ve 3'ünden *Trueperella pyogenes* izole edildi. Biyokimyasal testlerle Gram pozitif kok olduğu belirlenen izolatların katalaz testi ile (Şekil 4.1.) 149'u katalaz pozitif olarak belirlendi. Katalaz pozitif *Staphylococcus* spp. izolatlarının koagülaz testi (Şekil 4.2.) ile 88'i pozitif saptandı. Gram pozitif kokların 75'i *S. aureus*, 61'i KNS, 13'ü *Staphylococcus* spp., 47'si *Streptococcus* spp. olarak tanımlandı (Tablo 4.1.).

Tablo 4.1. Süt örneklerinden izole edilen bakteriler ve dağılımları.

Bakteri Cinsi/Türü	İzolat sayısı	%
<i>S. aureus</i>	75	34,56
<i>Staphylococcus</i> spp.	13	5,99
KNS	61	28,11
<i>Streptococcus</i> spp.	47	21,65
<i>Trueperella pyogenes</i>	3	1,38
<i>Corynebacterium</i> spp.	18	8,29



Şekil 4.1. Katalaz Testi



Şekil 4.2. Koagülaz testi.

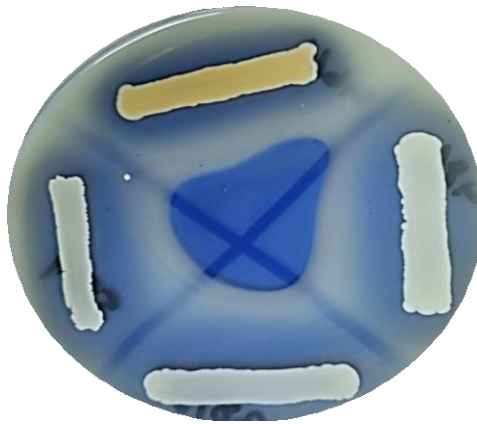
Pozitif (1) ve negatif (2)

Katalaz ve koagülaz pozitif olan ve *S. aureus* olarak tanımlanan izolatlar MSA besiyerine ekildi. Besiyerinin rengini değiştirerek etrafında sarı zon oluşturan 79 izolat mannitol pozitif kabul edildi (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. Mannitol Salt Agar'da *Staphylococcus* spp. izolatları.

Mannitol pozitif 79 izolat DNase agara ekildi ve DNase enzimine sahip olan 75 izolatın besiyerindeki DNA'yı parçalayarak kendi çevrelerinde şeffaf zon oluşturduğu ve tüm yapılan biyokimyasal testler doğrultusunda 75 adet izolatın *S. aureus* olduğu belirlendi (Şekil 4.4.). Bu izolatların 60'ı *nuc* genine spesifik primerler kullanılarak *S. aureus* olarak doğrulandı.



Şekil 4.4. DNase agarda *S. aureus* izolatları.

S. aureus olarak doğrulanan 60 izolatın antibiyotiklere karşı duyarlılık/dirençlilik durumları disk difüzyon yöntemi ile CLSI (2013) referans değerleri dikkate alınarak zon çapları ölçülerek değerlendirildi (Tablo 4.2.). Buna göre *S. aureus* izolatlarının 58 (%96,67)'i gentamisin ve oksasiline, 56(%93,33)'sı sefoperazon ve seftiofur, 55 (%91,66)'i sefoksitin, 54 (%89,99)'ü amoksisilin klavulonik asit, 50 (83,33)'si oksitetrasikline duyarlı bulunurken, 24 (%39,99)'ü sefkuinom, 21 (%34,99)'i penisilin, 9 (%14,99)'u ampisilin sulbaktama, 7 (%11,66)'si oksitetrasikline dirençli saptandı.

Tablo 4.2. *S. aureus* izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları.

Antibiyotikler	S	I	R
Amoksisilin klavulanik asit	54	-	6
Sefaperazon	56	3	1
Penisilin G	39	-	21
Sefkuinom	36	-	24
Ampisilin- sulbaktam	49	2	9
Sefoksitin	55	4	1
Oksitetrasiklin	50	3	7
Seftiofur	56	1	3
Gentamisin	58	2	-
Oksasilin	58	-	2

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

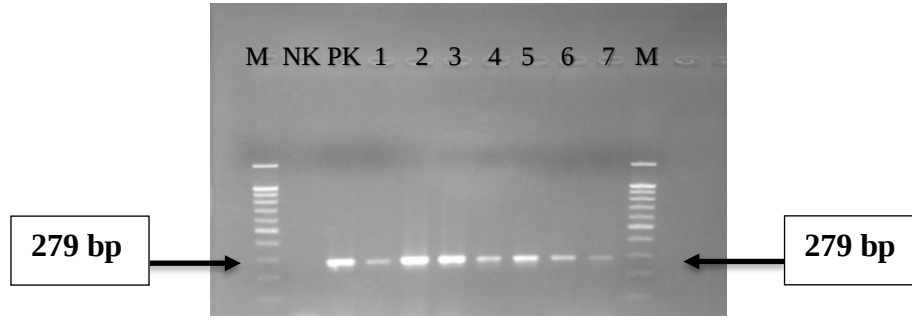
4.2. PZR Bulguları

Bu çalışma için toplanan süt örneklerinden izole edilen ve biyokimyasal testler ile *S. aureus* olarak tanımlanan 75 izolatın doğrulanması amacıyla *nuc* geni varlığını ortaya koymak için PZR uygulandı (Tablo 4.3.). Biyokimyasal testlerle *S. aureus* olarak tanımlanan izolatların 60 (%80)'ında *nuc* geni tespit edildi (Şekil 4.5.).

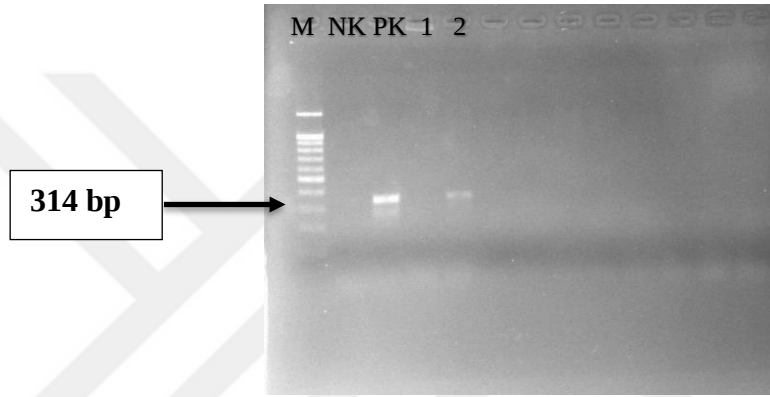
Tablo 4.3. *S. aureus* izolatlarında *nuc*, *mecA*, *mecC*, *smr*, *qacA/B* genleri.

Gen Adı	İzolat sayısı	%
<i>nuc</i>	60	80
<i>mecA</i>	1	1,33
<i>mecC</i>	0	0
<i>smr</i>	2	2,67
<i>qacA/B</i>	3	4

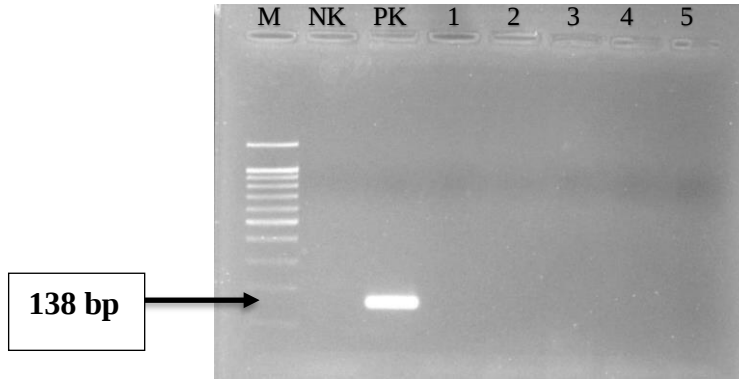
İzolatların metisiline dirençli olup olmadığını saptamak amacıyla spesifik primerler kullanılarak *mecA* ve *mecC* gen varlığı araştırıldı. Sığır süt örneklerinden izole edilen 1 *S. aureus* izolatında *mecA* geni (%1,33) saptandı (Şekil 4.6.). Koyun ve keçi izolatlarında *mecA* geni belirlenemedi. Çalışmada elde edilen izolatların hiçbirinde *mecC* geni saptanamadı (Şekil 4.7.).



Şekil 4.5. *S. aureus* izolatlarında *nuc* gen varlığı (M: marker (100 bp); NK: negatif kontrol, distile su; PK: pozitif kontrol, *S. aureus* 25923 suşu; 1-7: *nuc* pozitif *S. aureus* izolatları).

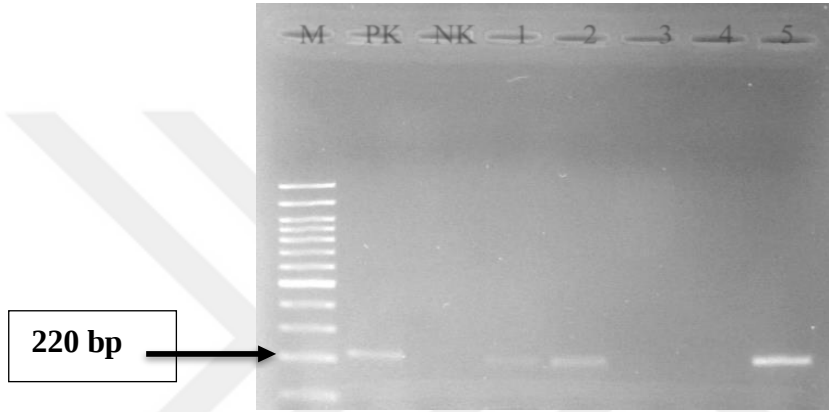


Şekil 4.6. *S. aureus* izolatlarında *mecA* gen varlığı (M: marker (100 bp); NK: negatif kontrol, distile su; PK: pozitif kontrol, 27R *S. aureus* suşu; 1: *mecA* negatif *S. aureus* izolatı 2: *mecA* pozitif *S. aureus* izolatı).

