



TULUM PEYNİRİNDE STAPHYLOCOCCUS AUREUS YAYGINLIĞI VE ANTİBİYOTİK DİRENÇ PROFİLLERİNİN VE DİRENÇ GENLERİNİN BELİRLENMESİ

Süheyla DEMİRSEKAN, Yasin TUNCER*

Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Isparta, Türkiye

Anahtar Kelimeler

Tulum Peyniri,
Staphylococcus aureus,
Antibiyotik Direnç,
Antibiyotik Direnç Geni,
Polimeraz Zincir Reaksiyonu.

Öz

Bu çalışmada, Isparta ilinde satışı yapılan Tulum peyniri örneklerinde *Staphylococcus aureus* yaygınlığının tespiti ve *S. aureus* izolatlarında antibiyotik direnç profillerinin ve direnç genlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. 75 Tulum peyniri örneğinden toplam 141 muhtemel *S. aureus* kolonisi izole edilmiştir. Gram boyama ve katalaz testi sonucu izolatların 100'ünün Gram pozitif kok morfolojisinde ve katalaz pozitif özellik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu izolatların *S. aureus* türü üyesi olup olmadığı *S. aureus*'da termostabil nükleaz genine (*nuc*) özgü primer çiftleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile araştırılmıştır. PZR denemeleri sonucu 15 izolatta *nuc* genine özgü 458 bp büyüklüğünde ampliconlar elde edilmiştir. Tulum peyniri örneklerinde *S. aureus* bulunma sıklığı % 13.33 (10/75) olarak hesaplanmıştır. 15 *S. aureus* izolatının disk difüzyon testi sonucu en dirençli olduğu antibiyotiğin penisilin G olduğu tespit edilmiştir. İzolatlarda en sık rastlanan antibiyotik direnç geninin *blaZ* olduğu belirlenmiştir. *blaZ* geni dışında izolatlarda *mecA*, *msrA* ve *msrB* geni varlığı tespit edilmiştir. Düşük oranda da olsa tulum peyniri örneklerinde *S. aureus* varlığına rastlanması tüketici sağlığı açısından endişe uyandırıcıdır.

DETERMINATION OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS PREVALENCE AND ANTIBIOTIC RESISTANCE PROFILES AND RESISTANCE GENES IN TULUM CHEESE

Keywords

Tulum Cheese,
Staphylococcus aureus,
Antibiotic Resistance,
Antibiotic Resistance Gene,
Polymerase Chain Reaction.

Abstract

In this study, it was aimed to determine the prevalence of *Staphylococcus aureus* in tulum cheese samples sold in Isparta province and to determine the antibiotic resistance profiles and resistance genes in *S. aureus* isolates. A total of 141 presumptive *S. aureus* colonies were isolated from 75 Tulum cheese samples. As a result of Gram staining and catalase test, it was determined that 100 of the isolates had Gram positive cocci morphology and catalase positive feature. Whether these isolates are members of the *S. aureus* species was investigated by polymerase chain reaction (PCR) using primer pairs specific to the thermostable nuclease gene (*nuc*) in *S. aureus*. As a result of PCR experiments, *nuc* gene-specific 458 bp amplicons were obtained in 15 isolates. The frequency of *S. aureus* in Tulum cheese samples was calculated as 13.33% (10/75). As a result of disk diffusion test of 15 *S. aureus* isolates, penicillin G was found to be the most resistant antibiotic. It has been determined that the most common antibiotic resistance gene in isolates is *blaZ*. Apart from the *blaZ* gene, the presence of *mecA*, *msrA* and *msrB* genes was determined in isolates. The presence of *S. aureus* in tulum cheese samples, albeit at a low rate, is a concern for consumer health.

Alıntı / Cite

Demirsikan, S., Tuncer, Y., (2021). Tulum Peynirinde *Staphylococcus aureus* Yaygınlığı ve Antibiyotik Direnç Profilleri ve Direnç Genlerinin Belirlenmesi, Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi, 9(3), 822-832.

* İlgili yazar / Corresponding author: yasintuncer@sdu.edu.tr, +90-246-211-1713

Yazar Kimliği / Author ID (ORCID Number)	Makale Süreci / Article Process	
S. Demirsikan, 0000-0002-4752-1570	Başvuru Tarihi / Submission Date	16.04.2021
Y. Tuncer, 0000-0002-2075-5027	Revizyon Tarihi / Revision Date	01.06.2021
	Kabul Tarihi / Accepted Date	03.06.2021
	Yayın Tarihi / Published Date	21.09.2021

1. Giriş (Introduction)

Süt ürünleri insan yaşamının temel besin maddelerinden birisidir ve zengin besin değerine sahip olması nedeniyle önemli bir gıda maddesidir (Black vd., 2002). Sütün yanı sıra fermente bir süt ürünü olan peynir de zengin bir mineral, protein, vitamin, yağ ve karbonhidrat kaynağıdır (Sulieyman vd., 2012). Ülkemizde 130'dan fazla peynir çeşidi üretilmektedir. Bu peynir çeşitleri içerisinde en çok tercih edilen peynirler Beyaz peynir, Kaşar peyniri ve Tulum peyniridir (Tekinşen ve Uçar, 2007). Tulum peyniri geleneksel olarak koyun sütünden üretilmektedir ancak bazen koyun sütüne inek ve keçi sütü karıştırılabilmektedir. Süt sağım sonrası herhangi bir ısıl işlem/pastörizasyon yapılmadan ve starter kültür ilavesi olmaksızın peynire işlenmektedir (Tomar vd., 2018).

Staphylococcus ilk olarak 1880 yılında İskoç cerrah Sir Alexander Ogston tarafından tanımlanmıştır (Licitra, 2013). 1884 yılında ise stafilokokların saf kültürünü elde eden Anton Rosenbach sarı-portakal rengi kolonileri *S. aureus* olarak isimlendirmiştir. Stafilokoklar hareketsiz, fakültatif anaerob, Gram pozitif, katalaz pozitif ve kok morfolojisine sahip bakterilerdir. Mikroskop altında incelendiğinde çiftler, kısa zincirler veya üzüm benzeri kümeler halinde görülürler (Hennekinne vd., 2012). *S. aureus*, gıda kaynaklı hastalıkların dünyadaki üçüncü en önemli nedeni olarak kabul edilir ve ineklerde mastitisin başlıca etmenidir. Bu nedenle süt ve süt ürünleri tüketiciler için risk oluşturabilmektedir (Janštová vd., 2014). Enterotoksijenik *S. aureus* suşları, süt ürünleri aracılığı ile insanlarda gıda kaynaklı intoksikasyonlara neden olabileceği potansiyeline sahiptir (Kümmel vd., 2016). Bunun yanı sıra *S. aureus* antibiyotiklere direnç gösteren mikroorganizmalar arasında halk sağlığını tehdit eden önemli bir bakteridir (Pal vd., 2020). *S. aureus*, hem toplum hem de hastane ortamında hastalığa neden olabilmektedir. *S. aureus* bakteremi ve infektif endokarditin yanı sıra osteoartiküler, deri ve yumuşak doku, plöropulmoner ve cihaz enfeksiyonlarının önde gelen nedenidir (Tong vd., 2015).

