



RESEARCH ARTICLE

Türkiye’de mastitisli inek sütlerinde *mecC* geni taşıyan metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* varlığının belirlenmesi

Zafer Sayın^{1*}, Aslı Sakmanoğlu¹, Uçkun Sait Uçan¹, Yasemin Pınarkara²,
Ali Uslu¹, Zeki Aras³, Osman Erganiş¹

¹Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 42075, Selçuklu, Konya,

²Selçuk Üniversitesi, Sarayönü Meslek Yüksek Okulu, Gıda Teknolojisi Bölümü, 42430, Sarayönü, Konya,

³Aksaray Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 68100, Aksaray, Türkiye

Geliş: 31.03.2016, Kabul: 09.05.2016

*zafersayin@gmail.com

Detection of methicilline resistant *Staphylococcus aureus* carrying *mecC* gene in mastitic milk samples of cattle in Turkey

Eurasian J Vet Sci, 2016, 32, 3, 182-187
DOI: 10.15312/EurasianJVetSci.2016318398

Öz

Amaç: Mastitisli ineklerin süt örneklerinden izole edilen ve fenotipik olarak metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) olduğu belirlenen izolatlarda, *mecC* gen varlığının araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışma materyalini mastitisli ineklerden izole edilen 150 adet *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) suşu oluşturdu. İzolatlardaki metisilin direnci sefoksitin disk difüzyon testi ve ticari PBP2a lateks aglütinasyon testi ile belirlendi. MRSA izolatlarında *mecA* ve *mecC* gen varlığı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile analiz edildi.

Bulgular: Yüz elli adet *S. aureus* izolatından 28’inin (%18.6) sefoksitin disk difüzyon testi ile fenotipik olarak metisilin dirençli olduğu belirlendi. MRSA izolatlarının 21’inde (%75) lateks test ile aglütinasyon ve PZR ile *mecA* geni belirlendi. Yedi (%25) izolatta aglütinasyon ve *mecA* geni belirlenemeyen, *mecC* geni taşıdığı tespit edildi.

Öneri: Türkiye’de mastitisli ineklerde *mecC* MRSA izolasyon oranının beklenmedik şekilde yüksek olduğu ve fenotipik olarak MRSA olarak tanımlanan izolatların genotipik doğrulanmasında *mecC* geni yönünden de analiz edilmesi gerektiği kanaatine varıldı.

Anahtar kelimeler: *mecA*, *mecC*, mastitis, *Staphylococcus aureus*, Türkiye

Abstract

Aim: It was aimed to investigate the *mecC* gene in phenotypically methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), isolated from mastitic milk samples.

Materials and Methods: This study was performed on 150 *S. aureus* strains isolated from mastitic cattle. Resistance to methicillin was determined by cefoxitin disc diffusion method and commercial PBP2a latex agglutination test. Detection of *mecA* and *mecC* gene in MRSA isolates were carried out by Polymerase Chain Reaction (PCR).

Results: Twenty eight (18.6%) out of 150 *S. aureus* isolates were identified phenotypically as MRSA by cefoxitin disc diffusion test. Agglutination and *mecA* gene were detected in 21 (75%) MRSA isolates by latex agglutination test and PCR, *mecC* gene was determined in 7 (25%) MRSA isolates in all of which no positivity by latex agglutination test and *mecA*-PCR analysis was observed.

Conclusion: *mecC* MRSA isolation rate was determined as to surprisingly be high in mastitic cattle in Turkey, and *mecC* gene should also be further analyzed for genotypic confirmation of MRSA isolates that already identified by phenotypic methods.