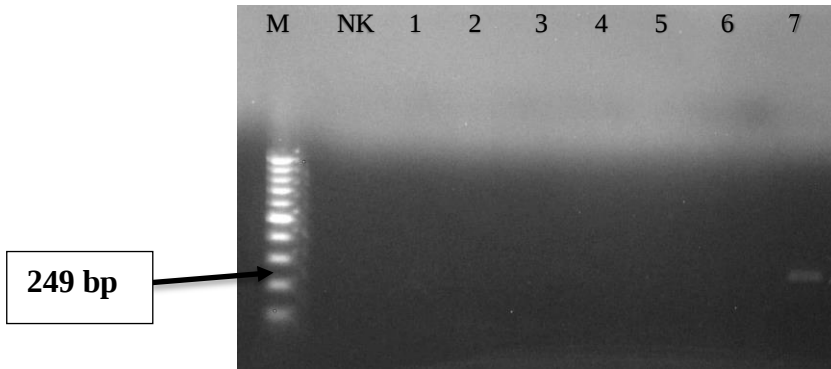


Şekil 4.7. *S. aureus* izolatlarında *mecC* gen varlığı (M: marker (100 bp); NK: negatif kontrol, distile su; PK: pozitif kontrol, NCTC 13552 *S. aureus* suşu; 1-5 *mecC* negatif *S. aureus* izolatları).

Bu çalışmada, *S. aureus* izolatlarının antiseptiklere direncini tespit etmek için *qacA/B* ve *smr* genleri için spesifik primerler kullanılarak bu genlerinin varlığı PZR ile araştırıldı. Sığır sütlerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının 3 (%4)'ünde *qacA/B* gen varlığı belirlendi. Koyun ve keçi sütlerinden elde edilen izolatlarda bu gen saptanamadı. *smr* geni ise 1 koyun ve 1 sığır *S. aureus* izolatında olmak üzere 2 (%2,67) izolatta belirlendi. Hiçbir izolatta *qacA/B* ve *smr* geni birlikte saptanamadı. Bu çalışmada metisiline ve antiseptiklere direnç genleri aynı izolatta belirlenemedi (Şekil 4.8., Şekil 4.9.).



Şekil 4.8. *S. aureus* izolatlarında *qacA/B* gen varlığı (M: marker (100 bp); PK: pozitif kontrol, önceki çalışmalarımızdan elde edilen pozitif örnek DNA'sı; NK: negatif kontrol, distile su; 1,2,5: *qacA/B* pozitif *S. aureus* izolatları; 3,4: *qacA/B* negatif *S. aureus* izolatla



Şekil 4.9. *S. aureus* izolatlarında *smr* gen varlığı (M: marker (100 bp); NK: negatif kontrol, distile su; 1-6: *smr* negatif *S. aureus* izolatları; 7: *smr* pozitif *S. aureus* izolatı

5. TARTIŞMA

Tüm dünyada süt yönlü yetiştiriciliğin en önemli problemi olan mastitis, ciddi ekonomik kayıplara yol açan önemli bir hastalıktır. Mastitisin etiyolojisinde 120'den fazla bakteriyel, viral ve fungal mikroorganizma türü rol oynamaktadır (Zhang ve ark., 2022). Sığır, koyun ve keçi mastitislerinden genellikle *S. aureus* izole edilmesine karşın, KNS, *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *T. pyogenes*, *Pasteurella* spp., *Pseudomonas* spp., *Mycoplasma* spp., *Bacillus* spp., enterobakteriler ve *Corynebacterium* spp., izolasyonları da bildirilmiştir (Ebrahimi ve ark., 2007; Sevinti ve Şahin, 2009; Gebrewahid ve ark., 2012; Büyükcangaz ve ark., 2013; Genç ve Kaya, 2015; Gökhan ve Gülaydın, 2020). Bu çalışmada da araştırmacıların bulgularına benzer olarak en fazla stafilokoklar izole edilmiş, *S. aureus*'un en sık izole edilen etken olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte sunulan çalışmada KNS, *Streptococcus* spp., *T. pyogenes* ve *Corynebacterium* türlerinin de izolasyonu yapılmıştır.

S. aureus'un tanımlanmasında konvansiyonel yöntemler (Gram boyama, katalaz, koagülaz, DNase testi, MSA'da üreme vb.) ve moleküler yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır. Bazı araştırmacılar fenotipik testlerin performansında farklılıklar bildirmişler, en az üç fenotipik testin identifikasyonda kullanılması gerektiğini ifade etmişlerdir (Kateete ve ark., 2010). *S. aureus*'un moleküler teşhisi PZR yöntemleri ile yapılmakta olup, genellikle *femA* ve *nuc* gibi genlerin varlığının gösterilmesi ile yapılmaktadır (Unal ve ark., 1992; Turutoglu ve ark., 2009; Ozturk ve ark., 2019; Nalça ve Gülhan, 2021; Aksakal ve ark., 2022). Bazı araştırmacılar tarafından *S. aureus*'un moleküler teşhisinde *nuc* geninin türe spesifik olduğu bildirilmiş ve birçok çalışmada identifikasyonda kullanılmıştır (Gökdağ ve Çiftçi, 2021; Nalça ve Gülhan, 2021; Aksakal ve ark., 2022; Roshan ve ark., 2022). Nalça ve Gülhan (2021) mastitisli sığır sütlerinden izole ettikleri 140 adet *Staphylococcus* spp.'nin 42'sinde (%29,99), Gökdağ ve Çiftçi (2021) 121 *Staphylococcus* spp.'nin 86'sında (%71,07); Roshan ve ark. (2022) 500 sığır sütü örneğinden izole ettikleri 56 *S. aureus* izolatının 42'sinde (74,99); Aksakal ve ark. (2022) 40 *Staphylococcus* spp. izolatının 19'unda (%47,5) *nuc* genini saptadıklarını bildirmişlerdir. Feyissa ve ark. (2023) laktasyon dönemindeki

258 hayvanın süt örneklerinden izole ettikleri 43 adet *S. aureus* izolatının tümünün; Sheet (2022) ise 66 örnekten izole ettiği 23 *S. aureus*'un tümünün *nuc* geni pozitif (%100) olduğunu bildirmiştir. Sunulan bu çalışmada, konvansiyonel yöntemlerle *S. aureus* olarak tanımlanan 75 izolatın, *nuc* geni ile 60 (%80)'inin *S. aureus* olduğu doğrulandı. Bu durum fenotipik testlerin performansında farklılıklar olabileceğini gösteren araştırmaları desteklemektedir.

Tüm dünyada MRSA enfeksiyonları insan ve hayvanlarda giderek artan bir problemdir. Metisilin dirençli izolatlar, birçok antibiyotiğe dirence, dolayısıyla da tedavide güçlüklerle yol açmaktadır (Unal ve ark., 1992). MRSA enfeksiyonları çiftlik hayvanlarında ekonomik kayıplara yol açmalarının yanı sıra, insanlara bulaşarak enfeksiyonlara neden olmaları nedeniyle halk sağlığı açısından da büyük öneme sahiptir. *S. aureus* izolatlarında metisilin direncinin belirlenmesinde PZR ile *mecA* geninin saptanması, altın standarttır (Chambers, 1997). Türkiye'de ve dünyada inek sütlerinden elde edilen *S. aureus* izolatlarında metisilin direncini göstermeye yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır (Türkyılmaz ve ark., 2010; Pehlivanoglu ve Yardımcı, 2012; Büyükcangaz ve ark., 2013; Ünal 2013; Sayın ve ark., 2016). Türkyılmaz ve ark. (2010) mastitisli sığırlardan izole edilen 93 *S. aureus* izolatının 16 (%17,20)'sında, Pehlivanoglu ve Yardımcı (2012) 65 *S. aureus* izolatının 25 (%38,46)'inde, Büyükcangaz ve ark., (2013) 151 *S. aureus* izolatının 24 (%15,89)'ünde, Ünal (2013) 60 *S. aureus* izolatının 2 (%3.30)'sinde, Sayın ve ark., (2016) 150 *S. aureus* izolatının 21 (%75)'inde PZR ile *mecA* geni saptadıklarını bildirmişlerdir.

Keçi sütlerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarında da metisilin direncini belirlemek için *mecA* gen varlığı araştırılmıştır (Cortimiglia ve ark., 2015; Ozturk ve ark., 2019; Bhagya ve ark., 2022). Cortimiglia ve ark. (2015) keçi tank sütü örneklerinden izole edilen 85 *S. aureus* izolatının 4 (%2.0)'ünde, Bhagya ve ark. (2022) mastitisli 66 keçiden izole edilen 10 *S. aureus* izolatının 2 (%3.03)'sinde *mecA* geni saptamışlardır. Ozturk ve ark. (2019) ise mastitisli keçilerden toplanan süt örneklerinden izole edilen 43 *S. aureus* izolatında *mecA* geni belirlemediklerini bildirmişlerdir.

Subklinik mastitisli koyunlardan izole edilen *S. aureus* izolatlarında *mecA* gen varlığını göstermeye yönelik az sayıda çalışma bulunmaktadır (Şeker ve ark., 2019; Rahbarnia ve ark., 2023). Şeker ve ark. (2019) Pırlak koyunlarından toplanan 464 süt örneğinden 13 *S. aureus* izolasyonu yapıldığını, 3'ünde *mecA* saptandığını bildirmişlerdir. Rahbarnia ve ark. (2023) mastitisli 122 koyundan izole edilen 58 *S. aureus* izolatının 24 (%41,37)'ünde *mecA* bildirmişlerdir.