Antibiyotikler, mikroorganizmaların gelişmesini engelleme veya öldürme kapasitesine sahip antimikrobiyal maddelerdir. Antibiyotikler, insanlarda ve hayvanlarda bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde ve tıbbi olmayan uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Antibiyotiklerin aşırı kullanımı dolayısıyla bakteri suşlarında ilaç direncinin gelişmesine yol açmıştır. Bu durum küresel bir sorun ve insan sağlığını tehdit eden önemli bir problem haline almaktadır (Serwecińska, 2020). Antibiyotikler hücre duvarı sentezi, translasyon, transkripsiyon ve DNA sentezi dahil olmak üzere başlıca bakteri gelişim süreçlerini etkilemektedirler. Bakterilerde antibiyotik direnç, değiştirilmiş ilaç hedefleri, enzimatik ilaç inaktivasyonu, antimikrobiyal bileşiklerin artan hücre dışına akışı ve değiştirilmiş ilaç erişilebilirliği gibi birkaç farklı mekanizma tarafından ortaya çıkmakta ve direncin yayılmasına çok sayıda hareketli genetik eleman yardımcı olmaktadır (Vestergaard vd., 2019). Antibiyotiklere direnç gösteren mikroorganizmalar arasında *S. aureus*, önemli bir halk sağlığı sorunudur. Bazı antibiyotiklere doğal direnç gösteren *Enterococcus* türleri gibi diğer mikroorganizmaların aksine, *S. aureus* kazanılmış antimikrobiyal direnç geliştirme potansiyeli yüksek bir mikroorganizma olarak tanımlanmaktadır (Pal vd., 2020). *S. aureus* genomunun %15'inden fazlası, stafilokok kaset kromozomları (*staphylococcus cassette chromosomes*), bakteriyofaj genomu, integronlar, konjugatif plazmidler, transpozonlar ve patojenite adası gibi mobil genetik elemanlardan oluşmaktadır. Bütün bu mobil genetik elemanlar antibiyotik direnç geni taşıyabilmektedir (Bitrus vd., 2018). 1940'ların başlarında *S. aureus* kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde penisilinin kullanılmasından kısa bir süre sonra penisiline dirençli *S. aureus* suşları ortaya çıkmıştır. Bu suşlar β -laktam halkasını hidroliz eden ve antibiyotiğin etkisini yok eden *blaZ* geni tarafından determine edilen β -laktamaz sentezlemektedirler (Foster, 2017). İlk yarı sentetik anti-stafilokokal penisilinler 1960'larda geliştirilmiş ve metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) klinik kullanımlarından 1 yıl sonra gözlenmiştir. Metisilin direncine *mecA* geni aracılık etmektedir. Stafilokokal kaset kromozomu *mec* olarak adlandırılan bir mobil genetik elemanın yatay transferi ile kazanılmaktadır (Turner vd., 2019). MRSA, β -laktam antibiyotiklere direncin yanı sıra sıklıkla makrolidler, tetrasiklin, aminoglikozidler, kloramfenikol ve florokinolonlar gibi diğer antimikrobiyal ajanlara da dirençlidir (Kot vd., 2020).

Bu çalışmada, Isparta ilinde perakende satışı yapılan Tulum peyniri örneklerinde *S. aureus* yaygınlığı belirlenmiş ve izolatların antibiyotik direnç profilleri ve direnç genleri varlığı araştırılmıştır.

2. Materyal ve Yöntem (Material and Method)

2.1. Tulum Peyniri Örnekleri (Tulum Cheese Samples)

Çalışma kapsamında biyomateryal olarak kullanılan muhtemel *S. aureus* suşlarının izolasyonu için kullanılan 75 adet Tulum peyniri örneği Kasım 2018 ve Nisan 2019 arasında altı aylık süre boyunca Isparta ilinde bulunan geleneksel ürün satan pazar, mandıra ve marketlerden temin edilmiştir. Peynir örneklerinin 41'i farklı semtlerde kurulan pazarlardan, 25'i mandıralardan ve 9'u ise marketlerde açıkta satılan peynirlerden oluşmaktadır. Örnekler temin edildiği gün buz kutusu içerisinde laboratuvara ulaştırılmış ve analiz edilinceye kadar +4 °C'de en fazla 3 gün muhafaza edilmiştir.

2.2. Muhtemel *S. aureus* Suşlarının İzolasyonu (Isolation of Presumptive *S. aureus* Strains)

S. aureus izolasyonu için her bir peynir örneğinden aseptik koşullar altında 10 g numune alınmış ve 90 mL fizyolojik tuzlu su çözeltisi (FTS, % 0.85 NaCl, w/v) içerisinde karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Örneklerin 10⁻³ seviyesine kadar seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan dilüsyonlardan mannitol salt agar (MSA, LAB M, Lancashire, İngiltere) ve Baird Parker agar (BPA, LAB M) besiyeri ortamlarına yayma ekim yapılmıştır. Petri kutuları 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda BPA besiyerinde siyah merkezli ve etrafında çökelti halkası görülen, MSA besiyerinde ise sarı renkli koloniler muhtemel *S. aureus* izolatı olarak düşünülmüş ve çalışma materyali olarak seçilmiştir. Seçilen 143 koloni öze yardımıyla alınarak Brain Heart Infusion broth (BHI, LAB M) besiyerine inoküle edilmiş ve 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İzolatların saflık kontrolü BPA besiyerinde yapılmıştır. İzolatların stok kültürleri BHI broth besiyeri ortamında % 20 (v/v) steril gliserol (Riedel-de Haën, Seelze, Almanya) ilave edilerek -20 °C'de saklanmıştır.

2.3. Muhtemel *S. aureus* İzolatlarının Tanısı (Identification of Presumptive *S. aureus* Isolates)

2.3.1. Gram Boyama ve Katalaz Testi (Gram Staining and Catalase Test)

Muhtemel *S. aureus* izolatların mikroskopik morfolojileri Gram boyama yöntemiyle hazırlanan preparatların 1000 X büyütme ile ışık mikroskopunda (Soif, Türkiye) incelenmesi sonucunda tespit edilmiştir. İzolatların katalaz aktivitesi % 3'lük (v/v) hidrojen peroksit (Merck, Darmstadt, Almanya) çözeltisi kullanılarak test edilmiştir (Temiz, 1994). Katalaz testinde *S. aureus* ATCC 25923 pozitif ve *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

2.3.2. Genomik DNA İzolasyonu (Isolation of Genomic DNA)

Muhtemel *S. aureus* suşlarından genomik DNA Cancilla vd. (1992) tarafından önerilen yöntemde küçük modifikasyonlar yapılarak izole edilmiştir. Genomik DNA izolasyonu için 0.5 mL kültür steril Eppendorf tüplerine aktarılmış ve 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj (Sigma 2-16P, Rotor No: 12148, Almanya) edilmiştir. Üst fazlar dökülmüş ve hücre çökeltileri 0.5 mL liziz buffer ile çözülmüştür. Hücre süspansiyonları su banyosunda (Nüve NB 9, Türkiye) 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Tüplere 30 µL sodyum dodesil sülfat (SDS, Serva, Heidelberg, Almanya, %10 w/v) ilave edilmiş ve tüpler 80 °C'ye ayarlı su banyosunda (Nüve NB 5) 5 dakika daha inkübe edilmişlerdir. Süre sonunda lize olan hücre süspansiyonları üzerine 0.7 mL fenol-kloroform (1:10, v/v) ilave edilerek 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Üst faz mikropipet yardımıyla alınmış ve yeni steril Eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Alınan üst faz üzerine -20 °C'de bekletilen 0.7 mL 2-propanol (Merck) ilave edilmiştir. Tüpler 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve oluşan çökelti 50 µL Tris EDTA tamponu (pH 8.0) içerisinde çözülmüştür. Genomik DNA örnekleri kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Genomik DNA örneklerinin varlığı agaroz jel elektroforez yöntemi ile % 0.7 (w/v) oranında agaroz (AppliChem GmbH., Darmstadt, Almanya) içeren jellerde kontrol edilmiştir. Elektroforez işlemi 85 voltta 1.5-2 saat süre ile gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işleminin ardından jeller 0.2 µg/mL etidyum bromit (Amresco, Solon, Ohio, ABD) içeren boyama çözeltisi içerisine aktararak 30 dk süre ile boyanmıştır. Jel fotoğrafları 312 nm dalga boyunda UV ışık (Vilber Lourmat, ECX-F20.M, Fransa) altında Nikon D5100 (Nikon Corp., Japonya) dijital fotoğraf makinesi kullanılarak çekilmiştir.