Keywords: *mecA*, *mecC*, mastitis, *Staphylococcus aureus*, Turkey





Giriş

S. aureus insan ve hayvanlarda çok sayıda enfeksiyona sebep olmakla birlikte, insanlarda hastane enfeksiyonları ve sığırlarda mastitislerin primer etkenlerinden biridir. Metisilin dirençli *S. aureus*'lar (MRSA) tüm dünyada insan ve hayvanlarda ölümlere ve tedavisi güç enfeksiyonlara sebep olmaktadır (Grema ve ark 2015). MRSA kaynaklı enfeksiyonlar epidemiyolojik olarak hastane kaynaklı, toplum kaynaklı ve çiftlik hayvanlarıyla ilişkili olmak üzere üç grupta incelenmektedir (Gindonis ve ark 2013). Çiftlik hayvanlarında ilk kez 1972 yılında mastitisli ineklerin sütlerinde tanımlanmış (Devriese ve ark 1972) ve insidensinin giderek arttığı bildirilmiştir (Cortimiglia ve ark 2015).

Çiftlik hayvanlarında, yol açtığı büyük ekonomik kayıpların yanı sıra, insanlar için de rezervuar olması sebebi ile önem taşımaktadır (Gindonis ve ark 2013). Metisilin direnci, MRSA izolatlarında, stafilokokal kaset kromozomu (Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*; *SCCmec*) olarak adlandırılan bölgede yerleşim gösteren *mecA* geni tarafından kodlanan, penisilin bağlayan protein (PBP2a) ile ilişkilidir. PBP2a, β -laktam antibiyotiklere düşük affinite gösterir ve antibiyotik varlığında bu proteini üreten bakteriler hücre duvar sentezini sürdürürler. Genel olarak MRSA enfeksiyonlarında metisilin direncinin bulunması β -laktamlar başta olmak üzere bakterideki çoklu antibiyotik direncini de ifade etmektedir (Paterson ve ark 2014b).

Metisilin direncinin belirlenmesinde, PZR ve DNA hibridizasyon teknikleri ile *mecA* geninin saptanması altın standart olarak kabul edilmektedir. Fenotipik teşhiste, oksasilin ve/veya sefoksitin diski kullanılarak disk difüzyon ve tüp dilüsyon yöntemleri kullanılabilir. Ayrıca, PBP2a'yı belirlemeye yönelik antikor temelli ticari aglütinasyon testleri de bulunmaktadır (Kumurya ve ark 2015). İnsan ve hayvanlardan izole edilen ve fenotipik olarak MRSA olduğu belirlenen, ancak PZR ile *mecA* negatif olan suşlarda, *mecA* ile %70 DNA homolojisine sahip yeni bir *mec* geni tanımlanmıştır (Garcia-Alvarez ve ark 2011). *mecA*'dan farklı *SCCmec* (tip XI) üzerinde lokalize olan bu gen, *mecC* (*mecALGA251*) olarak isimlendirilmiştir (Ito ve ark 2012). Daha sonra, çok sayıda araştırmacı tarafından insan ve hayvanlardan izole edilen MRSA suşlarında *mecC* gen varlığı ortaya konmuştur (Gindonis ve ark 2013, Loncaric ve ark 2013, Medhus ve ark 2013, Ariza-Miguel ve ark 2014, Paterson ve ark 2014a, Gomez ve ark 2015).

Türkiye'de süt ineklerinde MRSA enfeksiyonları ile ilgili çok sayıda literatür bulunmakla birlikte, *mecC* geni taşıyan MRSA varlığı ile ilgili herhangi bir veriye rastlanmamıştır.

Bu çalışmada, mastitisli ineklerin süt örneklerinden izole edilen ve fenotipik olarak MRSA olduğu belirlenen izolatlarda, *mecC* gen varlığının araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem

Çalışma materyalini mastitisli ineklerden izole edilen 150 adet *S. aureus* suşu oluşturdu. İzolasyonlar, dört yıllık periyotta (2012-2016) Türkiye'nin farklı bölgelerinde bulunan 16 Holstein süt sığırcılığı işletmesinden etken izolasyonu için Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına kabul edilen 420 süt örneğinden gerçekleştirildi. Süt örneklerinin primer kültürü, %7 defibrine koyun kanı eklenen, kanlı agarda (Oxoid, UK), 37 °C'de oksijenli ortamda 24 saat inkübasyonla gerçekleştirildi. *S. aureus* izolatları, klasik mikrobiyolojik metotlar (Gram boyama, koloni morfolojisi, hemoliz, katalaz, tüp koagülaz, asetoin üretimi, sükröz, d-mannoz, d-sellebioz, d-ksiloz, l-arabinoz, raffinöz, d-trehaloz, maltoz ve d-mannitol fermentasyonu) ile tanımlandı (Winn ve ark 2006). *S. aureus* olarak tanımlanan izolatlar, %10 (v/v) gliserol (Amresco, USA) içeren Trypticase Soy Broth (TSB) (Oxoid, UK) içinde -15 °C'de saklandı. Fenotipik tanımlamanın doğrulanması amacı ile PZR kullanıldı.

DNA izolasyonu

S. aureus izolatlarının kromozomal DNA'sı, etkenin 2 mL TSB içindeki bir gecelik kültüründen, "Wizard Genomic DNA purification kit" (Promega, USA) ile üretici firma yönergesine göre izole edildi. DNA örnekleri PZR analizlerine kadar -20 °C'de saklandı.

S. aureus-spesifik PZR analizi

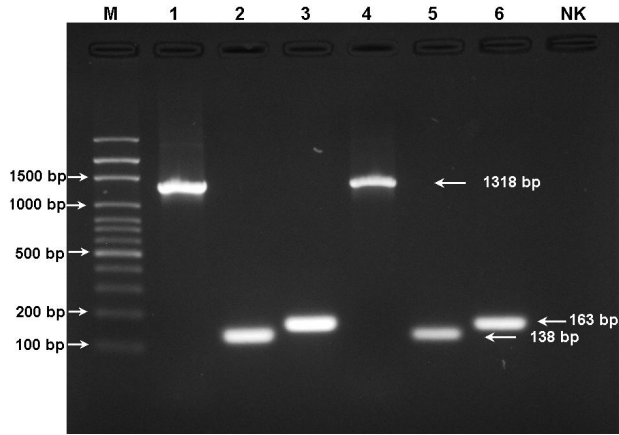
S. aureus 23S rRNA gen bölgesine yönelik olarak seçilen primerler (Sau327-F-5'-GGACGACATTAGACGAATCA-3', Sau1645-R-5'-CGGGCACCCTATTTCTATCT-3') ile PZR uygulandı. Amplifikasyon, 94 °C 2 dk ön denatürasyon ve 35 döngü 94 °C 45 sn, 64 °C 1 dk, 72 °C 2 dk ve 72 °C 10 dk son zincir uzaması ile gerçekleştirildi (Riffon ve ark 2001). Amplifiye PZR ürünleri, ethidium bromidli (0.5 µg/mL) agaroz jelde (%1.5, w/v), 100 bp DNA marker (Solis Biodyne, Estonia) ile birlikte elektroforez edilerek UV ışık kaynağı altında incelendi. 1318 bp büyüklüğündeki PZR ürünleri *S. aureus* olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak *S. aureus* ATTC 43300 suşu, negatif kontrol olarak distile su kullanıldı.

Disk difüzyon testi

S. aureus izolatlarında, metisilin dirençliliği, sefoksitin (30 µg, Oxoid, UK) diski kullanılarak, "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI 2014) standartlarına uygun olarak disk difüzyon metodu ile belirlendi.

Lateks aglütinasyon testi

MRSA izolatlarında PBP2a'nın varlığı, ticari lateks aglütinasyon kiti (Oxoid, UK) ile üretici firma yönergesine göre test edildi.