Sunulan bu çalışmada sığır, koyun ve keçilerden toplanan süt örneklerinden izole edilen 60 *S. aureus* izolatının sadece 1 (%1,33)'inde *mecA* geni saptandı. MRSA pozitif bu izolat sığırlardan elde edilen sütlerden elde edildi. Bu çalışmada elde edilen bu oran, yukarıda bildirilen çalışmalarda elde edilen bulgulardan oldukça düşük bulundu. Burdur'da Pehlivanoglu ve Yardımcı (2012) tarafından yapılan çalışmada sığır sütlerinden elde edilen *S. aureus* izolatlarında *mecA* yüksek oranda bildirilmesine karşın, bu çalışmada oldukça düşük oranda belirlendi. Sunulan bu çalışmada, Burdur'da yapılan diğer bir çalışmaya (Ozturk ve ark., 2019) benzer olarak *S. aureus* izolatlarının bir tanesi haricinde *mecA* saptanamamıştır. Sığır sütlerinde MRSA izolasyonu düşük oranda belirlenmiş olsa da zoonotik önemi nedeniyle halk sağlığı açısından önemlidir. Keçi ve koyun sütlerinden MRSA izolasyonunun yapılmaması, Burdur ilinde koyun ve keçi sütlerinin MRSA izolatlarının insana bulaşında şu anda önemli olmadığını göstermektedir.

Garcia-Alvarez ve ark. (2011) tarafından mastitisli ineklerden izole edilen ve fenotipik testlerle MRSA olarak tanımlanan izolatların PZR ile *mecA* negatif ve PBP2a aglütinasyon testlerinde negatif bulunduğunu, gen sekans analizleri ile metisiline dirençli yeni bir gen bölgesini belirlediklerini rapor etmişlerdir. *mecC* olarak adlandırılan bu gen bölgesi, *mecA* genine yaklaşık %70 benzerlik göstermektedir (Ito ve ark., 2012). *mecC* geninin tanımlandığı 2011 yılından sonra hayvanlarda MRSA'nın tanımlanmasında *mecA* ile birlikte *mecC* varlığı da araştırılmaktadır. Birçok Avrupa ülkesinde insan ve hayvanlarda *mecC* pozitif MRSA izolatları bildirilmiştir (Eriksson ve ark., 2013; Garcia-Garrote ve ark., 2014; Loncaric ve ark., 2013; Medhus ve ark., 2013; Sayın ve ark., 2016).

Dünya genelinde mastitisli hayvanların (inek ve koyun) sütlerinden izole edilen *S. aureus*'larda *mecC* genine rastlanmıştır. İspanya'da %0,16, Finlandiya'da %0,6, İsveç'te %0,7, İngiltere'de %2,1 oranında *mecC* pozitif MRSA izolatları tespit edilmiştir (Gindonis ve ark., 2013; Unnerstad ve ark., 2013; Ariza- Miguel ve ark., 2014; Paterson ve ark., 2014). Alves ve ark. (2020) Brezilya'da sığırlardan izole ettikleri 35 *S. aureus* izolatının 9'unda *mecC* geninin pozitif olduğunu bildirmişlerdir.

Türkiye'de *mecC* varlığını ortaya koymaya yönelik çalışmalar sınırlıdır (Kılıç ve ark., 2015; Cıkman ve ark., 2019; Ceylan ve ark., 2022). Kılıç ve ark. (2015) 2007-2014 yılları arasında insanlardan izole edilen 1700 *S. aureus* izolatının 523 (%30,7) ünde *mecA* saptadıklarını, ancak izolatların hiçbirinde *mecC* belirleyemediklerini bildirmişlerdir. Cıkman ve ark. (2019) Türkiye'nin 7 bölgesinden 2013-2016 yılları arasında toplanan 494 MRSA izolatında, Ceylan ve ark. (2022) ise insanlardan izole edilen 126 MRSA izolatında *mecC* bulunmadığını rapor etmişlerdir. Araştırmacılar ülkemizde *mecC* geni taşıyan MRSA izolatlarının ciddi halk sağlığı problemlerine henüz yol açmadığını bildirmişlerdir.

Türkiye'de çiftlik hayvanlarının süt ve süt ürünlerinden izole edilen *S. aureus* suşlarında *mecC* genini ortaya koymaya yönelik az sayıda çalışma bulunmaktadır (Doğan ve ark., 2016; Sayın ve ark., 2016; Taban ve ark., 2021). Sayın ve ark. (2016) mastitisli inek sütlerinden izole edilen MRSA suşlarında *mecC* varlığını ortaya koymalarına karşın, Doğan ve ark. (2016) 2011-2013 yılları arasında Burdur ve Aydın'daki Veteriner Fakülteleri tarafından mastitisli çiftlik hayvanlarından (94 sığır, 45 koyun ve 38 keçi) izole edilen 177 *S. aureus* izolatında *mecA* ve *mecC* gen varlığını araştırdıkları çalışmada, 45 izolatta *mecA* geni saptadıklarını, *mecC* ise belirleyemediklerini rapor etmişlerdir. Taban ve ark. (2021) ise süt ve süt ürünlerinde metisiline direnç genlerini (*mecA*, *mecC*) araştırdıkları çalışmada süt örneklerinin 2'sinden *mecA*, pasta kremasının 2'sinde *mecC* ve pasta kremasının 1'inde *mecA* ve *mecC* genlerini birlikte belirlediklerini rapor etmişlerdir. Sur ve ark. (2013) mastitisli süt örneklerinden izole ettiği *S. aureus*'ların %4,6'sında *mecC* pozitif MRSA bildirmişlerdir.

Sunulan çalışmada sığır, koyun ve keçi süt örneklerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarında *mecC* geni saptanamamıştır. Benzer şekilde Doğan ve ark. (2016) da yaptıkları çalışmada Burdur'dan daha önce izole edilen *S. aureus* izolatlarında *mecC* geni saptayamadıklarını bildirmişlerdir. Bu sonuçlar, Burdur ilinde *mecC* geni taşıyan MRSA izolatlarının halk sağlığı açısından henüz problem olmadığını göstermektedir. Bununla birlikte *mecC* geni ilk kez çiftlik hayvanlarından izole edilen *S. aureus* izolatlarında tanımlanmıştır. Çiftlik hayvanlarından insanlara *mecC* pozitif MRSA izolatlarının yayılması mümkündür. Bu nedenle çiftlik hayvanlarında *mecC* varlığı belli aralıklarla takip edilmelidir.

Biyositlere dirençli *S. aureus* suşlarının plazmidlerinde, povidon-iyot, klorheksidin, kuaterner amonyum bileşikleri gibi antiseptik maddelere direnç oluşumundan sorumlu olan *qac* genleri mevcuttur (Nakipoğlu ve ark., 2012). *qac* genlerinden *qacA/B* geni, biyosit direnci ile yüksek derecede ilişkilendirilmekte olup, *smr* geni de biyosit direnç genlerinin varlığını inceleyen çalışmalarda araştırılmaktadır. İnsan (Noguchi ve ark., 1999; Mayer ve ark., 2001; Alam ve ark., 2003; Miyazaki ve ark., 2007; Smith ve ark., 2008; Vali ve ark., 2008; Wang ve ark., 2008; Opacic ve ark., 2010; Longtin ve ark., 2011) ve hayvanlarda (Ebner ve ark., 2013; Monecke ve ark., 2013; Wong ve ark., 2013; Qu ve ark., 2019; Kotb ve Gafer, 2020; Saidi ve ark., 2021) bu genlerin araştırıldığı çalışmalar Dünya genelinde çok sayıda olup Türkiye'de birkaç çalışma ile sınırlı kalmıştır.

Dünya genelinde izole edilen *S. aureus*'ların; Amerika ülkelerinde %7,6'sının *qacA/B*, %9'unun *smr*; Avrupa ülkelerinde %1,9-42'sinin *qacA/B*, %1,9-44 *smr*; Asya ülkelerinde %40'ının *qacA/B* ve Afrika ülkelerinde %40,5'inin *qacA/B* direnç genlerini bulundurdıkları bildirilmiştir (Hassanzadeh ve ark., 2020). Bjorland ve ark. (2001) içeriğinde kuaterner amonyum bileşikleri olan bir meme başı kremi kullanan işletmede 55 *S. aureus* izolatının 3 tanesinin *qac* dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Hayvanlarda yapılan çalışmalarda *qacA/B* ve *smr* genlerinin farklı oranlarda saptandığı bildirilmiştir (Wong ve ark., 2013; Monecke ve ark., 2013; Ebner ve ark.,

2013; Ammar ve ark., 2016; Qu ve ark., 2019; Kotb ve Gafer, 2020; Saidi ve ark., 2021). Çin’de klinik mastitisli inek sütlerinden izole edilen 96 *S. aureus* izolatında *qacA/B* ve *smr* genlerinin varlığı araştırılmış, *S. aureus* izolatlarının hiçbirinde direnç genlerine rastlanmamıştır. *Staphylococcus* spp. olarak tanımlanan 112 izolatın ise 13’ünün (% 12) *smr* genine sahip olduğu bildirilmiştir (Qu ve ark., 2019). Kotb ve Gafer (2020) dezenfeksiyonunda benzalkonyum klorürü kullanan süt işletmesinde, subklinik mastitisli ineklerden topladıkları 400 süt örneğinin 103’ünü *S. aureus* olarak izole etmişler ve 13’ünün (%12,62) *qacA/B* genine sahip olduğunu ortaya koymuşlardır. Saidi ve ark. (2021) Cezayir’de yaptıkları çalışmada mastitisli sığır sütlerinden izole ettikleri 35 *Staphylococcus* spp.’nin hiçbirisinde *qacA/B* ve *smr* genlerinin olmadığını bildirmiştir.