2.3.3. İzolatlarda *nuc* Geninin Tespiti (Detection of *nuc* Gene in Isolates)

Muhtemel *S. aureus* izolatlarının tanısı *S. aureus*'da termostabil nükleaz genine özgü 458 bp büyüklüğünde fragment veren NUC1 (5'-ATGAAGTCAAATAAATCGCT-3') ve NUC2 (5'-TTTGGTGAAAAATACTTCTC-3') primerleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile gerçekleştirilmiştir (Gandra vd., 2011). PZR işleminde TurboCycler 2 gradient termal döngü cihazı (Blue-Ray Biotech Ltd., Tayvan) kullanılmıştır. PZR işleminde 1 döngü

94 °C'de 2 dakika başlangıç denatürasyonu, 40 döngü 94 °C'de 2 dakika, 55 °C'de 2 dakika ve 72 °C'de 3 dakika çoğalma ve 1 döngü 94 °C'de 10 dakika son uzama aşamalarından oluşan protokol kullanılmıştır. Çoğaltılan PZR fragmentlerinin agaroz jel elektroforezi %1 (w/v) agaroz içeren jellerde 85 voltta 1.5-2 saat süre ile yapılmıştır. Fragment büyüklüklerinin hesaplanmasında GENESTA™ 100-bp DNA marker (GA-010, GeneAll Biotechnology Co. Ltd., Kore) moleküler belirteç olarak kullanılmıştır. Jeller etidyum bromit (Amresco) içeren çözelti içerisinde 30 dk boyanmış ve UV ışık (Vilber Lourmat) altında görüntülenmiştir.

2.4. Koagülaz Testi (Coagulase Test)

S. aureus suşlarının koagülaz aktivitesi Oxoid Staphylase (DR0595A) test kiti (Oxoid Ltd., Basingstoke, İngiltere) kullanılarak üretici firma tarafından önerilen yönteme göre test edilmiştir. Koagülaz testinde Süleyman Demirel Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonundan temin edilen *S. aureus* ATCC 25923 suşu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

2.5. Antibiyotik Direnç (Antibiotic Resistance)

S. aureus suşlarının antibiyotik direnç profilleri Oxoid Ltd. Şti. (İngiltere)'den temin edilen penisilin G (10 U), sefoksitin (30 µg), tetrasiklin (30 µg), doksisisiklin (30 µg), minosiklin (30 µg), eritromisin (15 µg), amikasin (30 µg), gentamisin (10 µg), kanamisin (30 µg), siprofloksasin (5 µg), kloramfenikol (30 µg), trimetoprim/sulfametoksazol (1.25/23.75 µg), linezolid (30 µg), rifampin (5 µg), kinupristin-dalfopristin (15 µg) ve teikoplanin (30 µg) antibiyotik diskleri kullanılarak disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir (Cariolato vd., 2008; Yogurtcu ve Tuncer, 2013). Sonuçlar Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü'nün (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 2016 yılı kılavuzuna göre değerlendirilmiştir.

2.6. Antibiyotik Direnç Genlerinin Belirlenmesi (Detection of Antibiotic Resistance Genes)

S. aureus suşlarında metisilin (*mecA*), penisilin (*blaZ*), gentamisin (*aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic*, *aph(2'')-Id*), streptomisin (*aph(3')-IIIa*, *ant(4')-Ia*, *ant(6')-Ia*), eritromisin (*ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA*, *msrB*), tetrasiklin (*tetK*, *tetM*, *tetL*) ve vankomisin (*vanA*, *vanB*) direnç genlerinin varlığı Tablo 1'de verilen primer çiftleri kullanılarak PZR ile araştırılmıştır (Dutka-Malen vd., 1995; Lina vd., 1999; Martineau vd., 2000; Vakulenko vd., 2003; Depardieu vd., 2004; Zhang vd., 2004; Ouoba vd., 2008; Niu vd., 2016).

Tablo 1. Antibiyotik Direnç Genlerinin Tespitinde Kullanılan Primerler ve Ürün Büyüklükleri (Primers for Detection of Antibiotic Resistance Genes and Product Sizes)

GEN	PRİMER DİZİSİ (5'-3')	ÜRÜN BÜYÜKLÜĞÜ (bp)	KAYNAKLAR
<i>mecA</i>	GTAGAAATGACTGAACGTCGGATAA CCAATTCCACATTTGTTCCGGTCTAA	310	Zhang vd., 2004
<i>blaZ</i>	ACTTCAACACCTGCTGCTTTC TGACCACTTTTATCAGCAACC	173	Martineau vd., 2000
<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	CAGGAATTTATCGAAAATGTTAGAAAAG CACAATCGACTAAAGAGTACCAATC	369	Vakulenko vd., 2003
<i>aph(2'')-Ib</i>	CTTGGACGCTGAGATATATGAGCAC GTTTGTAGCAATTCAGAAAACCCCTT	867	Vakulenko vd., 2003
<i>aph(2'')-Ic</i>	CCACAATGATAATGACTCAGTTCCC CCACAGCTTCCGATAGCAAGAG	444	Vakulenko vd., 2003
<i>aph(2'')-Id</i>	GTGGTTTTTACAGGAATGCCATC CCCTTTCATACCAATCCATATAACC	641	Vakulenko vd., 2003
<i>aph(3')-IIIa</i>	GGCTAAAATGAGAATATCACCGG CTTTAAAAAATCATACAGCTCGCG	523	Vakulenko vd., 2003
<i>ant(4')-Ia</i>	CAAAGTCTAAATCGGTAGAAGCC GGAAAGTTGACCAGACATTACGAAC	294	Vakulenko vd., 2003
<i>ant(6')-Ia</i>	ACTGGCTTAATCAATTTGGG GCCTTTCGCCACCTCACCC	577	Niu vd., 2016
<i>ermA</i>	AAGCGGTAACCCCTCTGA TTGCAAAATCCCTTCTCAAC	190	Martineau vd., 2000
<i>ermB</i>	CTATCTGATGTTGAAGAAGGATT GTTTACTCTTGGTTAGGATGAAA	142	Martineau vd., 2000
<i>ermC</i>	AATCGTCAATTCCTGCATGT TAATCGTGAATACGGGTTTG	299	Martineau vd., 2000
<i>msrA</i>	TCCAATCATGACAAAAATC AATCCCTCTATTGGTGGT	163	Martineau vd., 2000
<i>msrB</i>	TATGATATCCATAATAATTATCCAATC AAGTTATATCATGAATAGATTGTCCTGTT	595	Lina vd., 1999
<i>tetK</i>	TTAGGTGAAGGTTAGGTCC GCAAACCTATTCCAGAAGCA	718	Ouoba vd., 2008
<i>tetM</i>	GTAAATAGTGTCTTGGAG CTAAGATATGGCTCAACAA	657	Ouoba vd., 2008

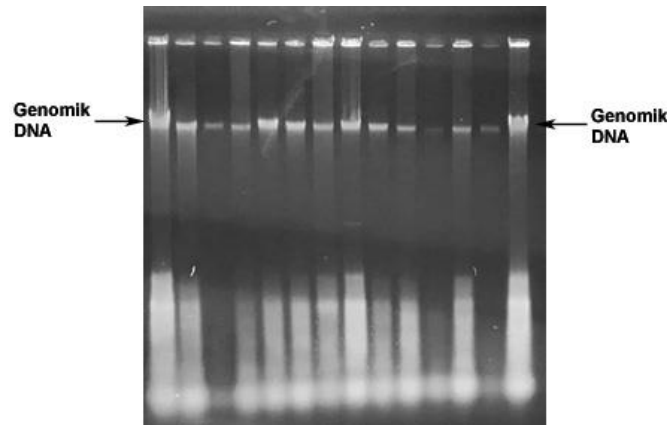
Tablo 1. Devamı (Continued)

<i>tetL</i>	GTTGCGCGCTATATTCCAAA TTAAGCAAACCTCATTCCAGC	788	Ouoba vd., 2008
<i>vanA</i>	GGGAAAACGACAATTGC GTACAATGCGGCCGTTA	732	Dutka-Malen vd., 1995
<i>vanB</i>	ACGGAATGGGAAGCCGA TGCACCCGATTTCGTTT	647	Depardieu vd., 2004