Şekil 1. PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: 100 bp DNA marker, 1: *S. aureus* ATCC 25923, 2: *S. aureus* NCTC 13552, 3: *S. aureus* ATCC 43300, 4: *S. aureus* saha izolatu, 5: *mecC* pozitif *S. aureus* saha izolatu, 6: *mecA* pozitif *S. aureus* saha izolatu, NK: Negatif kontrol (distile su).

mecA gen-PZR analizi

MRSA izolatlarında *mecA* gen amplifikasyonu Mehrotra ve ark (2000)'nin belirttikleri metoda göre PZR ile gen üzerindeki 163 bp fragmenti kodlayan primerler (GMecAR1-F-5'-ACTGCTATCCACCTCAAAC-3', GMecAR2-R-5'-CTGGTG AAGTTGTAATCTGG-3') kullanılarak gerçekleştirildi. Amplifikasyon, 94 °C 5 dk ön denatürasyon ve 35 döngü 94 °C 2 dk, 57 °C 2 dk, 72 °C 1 dk ve 72 °C 7 dk son zincir uzaması ile gerçekleştirildi. *S. aureus* ATCC 43300 suşu pozitif kontrol olarak kullanıldı.

mecC gen-PZR analizi

MRSA izolatlarında *mecC* gen varlığının belirlenmesi için, Stegger ve ark (2012)'nin belirttikleri metoda göre *mecC*-F-5'-GAAAAAAGGCTTAGAAGCCTC-3' ve *mecC*-R-5'-GAAGAT CTTTTCCGTTTTCAGC-3' primerleri ile PZR uygulandı. Amplifikasyon, 94 °C 5 dk ön denatürasyon ve 30 döngü 94 °C 30 sn, 59 °C 1 dk, 72 °C 1 dk ve 72 °C 10 dk son zincir uzaması ile gerçekleştirildi. Agaroz jel elektroforezi sonucunda 138 bp büyüklüğündeki PZR ürünleri *mecC* MRSA olarak değerlendirildi. *S. aureus* NCTC 13552 suşu pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Bulgular

S. aureus-spesifik PZR analizinde, klasik mikrobiyolojik metotlar ile tanımlanmış izolatların tamamında (n=150) etken için spesifik 1318 bp büyüklüğünde DNA bantları gözlemlendi (Şekil 1). Sefoksitin disk difüzyon testinde, 150 *S. aureus* izolatından 28'i (%18.6) fenotipik olarak metisilin dirençli (MRSA), 122'si (%81.3) duyarlı (MSSA) olarak belirlendi. Lateks aglütinasyon testinde, 21 (%75) MRSA izolatında aglütinasyon gözlenirken, 7 (%25) izolatla aglütinasyon tespit edilmedi. *mecA*-PZR analizinde, lateks aglütinasyon testi pozitif reaksiyon veren 21 izolatın tamamında, *mecA* geni için spesifik 163 bp büyüklüğünde DNA bantları gözlenirken (Şe-

kil 1), negatif reaksiyon veren 7 izolatla *mecA* geni belirlenmedi. *mecC*-PZR analizinde, *mecA*-PZR negatif 7 (%25) izolatla *mecC* gen varlığını gösteren 138 bp uzunluğunda DNA bantları tespit edildi (Şekil 1). MSSA izolatlarının *mecA* ve *mecC* PZR analizlerinde her iki geni de taşımadıkları belirlendi. Çalışmaya dahil edilen 16 süt sığırcılığı işletmesinin 14'ünde (%87.5) MRSA belirlenirken, 2 işletmede tespit edilmedi. *mecC* MRSA izolatlarından 4'ü, 2013 yılında aynı işletmeden elde edilirken, diğer 3 izolat 2015 yılında farklı işletmelerden elde edildi.

Tartışma

İnsan ve hayvanlardaki MRSA enfeksiyonları bütün dünyada insidensi gittikçe artan önemli bir problem haline gelmiştir. İzolatlardaki metisilin direnci ile birlikte, görülen çoklu antibiyotik direnci, ölümcül enfeksiyonlara ve büyük ekonomik kayıplara sebep olabilmektedir.