Türkiye’de yapılan çalışmalarda ise Akın ve ark. (2020) tavuk karkası, inek süt tankı, mastitisli süt örnekleri ve peynirlerden izole ettikleri 90 *S. aureus* izolatının %18,8’inde (süt ve peynir) *qacA/B*, %2,2’sinde (tavuk karkası) *smr* gen varlığını bildirmişlerdir. Ergun ve ark. (2017) Burdur’da mastitisli sığır sütlerinden izole edilen 36 *Staphylococcus* spp. izolatının 3’ünde *qacA/B*, 2’sinde *smr* geni, Hatay’dan izole edilen 47 *Staphylococcus* spp. izolatının 6’sında *qacA/B* ve Van’dan izole edilen 200 *Staphylococcus* spp. izolatının 7’sinde *qacA/B*, 2’sinde ise *smr* gen varlığını tespit etmişlerdir. Cantekin ve ark. (2019) Hatay’da yaptıkları çalışmada subklinik mastitisli keçilerden 30 stafilocok izole etmiş ve izolatların 1’inde *qacA/B*’ye rastladıklarını, *smr* genine ise hiçbir izolatta rastlamadıklarını ortaya koymuşlardır.

Sunulan bu çalışmada ise 90 inek, 60 koyun ve 107 keçiden toplanan sütlerden izole edilen 60 *S. aureus* izolatının 2 (%2,67)’sinde (koyun ve inek izolatu) *smr* ve 3 (%4)’ünde (inek izolatları) *qacA/B* geni PZR metodu ile tespit edilmiştir. Diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında, *smr* geninin genellikle hayvan karkaslarından elde edilen stafilocoklardan saptandığı görülmektedir (Ebner ve ark., 2013; Monecke ve ark., 2013; Wong ve ark., 2013; Akın ve ark., 2020). Qu ve ark. (2013) ile Ergun ve ark. (2017) *smr* genini stafilocok türlerinde saptamasına karşın, *S. aureus* izolatlarında bu gen tespit edilememiştir. Sunulan bu çalışmada Türkiye’de toplanan süt örneklerinden elde edilen *S. aureus* izolatlarında ilk kez *smr* direnç geni belirlenmiştir. Kotb ve Gafer (2020) *S. aureus* izolatlarının %12,62’sini, Akın ve ark. (2020) *S. aureus*

izolatlarının %18,8'ini, Ergun ve ark. (2017) *Staphylococcus* spp. izolatlarının %8,33'ünde *qacA/B* gen varlığını ortaya koymuştur. Bu çalışmada ise *S. aureus* izolatlarının %3,3'ünde *qacA/B* gen varlığı saptandı. *S. aureus* izolatlarında *qacA/B* ve *smr* genlerinin hiçbirisinin saptanamadığı çalışmalar da mevcuttur (Ammar ve ark., 2016; Saidi ve ark., 2021). Stafilokokların izole edildiği hayvan türleri, çalışmaların yapıldığı ülkelerin konumları ve hayvanlarda kullanılan antiseptik ve dezenfektanların farklı olması, kullanım süresi, dilüsyon oranı gibi faktörler *S. aureus* izolatlarında direnç genlerinin farklı oranlarda saptanmasına yol açmaktadır.

S. aureus enfeksiyonlarının tedavisinde yanlış antibiyotik seçimi, bilinçsiz ve sık antibiyotik kullanımı antimikrobiyal ajanlara direnç gelişimine yol açmaktadır (Öncül, 2010). Özellikle İngiltere ve Avrupa'da önemli salgınlara yol açan MRSA'lar hastane kaynaklı, toplum kaynaklı ve çiftlik hayvanları ile ilişkili olarak tüm dünyada görülmekte ve tehdit oluşturmaktadır (Gindonis ve ark., 2013; Sancak, 2011). MRSA'ların erken ve doğru teşhisi tedavi için büyük önem taşımaktadır.

S. aureus izolatlarında antibiyotiklere direncin sıklıkla gelişmesi, *S. aureus* enfeksiyonlarının tedavisinde antibiyotik duyarlılık testlerinin önemini ortaya koymaktadır. Türütoğlu ve ark. (2006) *S. aureus* izolatlarını penisiline %62,1, ampisiline %56,3 ve amoksisiline %45,6 dirençli bulmuştur. Aslantaş ve ark. (2011) subklinik sığır mastitis vakalarından izole edilen 104 stafilokok izolatından %25'inin makrolid ve linkozamide dirençli olduğunu saptamıştır.

Genç ve Kaya (2015) 28 *S. aureus* izolatının %70'inin enrofloksasine, tümünün ise penisiline direnç gösterdiğini; %60'ı ampisiline duyarlı iken izolatların tamamının trimetoprim sülfametoksazole duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir. Kosova'da mastitisli ineklerin sütlerinden izole edilen 89 *Staphylococcus* spp. izolatının eritromisine %3,3, tetrasikline %50,6, penisiline %91 ve ampisiline %68,5 oranında direnç gösterdiği belirlenmiştir (Mehmeti ve ark., 2016). Çin'in Kuzeybatı'sında yapılan başka bir çalışmada, *S. aureus* izolatlarının %84,1'i penisiline, %15,9'u tetrasikline, %20,4'ü ise eritromisine dirençli bulunmuştur (Yang ve ark., 2016).

Tassew ve ark. (2016), *S. aureus* izolatlarının tümünü eritromisine duyarlı, tetrasikline %77,4, sefoksitine %47,2, penisiline %100 oranında dirençli bulmuştur. Uruguay'da 2008-2015 yılları arasında 12 farklı şehirden mastitisli ineklerde toplanan süt örneklerinden yapılan çalışmada 2010 yılında penisiline (%36,9), 2015 yılında ise eritromisine (%5,7) en yüksek direncin görüldüğü bildirilmiştir (Santos ve ark., 2017).

Can ve Ergün (2017) *S. aureus* izolatlarının eritromisin (%66), tetrasiklin (%62,5), ampisilin (%60,7), penisilin (%60,7), sefoksitin (%50), oksasilin (% 46,4) ve kloramfenikole (%5,3) dirençli olduğunu belirlemiştir. Hamid ve ark. (2017) 36 *S. aureus* izolatından 34'ünün (%94,4) penisiline, 30'unun (%83,3) ampisiline, 28'inin (%77,7) amoksisilin-sulbaktama, 24'ünün (%66,6) enrofloksasine, 18'inin (%50) seftriaksona ve 10'unun (%27,70) metisiline dirençli olduğunu saptamıştır. Çin'in başkenti Pekin'de *S. aureus* izolatlarının en çok penisilin (%31,3), siprofloksasin (%18,8) ve enrofloksasine (%15,6) direnç gösterdiği, eritromisine %5,2 ve tetrasikline ise %1 oranında direnç tespit edildiği bildirilmiştir (Wang ve ark., 2018).

Kırkan ve ark. (2005), *S. aureus* suşlarının tümünün siprofloksasine, neomisine, basitrasine, tetrasikline; %85'inin kanamisin, sefkuinom ve amoksisilin klavulanikaside duyarlı ve penisilin (%95) ile oksasilin (%60)'e dirençli olduğunu tespit etmiştir. Aynı araştırmacılar 2018'de yaptıkları çalışmada ise sefoksitin, siprofloksasin, vankomisin, tigesiklin ve fosfomisine duyarlı, linezolide ise %85,2'sinin duyarlı ve klindamisine %100, tetrasikline %82,4 dirençli olduğunu bildirmiştir (Kırkan ve ark., 2018).

Hancı ve ark. (2018) tüm MRSA izolatlarının oksasiline dirençli olduğunu açıklamıştır. Sur ve ark. (2019) antibiyotik duyarlılık testlerinde enrofloksasine, linezolide ve vankomisine duyarlılık; ampisiline %58, penisiline %100, tetrasikline %35,5, trimetoprim sülfametoksazole %51,6, sefoksitine %80,6 ve eritromisine %29,1 oranında dirençlilik saptamıştır. Shah ve ark. (2019) MRSA'ların, metisilin ve diğer penisilin grubu antibiyotiklere karşı direnç gösterdiğini saptamıştır.

Alves ve ark. (2020) izole ettiği 35 *S. aureus* izolatının 26 tanesinde penisiline direnç tespit etmiştir. Gökdağ ve Çiftçi'nin çalışmasında (2021) *S. aureus* izolatlarının penisilin G' ye %50 (43/86), amoksisilin/klavulanik aside %40,7 (35/86), oksasiline

%34,9 (30/86), tetrasikline %23,3 (20/86), sefaperazona %22,1 (19/86), teikoplanine %18,6 (16/86), vankomisine %10,5 (9/86) ve trimetoprim-sulfamethoxazole %8,1 (7/86) oranında dirençli bulunmuştur. Roshan ve ark. (2022) *S. aureus* izolatlarının sefoksitine ve seftazidime %75, amoksisiline %71,4, sefotaksime %67,8, sefepime %66,1, oksasiline %64,3, norfloksasine %60,7 ve gentamisine %8,9 direnç gösterdiği bildirilmiştir. Başka bir çalışmada *S. aureus* izolatların oksitetrasiklin, penisilin ve florokinolonlara karşı dirençli; metisilin ve sefuroksime karşı ise duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Neelam ve ark., 2022). Khairullah ve ark. (2022) *S. aureus* izolatlarının %15'inin oksasiline, %12,5'inin sefoksitine dirençli olduğunu belirlemişlerdir. Feyissa ve ark. (2023) çalışmasında *S. aureus* izolatları penisiline, tetrasikline ve oksitetrasikline direnç göstermiştir. Zhang ve ark. (2022) izolatların penisilin G'ye (%91,95) yüksek oranda direnç gösterdiği ancak hepsinin nitrofurantoin ve sülfametoksazol/trimetoprime duyarlı olduğu belirlemiştir. Nunez ve ark. (2023) çoğunlukla penisilin (%87,7), tetrasiklin (%12,3), oksasilin (%10,5) ve gentamisin (%10,5) direnci saptamıştır.