PZR denemelerinde *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(3')-IIIa*, *ant(4')-Ia*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic* ve *aph(2'')-Id* genleri için 1 döngü 94 °C'de 3 dakika, 40 döngü 94 °C'de 40 saniye, 55 °C'de 40 saniye ve 72 °C'de 40 saniye ve 1 döngü 72 °C'de 2 dakika; *ant(6')-Ia* geni için 1 döngü 94 °C'de 3 dakika, 40 döngü 94 °C'de 30 saniye, 56 °C'de 30 saniye ve 72 °C'de 1 dakika ve 1 döngü 72 °C'de 5 dakika; *tetL*, *tetK*, *tetM*, *vanA*, *vanB*, *ermA*, *ermB*, *ermC* genleri için 1 döngü 94 °C'de 2 dakika, 30 döngü 94 °C'de 60 saniye, uygun sıcaklıkta 60 saniye (*tetL*, *vanA* ve *vanB* genleri için 54 °C, *ermA* ve *tetK* genleri için 55 °C, *tetM* geni için 45 °C; *ermB* geni için 52 °C, *ermC* geni için 48 °C) ve 72 °C'de 1 dakika ve 1 döngü 72 °C'de 10 dakika; *blaZ* geni için 1 döngü 94 °C'de 4 dakika, 40 döngü 94 °C'de 30 saniye, 55 °C'de 30 saniye ve 72 °C'de 1 dakika ve 1 döngü 72 °C'de 5 dakika; *mecA* geni için 1 döngü 94 °C'de 5 dakika, 30 döngü 94 °C'de 60 saniye, 50 °C'de 60 saniye ve 72 °C'de 2 dakika ve 1 döngü 72 °C'de 10 dakika; *msrA* ve *msrB* genleri için ise 1 döngü 94 °C'de 10 dakika, 25 döngü 94 °C'de 60 saniye, 50 °C'de 60 saniye ve 72 °C'de 1.5 dakika ve 1 döngü 72 °C'de 10 dakikadan oluşan protokoller uygulanmıştır. PZR denemelerinde *E. faecium* FYE41 (*ermC*⁺, *tetM*⁺, *tetL*⁺), *E. gallinarum* DYE45 (*ermA*⁺, *ermB*⁺, *tetM*⁺, *tetL*⁺), *E. faecium* ATCC 51559 (*vanA*⁺), *E. faecalis* ATCC 51299 (*vanB*⁺) ve *S. aureus* ATCC 43300 (*mecA*⁺) suşları pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Çoğaltılan PZR fragmentlerinin agaroz jel elektroforezi % 2 (w/v) agaroz içeren jellerde 85 voltta 1.5-2 saat süre ile yapılmıştır. Fragment büyüklüklerinin hesaplanmasında GENESTA™ 100-bp DNA marker (GeneAll) moleküler belirteç olarak kullanılmıştır. Jeller etidyum bromit (Amresco) içeren çözelti içerisinde 30 dk boyanmış ve UV ışık altında (Vilber Lourmat) görüntülenmiştir.

5. Sonuç ve Tartışma (Result and Discussion)

BPA ve MSA besiyeri ortamları kullanılarak yapılan izolasyon çalışmaları sonucu, 75 Tulum peyniri örneğinin 46'sında (% 61.33) muhtemel *S. aureus* izolatına rastlanılmıştır. BPA besiyerinden 103 koloni, MSA besiyerinden ise 40 koloni olmak üzere toplam 143 muhtemel *S. aureus* kolonisi izole edilmiştir. Muhtemel *S. aureus* olduğu düşünülen 143 koloni öze yardımıyla alınmış ve BHI broth ortamında kültüre edilmiştir. İzolatların mikroskopik morfolojisi Gram boyama yöntemi ile hazırlanan preparatların ışık mikroskopunda incelenmesi sonucu belirlenmiştir. *Staphylococcus* cinsi üyesi bakteriler Gram pozitif kok morfolojisinde, mikroskop altında gözlemlendiğinde düzensiz kümeler halinde görülen ve katalaz pozitif bakterilerdir (Hennekinne vd., 2012). Mikroskopik inceleme sonucu 143 izolatın 141'inin Gram pozitif kok morfolojisinde ve düzensiz kümeler şeklinde görüldüğü belirlenmiştir. İki izolatın ise Gram negatif kok morfolojisine sahip olduğu tespit edilmiştir. Gram negatif özellik gösteren iki izolat *Staphylococcus* cinsi üyesi olmadığı için elemine edilmiştir. Katalaz testi yapılan 141 izolatın 100 adedinin katalaz pozitif, 41 adedinin ise katalaz negatif özellik gösterdiği belirlenmiştir. Katalaz negatif olduğu tespit edilen izolatlar elemine edilmiş ve çalışmaya Gram pozitif, katalaz pozitif 100 adet izolat ile devam edilmiştir. Muhtemel *S. aureus* olduğu düşünülen 100 adet izolatın genomik DNA Cancilla vd. (1992) tarafından önerilen yöntem esas alınarak izole edilmiştir. Muhtemel *S. aureus* izolatlarının genomik DNA örneklerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1. Muhtemel *S. aureus* İzolatlarının Genomik DNA Örneklerinin Agaroz Jel Elektroforez Görüntüsü (Agarose Gel Electrophoresis Image of Genomic DNA Samples of Presumptive *S. aureus* Isolates)

Genomik DNA örnekleri *nuc* geni tespitinde kalıp olarak kullanılmıştır. Ekstraselüler termostabil nükleaz enzimi üretimini belirleyen *nuc* geni *S. aureus*'a özgül diziler içermesi nedeni ile *S. aureus*'un tanısında moleküler belirteç

olarak kullanılmaktadır (Brakstad vd., 1992). Bu nedenle muhtemel *S. aureus* olduğu düşünülen 100 izolatın *S. aureus* olup olmadığının belirlenmesi için izolatlarda *nuc* geni varlığı PZR ile araştırılmıştır. PZR denemeleri sonucu 100 izolattan 15'inde (5.3, 7.2, 16.3, 27.2, 27.3, 27.8, 31.6, 31.7, 37.1, 38.6, 62.1, 66.3, 66.4, 66.5 ve 67.2) *nuc* genine özgül primerler ile 458 bp büyüklüğünde amplikonlar elde edilmiştir (Şekil 2). PZR denemelerinden elde edilen bulgular ışığında 5.3, 7.2, 16.3, 27.2, 27.3, 27.8, 31.6, 31.7, 37.1, 38.6, 62.1, 66.3, 66.4, 66.5 ve 67.2 kodlu izolatlar *S. aureus* olarak tanımlanmıştır.



Şekil 2. Muhtemel *S. aureus* izolatlarında *nuc* geni varlığının PZR ile tespiti (Detection of *nuc* gene presence by PCR in presumptive *S. aureus* isolates). 1: 16.5, 2: 17.2, 3: 18.1, 4: 23.1, 5: 23.3, 6: 27.1, 7: 27.3 (458 bp), 8: 27.8 (458 bp), M: Genesta™ 100 bp DNA Marker, 9: 31.6, 10: 31.7, 11: 37.1, 12: 38.2, 13: 39.4, 14: 46.1, 15: *S. aureus* ATCC 25923 (pozitif kontrol, 458 bp), 16: negatif kontrol (su)