Süt ineklerinde, MRSA yol açtığı tedavisi güç enfeksiyonların yanı sıra, veteriner halk sağlığı açısından da önem arz etmektedir. Türkiye'de mastitisli süt örneklerinden izole edilen *S. aureus*'larda metisilin direncinin incelendiği çalışmalarda farklı oranlar belirlenmiştir. Güler ve ark (2005) Konya'da sığır mastitislerden izole edilen *S. aureus* suşlarında metisilin direnci bulunmadığını bildirirken, aynı bölgede Uçan ve Aslan (2002) %1.3 oranında direnç belirlemişlerdir. Erzurum yöresinde %8.7 (Kireççi ve Çolak 2002), Burdur yöresinde ise %17.5 (Türütöğlü ve ark 2006) ve %23 (Pehlivanoglu ve Yardımcı 2012) oranında metisilin dirençliliği bildirilmiştir. Sığır mastitislerinden izole edilen stafillokoklarda en yüksek metisilin dirençliliği Aydın ilinde bildirilmiştir. Kırkan ve ark (2005) metisilin direncini %60, Kaynarca ve Türkyılmaz (2010) %10.4; Türkyılmaz ve ark (2010) ise %17.2 olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise farklı coğrafi bölgelerdeki mastitisli ineklerden izole edilen *S. aureus* suşlarının %18.6'sı metisilin dirençli olarak belirlenmiştir. Türkiye'de gerçekleştirilen çalışmaların farklı yıllarda, farklı metotlar kullanılarak (fenotipik/genotipik) ve farklı bölgelerden sağlanan süt örneklerinde gerçekleştirilmesi nedeni ile sonuçlar arasında karşılaştırma yapmak ve metisilin direncinin insidensindeki yıllara göre değişim hakkında sağlıklı fikir yürütmek güçtür.

Günümüzde metisilin direncinin belirlenmesinde, PZR ile *mecA* geninin saptanmasının altın standart olarak nitelendirilmesi sorgulanmaya başlanmıştır. Garcia-Alvarez ve ark (2011), İngiltere'de mastitisli süt ineklerinden izole edilen ve fenotipik olarak (oksasilin/sefoksitin dirençli) MRSA olarak belirlenen izolatların, *mecA*-PZR ve PPB2a aglütinasyon testlerinde negatif sonuç verdiğini, gen sekans analiz sonuçlarına göre ise söz konusu izolatların metisilin dirençliliğinden sorumlu yeni bir gen bölgesine (*mecC*) sahip olduklarını bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar İngiltere ve Danimarka'da süt ineklerinden ve insanlardan elde edilen *S. aureus*'lar ile