Sunulan bu çalışmada ise disk difüzyon yöntemi ile yapılan antibiyotik duyarlılık testleri sonucunda fenotipik olarak *S. aureus* olduğu tanımlanan 60 izolatın 24'ünün sefkuinoma, 21'inin penisiline, 9'unun ampisilin sulbaktama 7'sinin oksitetrasikline, 6'sının amoksisilin klavulanik aside, 3'ünün seftiofura, 2'sinin oksasiline, 1'inin sefaperazona, 1'inin sefoksitine direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmaların çoğunda en çok direnç görülen antimikrobiyal ajan penisilin olarak belirlenmiş fakat bu çalışmada ise *S. aureus* izolatlarının en çok sefkuinoma direnç gösterdiği bunu penisilinin takip ettiği belirlenmiştir. Nitekim *S. aureus* izolatlarının çoğu penisiline direnç göstermektedir (Unal, 1992). Bu antibiyotikleri takiben amoksisilin klavulanik asit, tetrasiklin ve oksasiline direnç saptanmıştır. Bu çalışmada ampisilin sulbaktama 60 izolatın 9 'u dirençli bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda *S. aureus* izolatlarının çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıkları ve dirençlilik oranları farklılık göstermiş olup, tedavi öncesi antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması tedavide başarı oranını artıracaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Burdur ili ve çevre köylerinden toplanan süt örneklerinden izole edilen ve fenotipik testlerle *S. aureus* olarak tanımlanan izolatlar *nuc* geni ile doğrulandı. *S. aureus* izolatlarında metisiline direnç (*mecA* ve *mecC*) ile antiseptiklere direnç (*qacA/B* ve *smr*) genleri araştırıldı. Buna göre;

1. Bu çalışma ile mastitis problemi olan ve tedavide antimikrobiyal ajanlara direnç sebebiyle problem haline gelen sığır, koyun ve keçi işletmelerinde *S. aureus*'un sık rastlanan mastitis etkeni olduğu, KNS, streptokok, *T. pyogenes* ve *Corynebacterium* spp. gibi farklı bakterilerin de mastitis etiolojisinde yer alabileceği,
2. Konvansiyonel yöntemler ile *S. aureus* olarak tanımlanan izolatların yaklaşık %80'inin PZR ile *S. aureus* olarak doğrulanmış olması, fenotipik yöntemlerin %100 doğru identifikasyon sağlayamadığı ve PZR ile izolatların genotipik olarak doğrulanması gerektiği,
3. Türkiye'de metisilin ve antiseptik direnç genlerine sahip izolatlar tespit edilmiş olsa da Burdur ilinde bulunan çiftliklerde henüz bu direnç genlerine sahip *S. aureus*'ların yaygın olmadığı,
4. *S. aureus* izolatlarının büyük bir çoğunluğunun beta laktam grubu antibiyotiklere direnç gösterdiği belirlendi.

Bu çalışma ile işletme veya hayvan sahiplerinin antiseptik ve dezenfektanları kullanırken dezenfeksiyonu hangi sıklıkla yapacaklarını planlamaları, dilüsyon oranları ve kullanım süresi gibi faktörlere dikkat etmeleri gerektiği, bu durumun antiseptiklere direnç gelişimini azaltabileceği düşünülmektedir. Birçok antimikrobiyal ajana karşı *S. aureus*'ların direnç gelişimi gün geçtikçe artmaktadır. Teşhis odaklı tedavi yapmak ve kısa sürede tedaviye yanıt alabilmek adına antibiyotik duyarlılık testleri yapılarak doğru antibiyotik seçilmeli ve antibiyotiklere direnç düzeyi belirlenmelidir.

KAYNAKLAR

- Akin M, Özcan B, Cantekin Z, Ergün Y, Bulanık D (2020).** Investigation of antiseptic resistance genes in *Staphylococcus* spp. isolates. *NESciences*, **5(3)**, 136-143.
- Aksakal A, Önalın Ş, Okalın ŞŞ (2022).** Investigation of 16S rRNA, *mecA* and *nuc* genes in coagulase-positive and negative *Staphylococci* by Real-Time PCR. *Turkish J. Vet. Res.*, **6(1)**, 1-8.
- Alam MM, Ishino M, Kobayashi N (2003).** Analysis of Genomic Diversity and Evolution of the Low-Level Antiseptic Resistance Gene *smr* in *Staphylococcus aureus*. *Microb. Drug Resist.*, **9(1)**, 1-7.
- Alen S, Koneman E, Janda W, Schreckenberger P, Winn W, Woods G, Procop G (2006).** *The gram-positive cocci: Part I: Staphylococci and related organisms. In Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p: 539-576.
- Alp Ş, Çetinkaya Şardan Y (2008).** Vankomisine dirençli enterokokların epidemiyolojisi ve kontrolü. *Hacettepe Tıp Derg.*, **39(2)**, 89-95.
- Alves MFNF, Penna B, Pereira RFA, Geraldo RB, Folly E, Castro HC, Aguiar Alves F (2020).** First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harboring *mecC* gene in milk samples from cows with mastitis in southeastern Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, **51(4)**, 2175-2179. doi: 10.1007/s42770-020-00385-z
- Ammar AM, Attia AM, Abd El-Hamid MI, El-Shorbagy IM, Abd El-Kader SA (2016).** Genetic basis of resistance waves among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates recovered from milk and meat products in Egypt. *Cell. Mol. Biol.*, **62(10)**, 7-15.
- Ardic N, Sareyyupoglu B, Ozyurt M, Haznedaroglu T, Ilga U (2006).** Investigations of aminoglycoside modifying enzyme genes in methicillin-resistant *Staphylococci*. *Microbiol. Res.*, **161**, 49–54.
- Ariza-Miguel J, Hernandez M, Fernandez-Natal I, Rodriguez-Lazaro (2014).** Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Harboring *mecC* in Livestock in Spain. *J. Clin. Microbiol.*, **52(11)**, 4067-4069.
- Aslantaş Ö, Öztürk F, Ceylan A (2011).** Prevalence and molecular mechanism of macrolide and lincosamide resistance in *Staphylococci* isolated from subclinical bovine mastitis in Turkey. *J. Vet. Med. Sci.*, **73**, 1645–1648.
- Atlı O (2007).** *Klinik örneklerden izole edilen Staphylococcus aureus suşlarının antibiyotik duyarlılığının incelenmesi*. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara/Türkiye.

Aydın N, İzgür M, Diker KS, Yardımcı H, Esendal Ö, Paracıkoğlu J, Akan M (2006). *Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar)*. Ankara: İlke Emek Yayınları, s:5-13.

Aykan ŞB, Çağlar K, Engin ED, Sipahi AB, Sultan N, Çırak MY (2013). Hastane enfeksiyonu etkeni olan metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarında *qacA/B* dezenfektan direnç genlerinin varlığı ve dezenfektanlara in vitro duyarlılıklarının araştırılması. *Mikrobiyol Bul.*, **47(1)**, 1-10.

Bannerman TL (2003). *Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase positive cocci that grow aerobically*. In Manual of Clinical Microbiology, Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover MC, eds. 8th ed., Washington, DC: ASM Press., p: 384-404.

Basset P, Prod'homme G, Senn L, et al. (2013). Very low prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene in western Switzerland. *J Hosp. Infect.*, **83**, 257-259.

Berger-Bächi B, Rohrer S (2002). Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. *Arch. Microbiol.*, **178(3)**, 165-71. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-002-0436-0>

Bhagya JN, Tresamol PV, Vijayakumar K, Shyma VH, Mini M (2022). Molecular detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* associated with mastitis in goats. *J. Vet. Anim. Sci.*, **2**, 189-194.

Bilgehan H (2000). *Klinik mikrobiyoloji: özel bakteriyoloji ve bakteri enfeksiyonları*, 10. Baskı, İzmir: Şafak Matbaası, s:239-316.

Bilgehan H (2004). Gram Olumlu Koklar. Bilgehan H, Klinik Mikrobiyolojik Tanı, 4. Basım, İzmir, Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları, **31**, 507-509

Bischoff M, Bauer J, Preikschat P, Schwaiger K, Mölle G, Hölzel C (2012). First Detection of the Antiseptic Resistance Gene *qacA/B* in *Enterococcus faecalis*. *Microb. Drug Resist.*, **18(1)**, 7-12.

Bjorland J, Sunde M, Waage S (2001). Plasmid-Borne *smr* Gene Causes Resistance to Quaternary Ammonium Compounds in Bovine *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, **39(11)**, 3999-4004.

Boulton ML, Stoltman G, Stobierski MG, Downes FK (2002). *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin United States. *MMWR*, **51(26)**, 565-567.

Büyükcangaz E, Mat B, Khider Abd Alrahim Ahmed M (2013). Subklinik mastitisli sığır sütlerinin mikrobiyolojik analizi ve izolatların antimikrobiyal direnç profili. *Uludağ Univ. J. Fac. Vet. Med.*, **31(2)**, 35-44.

Cantekin Z, Ergun Y, Solmaz H, Tek E (2019). Detection of Slime Genes and Antiseptic/Antibiotic-Resistance Genes In Staphylococcal Isolates From Damascus Goats with Subclinical Mastitis. *Rev. Méd. Vét.*, **170**, 7-9, 174-178.

Ceylan AN, Sümbül B, Doymaz MZ (2022). Screening of *mecC* Gene in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates. *Bezmialem Science*, **10(2)**, 226-230.

Chambers HF (1997). Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev.*, **10(4)**, 781-91.

Cikman, A, Aydın M, Gulhan B, Karakeçili F, Kurtoglu MG, Yuksekkaya S, Parlak M, Gultepe BS, Cicek AC, Bilman FB, Ciftci IH, Kara M, Atmaca S, Ozekinci T (2019). Absence of the *mecC* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from various clinical samples: The first multi-centered study in Turkey. *J. Infect. Public Health*, **12(4)**, 528–533.