BPA besiyerinde *S. warneri* ve *Proteus penneri*, MSA besiyerinde ise koagülaz negatif, mannitol pozitif *S. saccharolyticus*, *S. sciuri* ve *S. xylosus* türleri *S. aureus* ile benzer koloni morfolojisi göstermektedir (Abolghait vd., 2020). Bu nedenle çalışma kapsamında *nuc* genine özgül primer çifti ile amplikon vermeyen izolatların *S. warneri*, *P. penneri*, *S. saccharolyticus*, *S. sciuri* veya *S. xylosus* türü üyesi olabileceği düşünülmektedir. *nuc* genine özgül primer çifti ile amplikon vermeyen izolatların tür düzeyinde kesin tanısının 16S rDNA dizi analizi ile yapılması gerekmektedir. *S. aureus*'un tanısı için bir çok çalışmada *nuc* geni varlığı araştırılmıştır (Brakstad vd., 1992; Kim vd., 2001; Kroning vd., 2016; Kayili ve Sanlibaba, 2020). Çalışma kapsamında kullanılan Tulum peyniri örneklerinde *S. aureus* bulunma sıklığı % 13.33 (10/75) olarak hesaplanmıştır. Ülkemizde ve yurt dışında çeşitli peynir örneklerinin kullanıldığı farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda ise *S. aureus* bulunma sıklığı bu çalışmada bulunan değerden yüksek bulunmuştur (Cremonesi vd., 2007; Güven vd., 2010; Yücel ve Anıl, 2011; Bingöl ve Özmen Toğay, 2017; Kayili ve Sanlibaba, 2020). Cremonesi vd. (2007) tarafından yapılan çalışmada İtalya'da çiğ süttten yapılan 33 peynirde *S. aureus* varlığı araştırılmış ve çalışmada kullanılan peynir örneklerinin tamamında (% 100) *S. aureus* varlığı rapor edilmiştir. Güven vd. (2010) süt, süt ürünleri, et ve et ürünlerinden oluşan toplam 413 gıda örneğinde *S. aureus* varlığını araştırmışlar ve peynir örneklerinde *S. aureus* bulunma sıklığının % 27.9 olduğunu rapor etmişlerdir. Yücel ve Anıl (2011) Ankara ilinden çeşitli firma ve mandıralardan temin ettikleri 90 peynir (61 beyaz peynir, 13 kaşar peyniri, 11 tulum peyniri ve 5 lor peyniri) örneğinde *S. aureus* izolasyonu yapmışlar ve peynir örneklerinde *S. aureus* bulunma sıklığını % 20.2 olarak bulmuşlardır. Bingöl ve Özmen Toğay (2017) 52 Urfa peyniri örneğinin 48'inde (% 92) *S. aureus* varlığını tespit etmişlerdir. Kayili ve Sanlibaba (2020) ise 387 geleneksel peynir örneğinde *S. aureus* bulunma sıklığının % 21.96 olduğunu rapor etmişlerdir. Peynir yüksek seviyede besinsel içeriği nedeniyle *S. aureus* gelişimi için oldukça uygun bir gıda maddesidir. Peynirde *S. aureus* bulunması temelde çiğ süt kaynaklı olmakla birlikte, peynir üretiminde mastitisli süt kullanımı, süttün pastörizasyon sonrası kontamine olması ve peynirin üretimi ve üretim sonrası *S. aureus* ile kontamine olmasından kaynaklanmaktadır (Baran vd., 2017). Bu çalışma kapsamında da Isparta ilinden temin edilen Tulum peyniri örneklerinin % 13.33'ünde *S. aureus*'a rastlanılmasının nedeni peynir üretiminde çiğ süt kullanılması veya *S. aureus* taşıyıcısı kişiler tarafından peynire işleme, tulum basma gibi işlemler ile depolama veya satış sırasındaki kontaminasyon kaynaklı olabilir.

PZR analizi sonucu *nuc* geni varlığı doğrulanan suşların koagülaz aktivitesi incelenmiş ve *nuc*⁺ izolatların tamamının koagülaz pozitif özellikte olduğu belirlenmiştir. Koagülaz testi *S. aureus*'un diğer stafilokoklardan ayırımında kullanılmaktadır. Rutin laboratuvar uygulamalarında *S. aureus*'un diğer stafilokoklardan ayırımında koagülaz üretimi sıklıkla tek kriter olarak kullanılmaktadır. Ancak *S. aureus* dışında koagülaz pozitif stafilokokların da olduğu göz ardı edilmemelidir (Anonymous, 2020). Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda koagülaz negatif *S. aureus* suşlarının da olduğu rapor edilmiştir (Vandenesch vd., 1994; Olver vd., 2005; Bayston, 2006). Bu nedenle bu çalışma kapsamında koagülaz testi izolatların *nuc* geni varlığının araştırılmasından sonra yapılmıştır.

Antibiyotik disk difüzyon testi sonucu Tulum peynirinden izole edilen 15 *S. aureus* suşundan sadece 4'ünün (% 26.66) (27.2, 27.3, 27.8 ve 31.6) test edilen bütün antibiyotiklere karşı duyarlı olduğu belirlenmiştir. İzole edilen diğer *S. aureus* suşlarının ise çalışmada kullanılan antibiyotiklere karşı farklı seviyelerde direnç gösterdiği

belirlenmiştir (Tablo 2). Elde edilen bu sonuca benzer olarak, Malezya’da yapılan bir çalışmada 50 süt ve süt ürünü örneğinden izole edilen 5 *S. aureus* izolatının 3’ünün çalışmada kullanılan antibiyotiklerin tamamına duyarlı olduğu rapor edilmiştir (Sasidharan vd., 2011). Vitale vd. (2018) de keçi, inek ve koyun sütü ve peynir örneklerinden izole ettikleri 61 *S. aureus* suşunun 7 farklı antibiyotiğe (gentamisin, kanamisin, linkomisin, eritromisin, tetrasiklin, sefoperazon ve penisilin G) karşı antibiyotik direnç profillerini araştırdıkları çalışmalarında, izolatların % 27.86’sının (17/61) tüm antibiyotiklere duyarlı olduğunu rapor etmişlerdir.

Tablo 2. *S. aureus* Suşlarının Antibiyotik Direnç ve Duyarlılık Profilleri (Antibiotic Resistance and Susceptibility Profiles of *S. aureus* Strains)

İZOLAT NO	ANTİBİYOTİKLER ¹															
	K	DO	C	TEC	E	CN	FOX	MH	QD	TE	LZD	AK	SXT	RD	CIP	P
5.3	S ²	S	S	R	I	S	I	S	S	S	S	S	I	I	S	R
7.2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
16.3	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
27.2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
27.3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
27.8	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
31.6	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
31.7	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
37.1	S	S	S	S	I	I	S	S	I	S	S	R	S	S	I	R
38.6	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
62.1	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
66.3	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	I	I	R	I	R
66.4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
66.5	S	S	S	S	I	S	S	S	I	S	S	I	S	I	I	S
67.2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R

¹K: kanamisin (30 µg); DO: doksisisiklin (30 µg); C: kloramfenikol (30 µg); TEC: teikoplanin (30 µg); E: eritromisin (15 µg); CN: gentamisin (10 µg); FOX: sefoksitin (30 µg); MH: minosiklin (30 µg); QD: kinupristin/dalfopristin (15 µg); TE: tetrasiklin (30 µg); LZD: linezolid (30 µg); AK: amikasin (30 µg); SXT: trimetoprim/sulfametoksazol (1.25/23.75 µg); RD: rifampin (5 µg); CIP: siprofloksasin (5 µg); P: penisilin (10 U).

²S: Duyarlı, I: Orta seviyede dirençli, R: Dirençli

S. aureus suşlarının antibiyotik direnç ve duyarlılık yüzdeleri Tablo 3’de verilmiştir. *S. aureus* suşlarının en duyarlı olduğu antibiyotiklerin doksisisiklin, kanamisin, linezolid, minosiklin ve tetrasiklin olduğu belirlenmiştir. Bu antibiyotikleri takiben izolatların % 93.3’ü (14/15) gentamisin ve kloramfenikole, % 86.66’sı (13/15) sefoksitin ve teikoplanine, % 80’i (12/15) amikasin, eritromisin, kinupristin/dalfopristin, rifampin ve siprofloksasine, % 73.33’ü trimetoprim/sulfametoksazole ve % 40’ı penisilin G’ye duyarlı bulunmuştur. Bu sonuçlara benzer olarak, Kayili ve Sanlibaba (2020) geleneksel peynirlerden izole edilen *S. aureus* izolatlarının tamamının (% 100) linezolide, büyük bir çoğunluğunun ise kloramfenikol (% 97.65), doksisisiklin (% 92.94), tetrasiklin (% 90.59), teikoplanin (% 78.82), siprofloksasin (% 71.77) ve rifampine (% 68.23) duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir. Diğer taraftan araştırmacılar bu çalışmada elde edilen sonuçlara kıyasla geleneksel peynirlerden izole edilen *S. aureus* suşlarının gentamisin (% 58.83), kanamisin (% 55.29), sefoksitin (%48.24) ve eritromisin (% 30.59) duyarlılık oranlarının daha düşük olduğunu rapor etmişlerdir.