gerçekleştirdikleri retrospektif bir çalışmada, 65 izolatta daha *mecC* gen varlığını ortaya koymuşlardır. İlk kez tanımlandığı 2011 yılından sonra çok sayıda Avrupa ülkesinde insan (Cuny ve ark 2011, Barraud ve ark 2013, Garcia-Garrote ve ark 2013), evcil ve yabani hayvanlarda (sığır, koyun, kedi, köpek, rat, kirpi, tavşan, su samuru, vaşak, kuş) *mecC* MRSA tespit edilmiştir (Paterson ve ark 2012, Eriksson ve ark 2013, Loncaric ve ark 2013, Medhus ve ark 2013). Son zamanlarda, Fransa (Laurent ve ark 2012), İsveç (Unnerstad ve ark 2013), Belçika (Vandendriessche ve ark 2013), Finlandiya (Gindonis ve ark 2013) ve İspanya (Ariza-Miguel ve ark 2014) gibi ülkelerde de mastitisli inek ve koyun sütlerinden *mecC* MRSA izolasyonları bildirilmiştir. Gindonis ve ark (2013), Finlandiya'da mastitisli ineklerdeki oranı %0,6 olarak; Unnerstad ve ark (2013) ise İsveçte 9000 süt örneğinden izole edilen 537 *S. aureus* izolatından 4'ünün (%0.7); Ariza-Miguel ve ark (2014), İspanya'da koyun sütlerinden izole edilen 601 *S. aureus*'tan 1'nin (%0.16) *mecC* MRSA olduğunu rapor etmişlerdir. Paterson ve ark (2014a), İngiltere'de 465 çiftlikteki süt tanklarından aldıkları örnekler ile gerçekleştirdikleri çalışmada, 10 işletmede (%2.1) *mecC* MRSA'ya rastlamışlardır. Loncaric ve ark (2014), Avustralya'da, 2 (%3.6) sığır (n=55) ve 1 (%2.6) koyun (n=38) burun sürüntü örneğinden, Gomez ve ark (2015), İspanya'da Alageyik burun sürüntü örneklerinden izole edilen 16 *S. aureus* izolatından 11'inde (%68,7) *mecC* gen varlığını ortaya koymuşlardır. Diaz ve ark (2016), 2011-2015 yıllarında *mecC* MRSA ile ilgili yayınlanan 51 makale verilerinin meta analizinde, insanlardaki prevalansı %0.004, hayvanlardaki prevalansı %0.1 ve ortalama prevalansı %0.009 olarak hesaplamışlardır. Ancak *mecC* MRSA pozitifliğini bildiren makalelerde, makale başına oran yüksek olmasına karşın, negatiflik bildiren makale sayısının fazla olması sebebiyle ortalama prevalansların düşük olarak hesaplandığı düşünülmektedir. Türkiye'de gerçekleştirilen tek çalışmada, insanlardan izole edilen 1700 adet *S. aureus* izolatında *mecC* geni belirlenememiştir (Kılıç ve ark 2015). Bu çalışmada mastitisli süt örneklerinden izole edilen *S. aureus*'ların (n=150) %4,6'sı, MRSA izolatlarının (n=28) %25'i *mecC* MRSA olarak tiplendirildi. Elde edilen oranların, süt örnekleri ile gerçekleştirilen daha önceki çalışmalar (Gindonis ve ark 2013, Unnerstad ve ark 2013, Miguel ve ark 2014, Paterson ve ark 2014a) ile kıyaslandığında, beklenmedik şekilde yüksek olduğu görüldü. 2012-2016 yıllarında yürütülen bu çalışmada, *mecC* MRSA izolasyonlarının, 4'ü aynı işletmeden, diğer 3'ü farklı işletmelerden gerçekleştirilmiştir. *mecC* MRSA'ların önemli kısmının (n=4) aynı işletmeden izole edilmesi, SCCmec elemanlarının duyarlı suşların kromozomlarına aktarılacak metisilin direncinin yayılması (Chambers 1997) olasılığı ile açıklanabileceği gibi, *mecC* MRSA suşlarının direkt bulaşması da ihtimal dahilindedir.

Diaz ve ark (2016), insan ve hayvanlarda *mecC* MRSA insidensinin yıldan yıla arttığını belirlemişlerdir. Benzer şekilde İngiltere'deki süt sığırcılığı işletmelerinde de insidens hızla arttığı rapor edilmiştir (Paterson ve ark 2014a).

Danimarka'da, 2010 yılında, insanlardan izole MRSA'lar içinde *mecC* MRSA oranının %1.9 olduğu, 2011 yılında oranın %2.8'e yükseldiği bildirilmiştir (Kumurya 2015). Bu çalışmada ortaya koyulan *mecC* MRSA oranı yüksek olmakla birlikte örnekleme yoğunluğunun ağırlıklı olarak 2013 ve 2015 yıllarını kapsamamasından dolayı yıllara göre insidensin durumunu sağlıklı şekilde ortaya koymak mümkün olmamaktadır.