CLSI. 2013. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals VET01-S2. *Second information supplement*. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Çağlar K (2005). *Dezenfektanlara direnç gelişim mekanizmaları? Dezenfeksiyon işlemini ne kadar tehdit etmektedir?*. 4. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi. 20-24 Nisan Samsun/Türkiye, 702-714.

Da Silva AC, Rodrigues MX, Silva NCC (2020). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food and the prevalence in Brazil: a review. *Braz. J. Microbiol.*, **51**, 347–356. doi:10.1007/s42770-019-00168-1

Demirtürk N, Demirdal T (2004). Antibiyotiklerde direnç sorunu. *Kocatepe Tıp Dergisi.*, **5(2)**, 17-21.

Derbentli Ş (2005). Stafilokoklarda antibiyotik direnci: 2003-2004 Türkiye haritası. *Ankem Derg.*, **19(2)**, 54-60.

Deurenberg RH, Stobberingh EE (2008). The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol.*, **8(6)**, 747-763.

Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE (2007). The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Clin Microbiol Infect.*, **13(3)**, 222-35.

Devriese LA, Van Damme LR, Fameree L (1972). Methicillin (cloxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. *Zbl Vet. Med. B.*, **19**, 598-605.

Doğan B, Palaz M, İzgür M (2018). Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* ve önemi. *Etlik Vet. Mikrobiyol. Derg.*, **29 (2)**, 157-161.

Doğan E, Kılıç A, Türütoğlu H, Öztürk D, Türkyılmaz S (2016). Screening of *Staphylococcus aureus* isolates for *mecA* and *mecC* genes carriage. *Ankara Üniv. Vet Fak Derg.*, **63**, 389-391.

Ebner R, Johler S, Sihto HM, Stephan R, Zweifel C (2013). Microarray-Based Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolated Obtained from Chicken Carcasses.

J. Food Prot., **76**(8), 1471-1474.

Ebrahimi A, Lotfalian S, Karimi S (2007). Drug resistance in isolated bacteria from milk of sheep and goats with subclinical mastitis in Shahrekord district. *Iranian J. Vet. Res.*, **8**, 76-79.

Eraksoy (2011). Antibiyotik direnci ve direnç mekanizmaları. *Türkiye Klinikleri J. Inf. Dis-Special Topics.*, **4**(1), 1-14.

Ergun Y, Cantekin Z, Gurturk K, Solmaz H, Ekin IH, Ozturk D (2017). Distribution of antiseptic resistance genes in *Staphylococcus* spp. from bovine mastitis. *Vet. Med.*, **62**(04), 200–203.

Eriksson J, Espinosa-Gongora C, Stamphøj I, Larsen AR, Guardabassi L (2013). Carriage frequency, diversity and methicillin resistance of *Staphylococcus aureus* in Danish small ruminants. *Vet. Microbiol.*, **163**, 110–115.

Erturan B, Güven H (1989). Betalaktam antibiyotikler. *Ondokuz Mayıs Üni. Tıp Fak. Derg.*, **6**(1), 147-156.

Feyissa N, Alemu T, Jirata Birri D, Desalegn A, Sombo M, Abera S (2023). Isolation and determination of antibacterial sensitivity characteristics of *Staphylococcus aureus* from lactating cows in West Shewa Zone, Ethiopia. *Veterinary Medicine International*, **28**, 3142231. doi:10.1155/2023/3142231

Fraiese AP (2002). Susceptibility of antibiotic-resistant cocci to biocides. *J. Appl. Microbiol.*, **92**, 158-162.

García-Garrote F, Cercenado E, Mariñ M, Bal M, Trincado P, Corredoira J, Ballesteros C, Pita J, Alonso P, Vindel A (2014). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene: emergence in Spain and report of a fatal case of bacteraemia. *J. Antimicrob. Chemother.*, **69**, 45–50.

García-Garrote F, Cercenado E, Mariñ M, Bal M, Trincado P, Corredoira J, Ballesteros C, Pita J, Alonso P, Vindel A (2014). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene: emergence in Spain and report of a fatal case of bacteraemia. *J. Antimicrob. Chemother.*, **69**, 45-50.

Garcia-Alvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD (2011). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: A descriptive study. *Lancet Infect. Dis.*, **11**, 595-603.

Genç F (2015). Subklinik Mastitisli Sığırlardan *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* ve *Streptococcus dysgalactiae* Etkenlerinin İzolasyonu ve Antibiyotiklere Duyarlılıklarının Belirlenmesi. Uzmanlık Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın/Türkiye.

Gindonis V, Taponen S, Myllyniemi AL, Pyörälä S, Nykäsenoja S, Salmenlinna S, Lindholm L, Rantala M (2013). Occurrence and characterization of methicillin

resistant staphylococci from bovine mastitis milk samples in Finland. *Acta Vet. Scand.*, **55**(61).

Gomez P, Lozano C, Gonzalez-Barrio D, Zarazaga M, Ruiz-Fons F, Torres C (2015). High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carrying the *mecC* gene in a semi-extensive red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) farm in Southern Spain. *Vet. Microbiol.*, **177**(3-4), 326-331.

Gökdağ MO, Çiftci A (2021). Antibiotic resistance and virulence gene profiles in Staphylococci isolated from cattle with mastitis. *JAES*, **6**(3), 395-402. doi:10.35229/jaes.954156

Gökhan MSS, Gülaydın Ö (2020). Van yöresinde koyun klinik mastitis olgularından izole edilen bakteri türlerinin prevalansı ve antimikrobiyel duyarlılıklar. *Etlik Vet. Mikrobiyol. Derg.*, **31**(1), 39-46.

Grinius, LL, Dreguniene G, Goldberg EB, Liao CH, Projan SJ (1992). A Staphylococcal multidrug resistance gene product is a member of a new protein family. *Plasmid*, **27**, 119-129.

Gülmez D (2014). Antimikrobiyal direnci belirlemede fenotipik yöntemler veya klasik yöntemler. *Ankem Derg.*, **28**(2), 221-228.

Hamid S, Bhat MA, Mir IA, Taku A, Badroo GA, Nazki S, Malik A (2017). Phenotypic and genotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *Vet. World*, **10**(3), 363-367. doi:10.14202/vetworld.2017.363-367

Hassan KA, Skurray RA, Brown MH (2007). Active export proteins mediating drug resistance in staphylococci. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **12**(3-4), 180-196.

Hassanzadeh S, Anjloo S, Pourmand MR, Mashhadi R, Ghazvini K (2019). Epidemiology of Efflux Pumps genes mediating Resistance among 2 *Staphylococcus aureus*; A systematic review. *Microb. Pathog.*, 139.

Heir E, Sundheim G, Holck AL (1999). Identification and characterization of quaternary ammonium compound resistant staphylococci from the food industry. *Int. J. Food Microbiol.*, **48**, 211-219.

Hoque MN, Das ZC, Rahman ANMA, Haider MG, Islam MA (2018). Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains in bovine mastitis milk in Bangladesh. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, **6**(1), 53-60.

Ito T, Hiramatsu K, Tomasz A, de Lencastre H, Perreten V (2012). Guidelines for reporting novel *mecA* gene homologues. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **56**, 4997-4999.

İğnak S (2012). *İstanbul tıp fakültesi hastanesi kliniklerinden izole edilen Gram pozitif koklarda antiseptik direnç genlerinin araştırılması.* İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul/Türkiye.

Jaglic Z, Cervinkova D (2012). Genetic basis of resistance to quaternary ammonium compounds--the qac genes and their role: a review. *Vet. Med.*, **57(6)**, 275-281.

Jevons MP (1961). Celbenin resistant Staphylococci. *BMJ.*, **(1)**, 124-125.

Kartal ED (2007). *Bakteriler ve Dezenfektanlara Direnç*. 5. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi. 4-8 Nisan Antalya/Türkiye, 63-69.

Kaszanyitzky EJ, Janosi SZ, Egyed Z, Agost G, Semjen G (2003). Antibiotic resistance of staphylococci from humans, food and different animal species according to data of the Hungarian resistance monitoring system in 2001. *Acta. Vet. Hung.*, **51**, 451-464.

Kateete DP, Kimani CN, Katabazi FA, Okeng A, Okee MS, Nanteza A, Joloba ML, Najjuka FC (2010). Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, **9(23)**.

Kaya I (2011). *Koagülaz pozitif ve koagülaz negatif Stafilokok suşlarında makrolid linkozamid treptogramin B (MLSB) grubu antibiyotiklere direncin araştırılması*. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul/ Türkiye.

Khairullah AR, Sudjarwo SA, Efeendi MH, Ramandianto SC, Gelolodo MA, Widadoi A, Riwu KHP, Kurnawati DA, Rehman S (2022). Profile of Multidrug Resistance and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on dairy cows and risk factors from farmer. *Biodiversitas*, **23(6)**, 2853-2858.

Kılıç A, Doğan E, Kaya S, Baysallar M (2015). Yedi Yıllık Sürede Klinik Örneklerden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarında *mecC* ve Panton-Valentine Lökosidin Gen Varlığının Araştırılması. *Mikrobiyol. Bul.*, **49(4)**, 594-599.

Kırkan Ş, Göksoy EÖ, Kaya O (2005). Identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Coagulase Negative Staphylococci* from bovine mastitis in the Aydın region of Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, **29(3)**, 791-796.

Kırkan Ş, Parın U, Tanır T, Yuksel HT (2018). Identification of the *Staphylococcus* species which cause cattle mastitis using MALDI-TOF MS. *Approaches in Poultry, Crimson Publishers*, **4(2)**, 1-7.

Kim C, Milheiriço C, Gardete S, Holmes MA, Holden MTG, de Lencastre H, Tomasz A (2012). Properties of a Novel PBP2A Protein Homolog from *Staphylococcus aureus* Strain LGA251 and Its Contribution to the β -Lactam-resistant Phenotype. *J. Biol. Chem.*, **287(44)**, 36854-36863.