Tablo 3. *S. aureus* Suşlarının Antibiyotik Direnç ve Duyarlılık Yüzdeleri (Antibiotic Resistance and Sensitivity Percentages of *S. aureus* Strains)

ANTİBİYOTİKLER	S ¹		I		R	
	n ²	%	n	%	n	%
Penisilin G	6	40	0	0	9	60
Sefoksitin	13	86.66	2	13.33	0	0
Tetrasiklin	15	100	0	0	0	0
Doksisisiklin	15	100	0	0	0	0
Minosiklin	15	100	0	0	0	0
Eritromisin	12	80	3	20	0	0
Amikasin	12	80	2	13.33	1	6.66
Gentamisin	14	93.33	1	6.66	0	0
Kanamisin	15	100	0	0	0	0
Siprofloksasin	12	80	3	20	0	0
Kloramfenikol	14	93.33	0	0	1	6.66
Trimetoprim/sulfametoksazol	11	73.33	2	13.33	2	13.33
Linezolid	15	100	0	0	0	0
Rifampin	12	80	2	13.33	1	6.66
Kinupristin/dalfopristin	12	80	3	20	0	0
Teikoplanin	13	86.66	0	0	2	13.33

¹S: Duyarlı, I: Orta seviyede dirençli, R: Dirençli; ²n: *S. aureus* sayısı

S. aureus izolatlarının en dirençli (% 60, 9/15) olduğu antibiyotiğin penisilin G olduğu belirlenmiştir. Penisilin G’den sonra izolatların teikoplanin (% 13.33, 2/15), trimetoprim/sulfametoksazol (% 13.33, 2/15), amikasin (% 6.66, 1/15), kloramfenikol (% 6.66, 1/15) ve rifampin (% 6.66, 1/15) antibiyotiklerine karşı dirençli olduğu

belirlenmiştir (Tablo 3). *S. aureus* β-laktamaz üretimi ve modifiye penisilin bağlayıcı proteinlerin (PBP) üretimi olmak üzere iki ana direnç mekanizmasıyla β-laktam antibiyotiklere direnç kazanmaktadır (Foster, 2017; Pal vd., 2020). *S. aureus*'ta penisilin direnci oldukça yaygın karşılaşılmaktadır. Bu çalışmada elde edilen sonuçta benzer olarak, geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda da çiğ süt ve farklı peynir örneklerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının penisiline yüksek oranda direnç gösterdiği rapor edilmiştir (Miranda vd., 2009; Al-Ashmawy vd., 2016; Vitale vd., 2018; Kayili ve Sanlibaba, 2020). Çalışma kapsamında tulum peynirinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının hiç birinde sefoksitin direncinin tespit edilmemiş olması bir avantajdır. Sefoksitin disk difüzyon testi metisilin dirençli *S. aureus*'ların tespitinde fenotipik marker olarak kullanılmaktadır (Abolghait vd., 2020; Sadiq vd., 2020).

S. aureus izolatlarında metisilin (*mecA*), penisilin (*blaZ*), gentamisin (*aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic*, *aph(2'')-Id*), streptomisin (*aph(3')-IIIa*, *ant(4')-Ia*, *ant(6')-Ia*), eritromisin (*ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA*, *msrB*), tetrasiklin (*tekK*, *tetM*, *tetL*) ve vankomisin (*vanA*, *vanB*) direnç genlerinin araştırıldığı PZR denemelerinden elde edilen sonuçlar Tablo 4'de verilmiştir. PZR işlemi sonucu, izolatların % 33.33'ünde (5/15) antibiyotik direnç geni varlığı saptanmıştır. *S. aureus* izolatlarında *mecA*, *blaZ*, *msrA* ve *msrB* geni varlığı tespit edilmiştir. *S. aureus* 5.3 ve 37.1 suşlarında *mecA*, *blaZ*, *msrA* ve *msrB* genleri, *S. aureus* 16.3 suşunda *mecA* geni, *S. aureus* 66.3 ve 66.5 suşlarında ise *blaZ* geni varlığı belirlenmiştir. *S. aureus* izolatlarında en sık rastlanan (% 26.67, 4/15) antibiyotik direnç geninin *blaZ* geni olduğu tespit edilmiştir. *blaZ* geni tarafından kodlanan β-laktamaz üretimi β-laktam halkasını hidrolize ederek penisilini inaktive etmektedir (El Feghaly vd., 2012). PZR denemesi sonucu fenotipik olarak penisiline dirençli bulunan 9 suştan yalnız 5.3, 37.1 ve 66.3 kodlu suşlarda *blaZ* geni varlığı saptanmıştır. Fenotipik olarak penisiline dirençli olan 7.2, 31.7, 38.6, 62.1, 66.4 ve 67.2 kodlu izolatlarda ise *blaZ* geni varlığı tespit edilmemiştir. Benzer olarak Frey vd. (2013) ve Yang vd. (2015) tarafından yapılan çalışmalarda da penisiline dirençli stafilokok suşlarında *blaZ* geni varlığı belirlenmemiştir. Penisiline dirençli ancak *blaZ* geni içermeyen *S. aureus* suşlarında penisilin direncinin başka bir direnç mekanizmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Diğer taraftan fenotipik olarak penisiline duyarlı olduğu tespit edilen 66.5 kodlu suşta ise *blaZ* geni varlığı tespit edilmiştir. Benzer olarak farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da penisilin duyarlı stafilokok suşlarında *blaZ* geni varlığı bildirilmiştir (Kaase vd., 2008; El Feghaly vd., 2012; Ferreira vd., 2017). Çalışma kapsamında *blaZ* geni dışında izolatların % 20'sinde (3/15) *mecA* (Şekil 3), % 13.33'ünde (2/15) ise *msrA* ve *msrB* geni varlığı belirlenmiştir. Çalışmada varlığı araştırılan diğer antibiyotik direnç genlerine hiçbir izolatta rastlanılmamıştır. *mecA* geni PBP2a veya PBP2' olarak isimlendirilen alternatif bir penisilin bağlayıcı protein kodlamaktadır. PBP2a, β-laktam antibiyotiklere çok düşük afinite göstermektedir. Bu da bakterinin antibiyotiğe dirençli olmasına neden olmaktadır (Pal vd., 2020). *S. aureus*'da metisilin direncine neden olan *mecA* geni oldukça korunmuş bir gen olup, metisilin dirençli *S. aureus* suşlarının genotipik olarak belirlenmesinde biyomarker olarak kullanılmaktadır (Sadiq vd., 2020). Çalışma kapsamında *mecA* geni içerdiği tespit edilen 5.3 ve 16.3 kodlu suşların disk difüzyon testi sonucu sefoksitine orta seviyede dirençli, 37.1 kodlu suşun ise sefoksitine duyarlı olduğu belirlenmiştir. Farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda disk difüzyon testi sonucu sefoksitine dirençli bulunan *S. aureus* suşlarının tamamında *mecA* geni varlığı bildirilmiştir (Karmakar vd., 2016; Wu vd., 2018; Wu vd., 2019; Abolghait vd., 2020). Mimica vd. (2007), tarafından yapılan çalışmada ise 37.1 kodlu suşta olduğu gibi fenotipik olarak sefoksitine duyarlı olduğu tespit edilen 4 *S. aureus* izolatında *mecA* geni varlığı rapor edilmiştir. PZR denemeleri sonucu *msrA* ve *msrB* genleri varlığı eritromisine orta seviyede dirençli 5.3 ve 37.1 kodlu suşlarda gösterilmiştir. *msrA* ve *msrB* genleri ATP-bağımlı efluks pompası kodlayarak indüklenebilir eritromisin direncine neden olmaktadır (Pyzik vd., 2019; Pal vd., 2020).