mecC MRSA izolatlarının yol açtığı enfeksiyonlar ve tedavisi *mecA* MRSA'dan farklılık göstermemektedir. Ancak, MRSA teşhisinde, *mecA* genin tespitine yönelik kullanılan moleküler metotlar, *mecC* geni taşıyan izolatlar nedeniyle yanlış negatiflikler ile sonuçlanabilmektedir (Laurent ve ark 2012). Ayrıca, *mecA* geni tarafından kodlanan PBP2a'yı belirlemeye yönelik olarak hazırlanan ticari aglütinasyon testleri, *mecC* MRSA için yanlış negatif sonuç vermektedir. İzolatların çoğunluğu sefoksitine direnç gösterirken, oksasiline duyarlılık göstermekte ve hatalı olarak metisilin duyarlı olarak tiplendirilmektedir (Paterson ve ark 2014b). Metisilin dirençli suşların doğru teşhisi, uygun tedavi ve enfeksiyonların kontrol altına alınmasında önem arz etmektedir. Bu sebeple "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing" (EUCAST), 2013 yılında, *mecC* MRSA'nın identifikasyonuna yönelik bir protokol yayınlamıştır (Anonim 2016).

Öneriler

Sonuç olarak bu çalışma ile Türkiye'de mastitisli ineklerde *mecC* MRSA bulunma oranının beklenmedik şekilde yüksek olduğu belirlendi. MRSA identifikasyonunda standart metotların (*mecA* PZR ve PBP2a aglütinasyon testi) kullanıldığı laboratuvarlarda, *mecC* MRSA izolatlarının yanlış negatifliğe sebep olabileceği, dolayısıyla fenotipik olarak MRSA olduğu belirlenen izolatların *mecC* geni yönünden de analiz edilmesi gerektiği kanaatine varıldı.

Teşekkür

Bu çalışmanın bir bölümü, "II. International VETİstanbul Group Congress-Saint-Peterburg, Russia, 7-9 April 2015" de poster sunumu olarak yayınlanmıştır.

Kaynaklar

- Anonim 2016. www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf. Erişim tarihi; 06.01.2016.
- Ariza-Miguel J, Hernandez M, Fernandez-Natal I, Rodriguez-Lazaro D, 2014. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harboring *mecC* in livestock in Spain. J Clin Microbiol, 52, 4067-4069.
- Barraud O, Laurent F, Francois B, Bes M, Vignon P, Ploy MC, 2013. Severe human bone infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the novel *mecC*