Kireççi E, Çolak A (2002). Kuru dönem başlangıcında subklinik mastitisli ineklerden izole edilen stafilokok suşlarında metisilin direnci. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, **8**, 98-100.

Kotb EEZ, Gafer JA (2020). Molecular Detection of Toxins and Disinfectant

Resistance Genes Among *Staphylococcus aureus* Isolated from Dairy Cattle in Egypt. *Journal of Applied Veterinary Sciences*, **5**(1): 35-45.

Kumar A, Schweizer HP (2005). Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **57**(10), 1486-1513.

Kuwahara-Arai K, Kondo N, Hori S, Tateda-suzuki E, Hiramatsu K (1996). Suppression of methicillin resistance in a *mecA* containing pre-methicillin-resistant *S. aureus* strain is caused by the *mecI* mediated repression of PBP2' production. *Antimicrob. Agents Chemother*, (**40**), 2680- 2685.

Laupland KB, Church DL, Mucenski M, Sutherland LR, Davies HD (2003). Populationbased study of the epidemiology of and the risk factors for invasive *Staphylococcus aureus* infections. *J. Infect. Dis.*, **187**, 1452-9.

Laurent F, Chardon H, Haenni M, Bes M, Reverdy ME, Madec JY, Lagier E, Vandenesch F, Tristan A (2012). MRSA harboring *mecA* variant gene *mecC*, France. *Emerg. Infect. Dis.*, **18**, 1465-1467.

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

Loncaric I, Ku" bber-Heiss A, Posautz A, Stalder GL, Hoffmann D, Rosengarten R, Walzer C (2013). Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. carrying the *mecC* gene, isolated from wildlife. *J. Antimicrob. Chemother*, **68**, 2222–2225.

Longtin J, Seah C, Siebert K, McGeer A, Simor A, Longtin Y, Low DE, Melano RG (2011). Distribution of antiseptic resistance genes *qacA*, *qacB*, and *smr* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Toronto, Canada, from 2005 to 2009. *Antimicrob. Agents Chemother*, **55**(6), 2999-3001.

Lyon BR, Skurray R (1987). Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: Genetic basis. *Microbiol. Rev.*, **51**(1), 88-134.

Maillard JY (2007). Bacterial resistance to biocides in the healthcare environment: should it be of genuine concern?. *J. Hosp. Infect.*, **65**(52), 60-72.

Mayer S, Boos M, Beyer A, Fluit C, Schmitz FJ (2001). Distribution of the antiseptic resistance genes *qacA*, *qacB* and *qacC* in 497 methicillin-resistant and susceptible European isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother*, **47**(6), 893-905.

McDonnell G, Russell AD (1999). Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, **12**, 147-79.

Medhus A, Sletteanea's JS, Marstein L, Larssen KW, Sunde M (2013). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with the novel *mecC* gene variant isolated from a cat suffering from chronic conjunctivitis. *J Antimicrob Chemother*, **68**, 968–975.

Mehmeti İ, Behluli B, Mestani M, Ademi A, Nes FI, Diep BD (2016). Antimicrobial resistance levels amongst staphylococci isolated from clinical cases of bovine mastitis in Kosovo. *J. Infect. Dev. Ctries.* **10(10)**, 1081-1087.

Miyazaki NH, Abrue AO, Marin VA, Rezende CA, Moraes MTB, Boas MHS (2007). The presence of *qacA/B* gene in Brazilian methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.*, **102(4)**, 539-540.

Monecke S, Ruppelt A, Wendlant S, Schwarz S, Slickers P, Ehricht R, Cortez de Jäckel S (2013). Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates from diseased poultry. *Vet. Microbiol.*, **162(2-4)**.

Nakipoğlu Y, İğnak S, Gürler N, Gürler B. (2012). Klinik *Staphylococcus aureus* suşlarında antiseptik direnç genlerinin (*qacA/B* ve *smr*) ve antibiyotik maddelere direnç prevalansının araştırılması. *Mikrobiyol. Bul.*, **46(2)**, 180-189.

Nalça AR ve Gülhan T (2021). Mastitisli Sığırlardan izole edilen *Staphylococcus aureus* izolatlarının virülens gen profillerinin belirlenmesi. *Harran Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **10(2)**, 144-152.

Neelam Jain VK, Singh M, Joshi VG, Chhabra R, Singh K (2022). Virulence and antimicrobial resistance gene profiles of *Staphylococcus aureus* associated with clinical mastitis in cattle. *PLoS ONE*, **17(5)**.

Noguchi N, Hase M, Kitta M, Sasatsu M, Deguchi K, Kono M (1999). Antiseptic susceptibility and distribution of antiseptic-resistance genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **172**, 247-253.

Noguchi N, Nakaminami H, Nishijima S, Kurokawa I, So H, Sasatsu M. (2006). Antimicrobial agent of susceptibilities and antiseptic resistance gene distribution among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patients with impetigo and staphylococcal scalded skin syndrome. *J. Clin. Microbiol.*, **44(6)**, 2119-2125.

Noguchi N, Suwa J, Narui K, Sasatsu M, Ito T, Hiramatsu K, Song JH (2005). Susceptibilities to antiseptic agents and distribution of antiseptic resistance genes *qacA/B* and *smr* methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Asia during 1998 and 1999. *J. Med. Microbiol.*, **54(6)**, 557-565.

Nuñez KVM, Gonçalves JL, Silva NCC, Santos MVD (2023). Virulence and antimicrobial resistance genes profiles of spa type t605 methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis. *J. Appl. Microbiol.*, **134(4)**.

Opacic D, Lepsanovic Z, Sbutega-Milosevic G (2010). Distribution of disinfectant resistance genes *qacA/B* in clinical isolates of methicillin-resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* in one Belgrade hospital. *J. Hosp. Infect.*, **76(3)**, 266-267.

Orrett FA, Land M (2006). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prevalence: current susceptibility patterns in Trinidad. *BMC Infect. Dis.*, **6**, 83-8.

Özel Y, Büyükgengin KB, Yavuz MT (2017). Klinik Örneklerden İzole Edilen Metisiline Dirençli ve Duyarlı *Staphylococcus aureus* suşlarının Antibiyotik Direnç Profilinin Araştırılması. *ANKEM Derg.*, **31(2)**, 41-47.

Öztürk D, Avki S, Türütoğlu H, Yiğitarıslan K, Sağnak S (2010). Methicillin resistance among coagulase-positive *Staphylococci* isolated from dogs with otitis externa, skin wounds and pyoderma. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, **16 (4)**, 651-656.

Öztürk D, Türütoğlu H, Pehlivanoğlu F, Yapıcıer ÖŞ (2019). Identification of bacteria isolated from dairy goats with subclinical mastitis and investigation of methicillin and vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* strains., *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **66**, 191-196.

Paterson GK, Morgan FJE, Harrison EM, Peacock SJ, Parkhill J, Zadoks RN, Holmes MA (2014). Prevalence and properties of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bovine bulk tank milk in Great Britain. *J. Antimicrob. Chemother.*, **69**, 598-602.

Paulsen IT, Brown MH, Littlejohn TG, Mitchell BA, Skurray RA (1996). Multidrug resistance proteins QacA and QacB from *Staphylococcus aureus*: membrane topology and identification of residues involved in substrate specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93(8)**, 3630-3635.

Peacock SJ, Paterson GK (2015). Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu. Rev. Biochem.*, **84**, 577–601.

Pearson JKL, Mackie DP (1979). Factors associated with the occurrence, cause and outcome of clinical mastitis in dairy cattle. *Vet. Rec.*, **105**, 456–463.

Pehlivanoğlu F, Yardımcı H (2012). Detection of Methicillin and Vancomycin Resistance in *Staphylococcus* Strains Isolated from Bovine Milk Samples with Mastitis. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, **18(5)**, 849-855.

Peksel H (2006). *Hastane Kökenli Koagülaz Negatif Stafilokok Suşlarında Oksasilin Direncinin Moleküler ve Geleneksel Yöntemlerle Araştırılması*. Uzmanlık Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir/Türkiye.

Poole K (2002). Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *J. Appl. Microbiol.*, **92**, 55-64.

Poole K (2005). Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.*, **56(1)**, 20-51.

Putman M, Veen HW, Konings N (2000). Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64(4)**, 672-693.

Qu Y, Zhao H, Nobrega DB, Cobo ER, Han B, Zhao Z, Li S, Li M, Barkema HW, Gao J (2019). Molecular epidemiology and distribution of antimicrobial resistance genes of *Staphylococcus* species isolated from Chinese dairy cows with clinical

mastitis. *J. Dairy Sci.*, **102**, 1–13.

Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR (2000). *Clinical Veterinary Microbiology*. Mosby, Harcourt publishers limited, p: 327-344.

Rahbarnia L, Khosravi Rad R, Dehnad AR, Naghili B (2023). The examination of some virulence factors in *S. aureus* isolates obtained from the healthy human population, sheep mastitis, and cheese. *Iran J. Vet. Res.*, **24(2)**, 110–115.

Rice LB, Sahm D, Bonomo RA (2003). *Mechanisms of resistance to antimicrobial agents*. 8th ed. Manual of Clinical Microbiology, ed. B.E. Murray PR, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH., Washington, DC, ASM Press., p: 1074-1101.

Roberson JR, Fox LK, Hancock DD, Gay JM, (1994). Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. *J. Dairy Sci.*, **77(11)**, 3354-3362.

Roshan M, Parmanan D, Arora D, Behera M, Vats A, Gautam D, Deb R, Parkunan T, De S (2022). Virulence and enterotoxin gene profile of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **80**.

Russell AD (1997). Plasmids and bacterial resistance to biocides. *J. Appl. Microbiol.*, **83(2)**, 155-165.