Şekil 3. *S. aureus* suşlarında *mecA* geni varlığının PZR ile tespiti (Detection of *mecA* gene presence by PCR in *S. aureus* isolates). 1: 5.3 (310 bç), 2: 7.2, 3: 16.3 (310 bç), 4: 27.2, 5: 27.3, 6: 27.8, 7: 31.6, 8: 31.7, 9: 37.1 (310 bç), 10: Genesta™ 100 bp DNA Marker, 11: 38.6, 12: 62.1, 13: 66.3, 14: 66.4, 15: 66.5, 16: 67.2, 17: *S. aureus* ATCC 25923 (pozitif kontrol, 310 bç), 18: negatif kontrol (su)

Tablo 4. *S. aureus* Suşlarında Antibiyotik Direnç Genlerinin Varlığı (The Presence of Antibiotic Resistance Genes in *S. aureus* Strains)

ANTİBİYOTİK DİRENÇ GENLERİ	<i>S. aureus</i> İZOLAT KODU														
	5.3	7.2	16.3	27.2	27.3	27.8	31.6	31.7	37.1	38.6	62.1	66.3	66.4	66.5	67.2
<i>mecA</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>blaZ</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>aph(2'')-Ib</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>aph(2'')-Ic</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>aph(2'')-Id</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>aph(3')-IIIa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ant(4')-Ia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ant(6')-Ia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ermA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ermB</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ermC</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>msrA</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>msrB</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>tetK</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>tetM</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>tetL</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>vanA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>vanB</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Teşekkür (Acknowledgement)

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FYL-2018-6913 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

Çıkar Çatışması (Conflict of Interest)

Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması beyan edilmemiştir. No conflict of interest was declared by the authors.

Kaynaklar (References)

- Abolghait, S.K., Fathi, A.G., Youssef, F.M., Algammal, A.M., 2020. Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Isolated from Chicken Meat and Giblets Often Produces Staphylococcal Enterotoxin B (SEB) in Non-Refrigerated Raw Chicken Livers. International Journal of Food Microbiology, 328, 108669.
- Al-Ashmawy, M.A., Sallam K.I., Abd-Elghany, S.M., Elhadidy, M., Tamura, T., 2016. Prevalence, Molecular Characterization, and Antimicrobial Susceptibility of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Isolated from Milk and Dairy Products. Foodborne Pathogens and Disease, 13(3), 156-162.
- Anonymous, 2020. UK standards for microbiology investigations. Identification of Staphylococcus species, Micrococcus species and Rothia species. UK SMI ID: 7, Issue no: 4, Issue date: 26.05.20, England.
- Baran, A., Erdoğan, A., Turgut, T., Adiguzel, M.C., 2017. A Review on the Presence of Staphylococcus aureus in Cheese. Turkish Journal of Nature and Science, 6, 100-105.
- Bayston, R., 2006. Coagulase-Negative Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. Journal of Hospital Infection, 62(1), 127.
- Bingöl, K.K., Özmen Toğay, S., 2017. Urfa Peynirlerinden İzole Edilen Staphylococcus aureus Suşlarında Enterotoksin Üretim Potansiyeli ve Metisilin Dirençliliği. Akademik Gıda, 15(1), 29-35.
- Bitrus, A.A., Peter, O.M., Abbas, M.A., Goni, M.D., 2018. Staphylococcus aureus: A Review of Antimicrobial Resistance Mechanisms. Veterinary Sciences: Research and Reviews, 4(2), 43-54.
- Black, R.E., Williams, S.M., Jones, L.E., Goulding, A., 2002. Children Who Avoid Drinking Cow Milk Have Low Dietary Calcium Intakes and Poor Bone Health. The American Journal of Clinical Nutrition, 76(3), 675-680.
- Brakstad, O.G., Aasbakk, K., Maeland, J.A., 1992. Detection of Staphylococcus aureus by Polymerase Chain Reaction Amplification of the nuc Gene. Journal of Clinical Microbiology, 30(7), 1654-1660.
- Cancilla, M., Powell, J.B., Hillier, A.J., Davidson, B.E., 1992. Rapid Genomic Fingerprinting of Lactococcus lactis Strains by Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction with Phosphorus-32 and Fluorescent Labels. Applied and Environmental Microbiology, 58(5), 1772-1775.
- Cariolato, D., Andrighetto, C., Lombardi, A., 2008. Occurrence of Virulence Factors and Antibiotic Resistances in Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium Collected from Dairy and Human Samples in North Italy. Food Control, 19(9), 886-892.
- CLSI, 2016. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 26th Informational Supplement M100-S-26. Pennsylvania: Wayne, United States of America.
- Cremonesi, P., Perez, G., Pisoni, G., Moroni, P., Morandi, S., Luzzana, M., Brasca, M., Castiglioni, B., 2007. Detection of Enterotoxigenic Staphylococcus aureus Isolates in Raw Milk Cheese. Letters in Applied Microbiology, 45(6), 586-591.
- Depardieu, F., Perichon, B., Courvalin, P., 2004. Detection of van Alphabet and Identification of Enterococci and Staphylococci at the Species Level by Multiplex PCR. Journal of Clinical Microbiology, 42(12), 5857-5860.
- Dutka-Malen, S., Evers, S., Courvalin, P., 1995. Detection of Glycopeptide Resistance Genotypes and Identification to the Species Level of Clinically Relevant Enterococci by PCR. Journal of Clinical Microbiology, 33(1), 24-27.