- variant. *J Antimicrob Chemother*, 68, 2949-2950.
- Chambers HF, 1997. Methicillin resistance in *Staphylococci*: Molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev*, 10, 781-791.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement, document M100-S24. Wayne, PA.
- Cortimiglia C, Bianchini V, Franco A, Caprioli A, Battisti A, Colombo L, Stradiotto K, Vezzoli F, Luini M, 2015. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin resistant *S. aureus* in bulk tank milk from dairy goat farms in Northern Italy. *J Dairy Sci*, 98, 2307-2311.
- Cuny C, Leyer F, Strommenger B, Witte W, 2011. Rare occurrence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* CC130 with a novel *mecA* homologue in humans in Germany. *PLoS ONE*, 6, 243-260.
- 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.
- Diaz R, Ramalheira E, Afreixo V, Gago B, 2016. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the new *mecC* gene a meta-analysis. *Diagn Micr Infect Dis*, 84, 135-140.
- Eriksson J, Espinosa-Gongora C, Stamphoj I, Larsen AR, Guardabassi L, 2013. Carriage frequency, diversity and methicillin resistance of *Staphylococcus aureus* in Danish small ruminants. *Vet Microbiol*, 163, 110-115.
- Garcia-Alvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD, et al, 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.
- Garcia-Garrote F, Cercenado E, Marin M, Bal M, Trincado P, Corredoira J, et al, 2013. 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.
- Gindonis V, Taponen S, Myllyniemi AL, Pyorala S, Nykasenoja 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, 61-69.
- 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, 326-331.
- Grema HA, Geidam YA, Gadzama GB, Ameh JA, Suleiman A, 2015. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): A review. *Adv Anim Vet Sci*, 3, 79-98.
- Güler L, Ok Ü, Gündüz K, Gülcü Y, Hadimli HH, 2005. Antimicrobial susceptibility and coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis cases in Turkey. *J Dairy Sci*, 88, 3149-3154.
- Ito T, Hiramatsu K, Tomasz A, de Lencastre H, Perreten V et al, 2012. Guidelines for reporting novel *mecA* gene homologues. *Antimicrob Agents Chemother*, 56, 4997-4999.
- Kaynarca S, Türkyılmaz S, 2010. Sığır mastitislerinden izole edilen stafilocoklarda metisilin direnci ve slaym pozitifliği. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16, 567-572.
- Kılıç A, Doğan E, Kaya S, Baysallar M, 2015. Investigation of the presence of *mecC* and Panton-Valentine leukocidin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical specimens during seven years period. *Mikrobiyol Bul*, 49, 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. *Turk J Vet Anim Sci*, 29, 791-796.
- Kireççi E, Çolak A, 2002. Kuru dönem başlangıcında subklinik mastitisli ineklerden izole edilen stafilocok suşlarında metisilin direnci. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 8, 98-100.
- Kumurya AS, 2015. A potential diagnostic problem: The newly emerging *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *IOSR-JPBS*, 10, 84-93.
- 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.
- Loncaric I, Kubber-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.
- Medhus A, Sletteanea 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, 968-969.
- Mehrotra M, Wang G, Johnson WM, 2000. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J Clin Microbiol*, 38, 1032-1035.
- Paterson GK, Harrison EM, Holmes MA, 2014b. The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*, 22, 42-47.
- Paterson GK, Larsen AR, Robb A, Edwards GE, Pennycott TW, et al, 2012. The newly described *mecA* homologue, *mecALGA251*, is present in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a diverse range of host species. *J Antimicrob Chemother*, 67, 2809-2813.
- Paterson GK, Morgan FJE, Harrison EM, Peacock SJ, Parkhill J, Zadoks RN, Holmes MA, 2014a. Prevalence and properties of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bovine bulk tank milk in Great Britain. *J Antimicrob Chemother*, 69, 598-602.
- Pehlivanoglu 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, 849-855.
- Riffon R, Sayasith K, Khalil H, Dubreuil P, Drolet M, Lgace J, 2001. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *J Clin Microbiol*, 39, 2584-2589.





- Stegger M, Andersen PS, Kearns A, Pichon B, Holmes MA, Edwards G, et al, 2012. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecA* (LGA251). *Clin Microbiol Infect*, 18, 395-400.
- 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.
- Türütoğlu H, Erçelik S, Öztürk D, 2006. Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative Staphylococci isolated from bovine mastitis. *Bull Vet Inst Pulawy*, 50, 41-45.
- Uçan US, Aslan E, 2002. İnek mastitislerinden izole edilen koagülaz pozitif Stafilokok suşlarının penisilin direnci ve bazı antibiyotiklere duyarlılıkları. *Eurasian J Vet Sci*, 18, 19-22.
- Unnerstad HE, Bengtsson B, Horn af Rantzien M, Borjesson S, 2013. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing *mecC* in Swedish dairy cows. *Acta Vet Scand*, 31, 55-56.
- Vandendriessche S, Vanderhaeghen W, Soares FV, Hallin M, Catry B, Hermans K, Butaye P, Haesebrouck F, Struelens MJ, Denis O, 2013. Prevalence, risk factors and genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carried by humans and animals across livestock production sectors. *J Antimicrob Chemother*, 68, 1510-1516.
- Winn W, Allen S, Janda W, Koneman, E, Procop G, Srekenberger P, Woods G, 2006. Gram Positive Cocci, In: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, Ed; Darcy P, 6th edition, Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, pp; 623-671.