Russell AD (2004). Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon. *J. Hosp. Infect.*, **57(2)**, 97-104.

Ryffel C, Kayser FH, Berger-Bachi B (1992). Correlation between regulation of *mecA* transcription and expression of methicillin-resistance in *staphylococci*. *Antimicrob. Agents Chemother*, **36(1)**, 25-31.

Saidi R, Cantekin Z, Mimoune N, Ergun Y, Solmaz H, Khelef D, Kaidi R (2021). Investigation of the presence of slime production, *VanA* gene and antiseptic resistance genes in *Staphylococci* isolated from bovine mastitis in Algeria. *Veterinarska Stanica*, **52(1)**.

Sancak B (2011). *Staphylococcus aureus* ve antibiyotik direnci. *Mikrobiyol. Bul.*, **45(3)**, 565-576.

Sancak B (2012). MRSA direnç mekanizmaları: Dünyada ve Türkiye’de epidemiyolojisi. *Ankem Derg.*, **26(2)**, 38-47.

Santos RIDI, Zunilo PM, Gil AD, Laport A, Hirigoyen DJ (2017). Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical and clinical mastitis in Uruguay during an eight-year period. *Austral J. Vet. Sci.*, **49**, 191-194.

Sasatsu M, Shirai Y, Hase M, Noguchi N, Kono M, Behr H, Freney J, Arai T (1995). The origin of the antiseptic-resistance gene *abr* in *Staphylococcus aureus*. *Microbios.*, **84(340)**, 161-169.

Sayın Z, Sakmanoğlu A, Uçan US, Pınarkara Y, Uslu A, Aras Z, Erganiş O (2016). Türkiye’de mastitisli inek sütlerinde *mecC* geni taşıyan metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* varlığının belirlenmesi. *Eurasian J. Vet. Sci.*, **32(3)**, 182-187.

Schlett CD, Millar EV, Crawford KB, Cui T, Lanier JB, Tribble DR, Ellis MW (2014). Prevalence of chlorhexidine-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* following prolonged exposure. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **58(8)**, 4404-4410.

Sevinti DA, Şahin M (2009). Determination of beta-lactic activity and susceptibility of against some antibiotics staphylococci strains isolated from bovine mastitis. *Veteriner Bilimleri Dergisi*, **25(1-2)**, 23-28.

Shah, MS, Qureshi S, Kashoo Z, Farooq S, Wani SA, Hussain MI, Dar BA (2019). Methicillin resistance genes and in vitro biofilm formation among *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in India. *Comp. Immunol. Infect. Dis.*, **64**, 117–124.

Sharma I, Brinty A (2014). Isolation and Identification of *Staphylococcus aureus* from Bovine Mastitis Milk and Their Drug Resistance Patterns in Silchar Town Dairy Farms, N.E India. *OIJR*, **4**.

Sheet OH (2022). Molecular detection of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from dairy mastitis in Nineveh governorate, Iraq. *IJVS*, **36(4)**, 939-943. doi:10.33899/ijvs.2022.132643.2115

Shopsin B, Kreiswirth BN (2001). Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg. Infect. Dis.*, **7(2)**, 323-326.

Silva ER, Siqueira AP, Martins JCD, Ferreira WPB, Silva Nivaldo (2004) Identification and in vitro Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus* species Isolated from Goat Mastitis in the Northeast of Brazil. *Small Ruminant Research*, **55**, 45-49.

Smith K, Gemmell CG, Hunter IS (2008). The association between biocide tolerance and the presence or absence of *qac* genes among hospital-acquired and community-acquired MRSA isolates. *J. Antimicrob. Chemother*, **61**, 78-84.

Stastkova Z, Karpiskova S, Karpiskova R (2009) Findings of Methicillin-Resistant Strains of *Staphylococcus aureus* in Livestock, *Czech J. Food Sci.*, **27**, 36-41.

Stefani S, Goglio A (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: related infections and antibiotic resistance. *Int. J. Infect. Dis.*, **14(4)**, 19-22.

Şeker E, Özenç E, Baki Acar D, Yilmaz M (2019). Prevalence of Methicillin Resistance and Panton-Valentine Leukocidin Genes in Staphylococci Isolated from Pirlak Sheep with Subclinical Mastitis in Turkey. *Kocatepe Vet. J.*, **12(4)**, 424-429.

Taban BM, Hassankhani A, Aytac SA (2021). Investigation of *mecA*- and *mecC*-positive *Staphylococcus aureus* from raw milk and traditional artisanal dairy foods.

International Journal Of Food Properties, **24(1)**, 954–964.

Tassew A, Negash M, Demeke A, Feleke A, Tesfaye B, Sisay T (2015). Isolation, identification and drug resistance patterns of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from mastitic cow's milk from selected dairy farms in and around Kombolcha, Ethiopia. *JVMAH*, **8(1)**, 1-10.

Tennent JM, Lyon BR, Midgley M, Jones IG, Purewal AS, Skurray RA (1989). Physical and biochemical characterization of the *qacA* gene encoding antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.*, **135(1)**, 1-10.

Tsiodras S, Gold HS, Sakoulas G (2001). Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet.*, **358(9277)**, 207-208.

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

Turchi B, Bertelloni F, Marzoli F, Gerri D, Tola S, Azara E, Longheu CM, Tassi R, Schiavo M, Cilia G, Fratini, F (2020). Coagulase negative staphylococci from ovine milk: Genotyping and phenotypic characterization of susceptibility to antibiotics, disinfectants and biofilm production. *Small Ruminant Research*, **183**, 1-7.

Turlej A, Hryniewicz W, Empel J (2011). Staphylococcal cassette chromosome mec (Sccmec) classification and typing methods: an overview, *Pol. J. Microbiol.*, **60(2)**, 95-103.

Turutoglu H, Hasoksuz M, Ozturk D, Yildirim M, Sagnak S (2009). Methicillin and aminoglycoside resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis and sequence analysis of their *mecA* genes. *Vet. Res. Commun.*, **33**, 945–956.

Türkyılmaz S, Tekbıyık S, Oryasin E, Bozdoğan B (2010). Molecular Epidemiology and Antimicrobial Resistance Mechanisms of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Milk. *Zoonoses Public Health*, **57**, 197–203.

Unal S, Hoskins J, Flokowitsch JE, Ernie Wu CY, Preston DA, Skatrudi PL (1992). Detection of Methicillin-Resistant Staphylococci by Using the Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.*, **30(7)**, 1685-1691.

Unnerstad HE, Bengtsson B, Rantzien MH, Börjesson S (2013). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing *mecC* in Swedish dairy cows. *Acta Vet. Scand.*, **55(6)**.

Ünal N (2012). Mastitisli hayvanlardan izole edilen stafilocokların antibiyotik direnci ve hayvanlarda metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*. *Erciyes Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **9(3)**, 221-231.

Ünal S (1996). Stafiloc metisilin direnç mekanizmaları ve metisilin direnç tespit yöntemleri. *Flora*, **1**, 14-17.

Vali L, Davies SE, Lai LLG, Dave J, Amyes SGB (2008). Frequency of biocide resistance genes, antibiotic resistance and the effect of clorhexidine exposure on clinical methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.*, **61(3)**, 524-532.

Vural T, Şekercioğlu AO, Ögünç D (1999). Vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* suşu. *Ankem Derg.*, **13(1)**, 1-4.

Wang C, Cai P, Zhan Q, Mi Z, Huang Z, Chen G (2008). Distribution of antiseptic-resistance genes *qacA/B* in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in China. *J. Hosp. Infect.*, **69(4)**, 393-394.

Wang D, Wang Z, Yan Z, Wu J, Ali T, Li J, Lv Y, Han B (2015). Bovine mastitis *Staphylococcus aureus*: antibiotic susceptibility profile, resistance genes and molecular typing of methicillin-resistant and methicillin-sensitive strains in China. Infection, genetics and evolution. *Infect. Genet. Evol.*, **31**, 9–16.

Wang W, Lin X, Jiang T, Peng Z, Xu J, Yi L, Li F, Fanning S, Baloch Z (2018). Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus* Cultured From Raw Milk Taken From Dairy Cows With Mastitis in Beijing, China. *Front. Microbiol.*, **9**, 1123.

Watts JL, Salmon SA (1997). Activity of selected antimicrobial agents against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections that produce B-lactamase. *J. Dairy Sci.*, **80**, 788–791.

Weber DJ, Rutala WA (2006). Use of germicides in the home and the healthcare settings: is there a relationship between germicide use and antibiotic resistance?. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, **27(10)**, 1107-1119.

Wielders C, Fluit A, Brisse S, Verhoef J, Schmitz FJ (2002). *mecA* gene is widely disseminated in *Staphylococcus aureus* population. *J Clin Microbiol.*, **40**, 3970-75.

Willke A (1992). Stafilokoklarda metisiline direnç mekanizmaları ve belirlenmesi. *Ankem Derg.*, **6(2)**, 288-291.

Wirtu A, Abunna F, Duguma A (2018). Isolation and Identification of *Staphylococcus aureus* from Dairy Farms in Bishoftu Town, Ethiopia. *Juniper Online Journal of Public Health*, **3(1)**.

Wong TZ, Zhang M, O'Donoghue M, Boost M (2013). Presence of antiseptic resistance genes in porcine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Vet. Microbiol.*, **162**, 977–979.

Yüce A (2001). Antimikrobik ilaçlara direnç kazanma mekanizmaları. *Klinik Dergisi*, **2(14)**, 41-46.

Zhang Z, Chen Y, Li X, Wang X, Li H (2022). Detection of antibiotic resistance, virulence gene, and drug resistance gene of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Microbiol. Spectr.*, **10(4)**.

Zschöck M, Risse K, Sommerhäuser J. (2004). Occurrence and clonal relatedness

of sec/tst-gene positive *Staphylococcus aureus* isolates. *Lett. Appl. Microbiol.*, **38(6)**, 493-498.