- El Feghaly, R.E., Stamm, J.E., Fritz, S.A., Burnham, C.D., 2012. Presence of the blaZ Beta-Lactamase Gene in Isolates of *Staphylococcus aureus* that Appear Penicillin Susceptible by Conventional Phenotypic Methods. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 74(4), 388-393.
- Ferreira, A.M., Martins, K.B., da Silva, V.R., Mondelli, A.L., da Cunha, M. de L.R. de S., 2017. Correlation of Phenotypic Tests with the Presence of The blaZ Gene for Detection of Beta-Lactamase. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(1), 159-166. doi:10.1016/j.bjm.2016.10.011
- Foster, T.J., 2017. Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Current Status and Future Prospects*. *FEMS Microbiology Reviews*, 41, 430-449.
- Frey, Y., Rodriguez, J.P., Thomann, A., Schwendener, S., Perreten, V., 2013. Genetic Characterization of Antimicrobial Resistance in Coagulase-Negative *Staphylococci* from Bovine Mastitis Milk. *Journal of Dairy Science*, 96, 2247-2257.
- Gandra, E.A., Fernandez, M.A., Silva, J.A., Silva, W.P.D., 2011. Standardization of a Multiplex PCR for the Identification of Coagulase-Positive *Staphylococcus*. *Food Science and Technology*, 31(4), 946-949.
- Güven, K., Mutlu, M.B., Gülbandır, A., Cakır, P., 2010. Occurrence and Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolated from Meat and Dairy Products Consumed in Turkey. *Journal of Food Safety*, 30(1), 196-212.
- Hennekinne, J.A., De Buyser, M. L., Dragacci, S., 2012. *Staphylococcus aureus* and Its Food Poisoning Toxins: Characterization and Outbreak Investigation. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(4), 815-836.
- Janštová, B., Necidová, L., Skockova, A., Janštová, B., 2014. Staphylococcal Enterotoxin Production in Model Samples of Milk and Fresh Cheese. *Journal of Food and Nutrition Research*, 53(4), 389-392.
- Kaase, M., Lenga, S., Friedrich, S., Szabados, F., Sakinc, T., Kleine, B., Gatermann, S.G., 2008. Comparison of Phenotypic Methods for Penicillinase Detection in *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*. 14(6), 614-616.
- Karmakar, A., Dua, P., Ghosh, C., 2016. Biochemical and Molecular Analysis of *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates from Hospitalized Patients. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 9041636.
- Kayili, E., Sanlıbaba, P., 2020. Prevalence, Characterization and Antibiotic Resistance of *Staphylococcus aureus* Isolated from Traditional Cheeses in Turkey. *International Journal of Food Properties*, 23(1), 1441-1451.
- Kim, C. H., Khan, M., Morin, D. E., Hurley, W. L., Tripathy, D. N., Kehrli Jr., M., Oluoch, A. O., Kakoma, I., 2001. Optimization of the PCR for Detection of *Staphylococcus aureus* nuc Gene in Bovine Milk. *Journal of Dairy Science*, 84(1), 74-83.
- Kot, B., Wierzychowska, K., Piechota, M., Grużewska, A., 2020. Antimicrobial Resistance Patterns in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* from Patients Hospitalized during 2015-2017 in Hospitals in Poland. *Medical Principles and Practice*, 29, 61-68.
- Kroning, I. S., Iglesias, M. A., Sehn, C. P., Gandra, T. K. V., Mata, M. M., da Silva, W. P., 2016. *Staphylococcus aureus* Isolated from Handmade Sweets: Biofilm Formation, Enterotoxigenicity and Antimicrobial Resistance. *Food Microbiology*, 58, 105-111.
- Kümmel, J., Stessl, B., Gonano, M., Walcher, G., Bereuter, O., Fricker, M., Grunert, T., Wagner, M., Ehling-Schulz, M., 2016. *Staphylococcus aureus* Entrance into the Dairy Chain: Tracking *S. aureus* from Dairy Cow to Cheese. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1603.
- Licitra, G., 2013. Etymologia: *Staphylococcus*. *Emerging Infectious Diseases*, 19(9), 1553.
- Lina G., Quaglia A., Reverdy M.E., Leclercq R., Vandenesch F., Etienne J., 1999. Distribution of Genes Encoding Resistance to Macrolides, Lincosamides, and Streptogramins Among *Staphylococci*. *Antimicrob Agents and Chemotherapy*, 43(5), 1062-1066.
- Martineau, F., Picard F.J., Lansac, N., Ménard, C., Roy, P.H., Ouellette, M., Bergeron, M.G., 2000. Correlation Between the Resistance Genotype Determined by Multiplex PCR Assays and the Antibiotic Susceptibility Patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(2), 231-238.
- Mimica, M.J., Berezin, E.N., Carvalho, R.L.B., Mimica, I.M., Mimica, L.M.J., Sáfiadi, M.A.P., Schneider, E., Caiiffa-Filho, H.H., 2007. Detection of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolated from Pediatric Patients: Is the Cefoxitin Disk Diffusion Test Accurate Enough? *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 11(4), 415-417.
- Miranda, J. M., Mondragón, A., Vázquez, B. I., Fente, C. A., Cepeda, A., Franco, C. M., 2009. Microbiological Quality and Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Isolated from Conventional and Organic "Arzúa-Ulloa" Cheese. *CyTA-Journal of Food*, 7(2), 103-110.
- Niu, H., Yu, H., Hu, T., Tian, G., Zhang, L., Guo, X., Hu, H., Wang, Z., 2016. The Prevalence of Aminoglycoside-Modifying Enzyme and Virulence Genes Among Enterococci with High-Level Aminoglycoside Resistance in Inner Mongolia, China. *Brazilian Journal of Microbiology*. 47(3), 691-696.
- Olver, W. J., Carmichael, I. C., Ziglam, H. M., Morrison, D., 2005. Bacteraemia with Tube-Coagulase-Negative Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Hospital Infection*, 60(1), 87-88.
- Ouoba, L.I.I., Lei, V., Jensen, L.B., 2008. Resistance of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria of African and European Origin to Antimicrobials: Determination and Transferability of the Resistance Genes to Other Bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 121(2), 217-224.
- Pal, M., Kerorsa, G.B., Marami, L.M., Kandi, V., 2020. Epidemiology, Pathogenicity, Animal Infections, Antibiotic Resistance, Public Health Significance, and Economic Impact of *Staphylococcus aureus*: A Comprehensive Review. *American Journal of Public Health Research*, 8(1), 14-21.
- Pyzik, E., Marek, A., Pysniak, D.S., Chmiel, R.U., Jarosz, L.S., Podebska, I.J., 2019. Detection of Antibiotic Resistance and Classical Enterotoxin Genes in Coagulase Negative *Staphylococci* Isolated from Poultry in Poland. *Journal of Veterinary Research*, 63, 183-190.
- Sadiq, A., Samad, M., Saddam, Basharat, N., Ali, S., Roohullah, Saad, Z., Khan, A.N., Ahmad, Y., Khan, A., Khan, J., 2020. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in slaughter houses and meat shops in capital territory of Pakistan during 2018-2019. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1-12.
- Sasidharan, S., Prema, B., Latha, L. Y., 2011. Antimicrobial Drug Resistance of *Staphylococcus aureus* in Dairy Products. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(2), 130-132.
- Serwecińska, L., 2020. Antimicrobials and Antibiotic-Resistant Bacteria: A Risk to the Environment and to Public Health. *Water*, 12, 3313.

- Suliaman, A.M.E., Ali, R.A.M., Razig, K.A.A., 2012. Production and Effect of Storage in the Chemical Composition of Mozzarella Cheese. *International Journal of Food Science and Nutrition Engineering*, 2(3), 21-26.
- Tekinşen, K.K., Uçar, G., 2007. Konya Yöresinde Üretilen Mahalli Tulum Peynirleri. *Akademik Gıda*, 4(6), 33-37.
- Temiz, A., 1994. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Şafak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, Türkiye, 266 s. ISBN:975-95834-0-2
- Tomar, O., Akarca, G., Beykaya, M., Çağlar, A., 2018. Some Characteristics of Erzincan Tulum Cheese Produced Using Different Probiotic Cultures and Packaging Material. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 24(5), 647-654.
- Tong, S.Y.C., Davis, J.S., Eichenberger, E., Holland, T.L., Fowler, V.G. Jr., 2015. Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 603-661.
- Turner, N.A., Sharma-Kuinkel, B.K., Maskarinec, S.A., Eichenberger, E.M., Shah, P.P., Carugati, M., Holland, T.L., Fowler, V.G. 2019. Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: An Overview of Basic and Clinical Research. *Nature Reviews Microbiology*, 17, 203-218.
- Vakulenko, S.B., Donabedian, S.M., Voskresenskiy, A.M., Zervos, M.J., Lerner, S.A., Chow, J.W., 2003. Multiplex PCR for Detection of Aminoglycoside Resistance Genes in Enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(4), 1423-1426.
- Vandenesch, F., Lebeau, C., Bes, M., McDevitt, D., Greenland, T., Novick, R. P., Etienne, J., 1994. Coagulase Deficiency in Clinical Isolates of Staphylococcus aureus Involves Both Transcriptional and Post-Transcriptional Defects. *Journal of Medical Microbiology*, 40(5), 344-349.
- Vestergaard, M., Frees, D., Ingmer, H., 2019. Antibiotic resistance and the MRSA problem. In *Gram Positive Pathogens*, ASM Press, Washington DC, 747-765.
- Vitale, M., Gaglio, S., Galluzzo, P., Cascone, G., Piraino, C., Di Marco Lo Presti, V., Alduina, R., 2018. Antibiotic Resistance Profiling, Analysis of Virulence Aspects and Molecular Genotyping of Staphylococcus aureus Isolated in Sicily, Italy. *Foodborne Pathogens and Disease*, 15(3), 177-185.
- Wu, S., Huang, J., Wu, Q., Zhang, J., Zhang, F., Yang, X., Wu, H., Zeng, H., Chen, M., Ding, Y., Wang, J., Lei, T., Zhang, S. Xue L., 2018. Staphylococcus aureus Isolated from Retail Meat and Meat Products in China: Incidence, Antibiotic Resistance and Genetic Diversity. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1-14.
- Wu, S., Zhang, F., Huang, J., Wu, Q., Zhang, Y., Xue, L., Wang, J., Ding, Y., 2019. Phenotypic and Genotypic Characterization of PVL-Positive Staphylococcus aureus Isolated from Retail Foods in China. *International Journal of Food Microbiology*, 304, 119-126.
- Yang, F., Wang, O., Wang, X., Wang, L., Xiao, M., Li, X., Luo, J., Zhang, S., Li, H., 2015. Prevalence of blaZ Gene and Other Virulence Genes in Penicillin-Resistant Staphylococcus aureus Isolated from Bovine Mastitis Cases in Gansu, China. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 39: 634-636.
- Yogurtcu, N.N., Tuncer, Y., 2013. Antibiotic Susceptibility Patterns of Enterococcus Strains Isolated from Turkish Tulum Cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 66, 236-242.
- Yücel, N., Anıl, Y., 2011. Çiğ Süt ve Peynir Örneklerinden Staphylococcus aureus ve Koagülaz Negatif Stafilokokların İdentifikasyonu ve Antibiyotik Duyarlılığı. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 68(2), 73-78.
- Zhang, K., Sparling, J., Chow, B.L., Elsayed, S., Hussain, Z., Church, D.L., Gregson, D.B., Louie, T., Conly, J.M., 2004. New Quadriplex PCR Assay for Detection of Methicillin and Mupirocin Resistance, and Simultaneous Discrimination of Staphylococcus aureus from Coagulase-Negative Staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(11), 4947-4955.