

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim DalıProgramı çerçevesinde tarafından
hazırlanan “.....” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora/Yüksek
Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:/...../.....

Üye (Tez Danışmanı):
.....
*(Ünvanı, Adı Soyadı)(Üniversite)(İmza)

Üye :
.....
*(Ünvanı, Adı Soyadı)(Üniversite)(İmza)

Üye :
.....
*(Ünvanı, Adı Soyadı)(Üniversite)(İmza)

Üye :
.....
*(Ünvanı, Adı Soyadı)(Üniversite)(İmza)

Üye :
.....
*(Ünvanı, Adı Soyadı)(Üniversite)(İmza)

ONAY:

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsününtarih vesayılı oturumunda alınannolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam süresince destek ve yardımlarını gördüğüm Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Şükrü KIRKAN'a, ayrıca ilgi ve yardımlarından dolayı danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Uğur PARIN'a, Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri ve Araştırma Görevlilerine teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Tarihçe	3
2.2. Etiyoloji	4
2.3. Morfoloji ve Kimyasal Özellikler	6
2.3.1. Hücre Duvarı	6
2.3.1.1. Kapsül	7
2.3.1.2. Yüzey Proteinleri	7
2.3.1.3. Teikoik Asit	7
2.3.1.4. Peptidoglikan	8
2.3.1.5. Stoplazmik Membran	8
2.3.2. Enzimler	8
2.3.2.1. Katalaz	8
2.3.2.2. Koagulaz	9
2.3.2.3. Lipaz	9
2.3.2.4. Hiyalüronidaz	9
2.3.2.5. Deoksiribonükleaz	9
2.3.2.6. Fibrinolizin	10
2.3.2.7. Nükleaz	10
2.3.2.8. Laktamaz	10
2.3.2.9. Penisilinaz	10
2.3.3. Toksinler	11
2.3.3.1. Hemolizin Toksinler	11

2.3.3.1.1. Alfa-Hemolizin Toksin	12
2.3.3.1.2. Beta-Hemolizin Toksin	12
2.3.3.1.3. Delta Hemolizin Toksin	12
2.3.3.1.4. Gama Hemolizin Toksin	12
2.3.3.2. Lökosidin	12
2.3.3.3. Eksfoliyatif Toksin	13
2.3.3.4. PTSAg Ekzotoksin Familyası	13
2.3.3.4.1. Stafilokokkal Enterotoksiler A-E	13
2.3.3.4.2. Toksik Şok Sendromu Toksini - 1 (TSST-1)	13
2.4. Taksonomi	13
2.5. Epidemiyoloji	16
2.6. Virulans Faktörleri	17
2.6.1. Toksisite	17
2.6.2. Patojenite	18
2.6.3. İnvazivite	19
2.6.4. İnfektivite	20
2.7. İdentifikasyon	22
2.7.1. Genel Stafilokok İdentifikasyon Yöntemleri	22
2.7.1.1. Katalaz Testi	22
2.7.1.2. Koagülaz Testi	22
2.7.1.3. Lam Koagülaz Testi	23
2.7.1.4. Tüp Koagülaz Testi	24
2.7.1.5. Mannitol Fermantasyonu	23
2.7.1.6. Basitirin Direnci	24
2.7.1.7. Novobiosin Direnci	25
2.7.1.8. Glukoz Fermantasyonu.....	25
2.7.1.9. Dizi ve Amplifikasyon Analizi	25
2.7.1.10. Lateks Aglütinasyonu	26
2.7.1.11. Pasif Hemoaglütinasyon	26
2.7.2. <i>S. aureus</i> İdentifikasyon Yöntemleri	26
2.7.2.1. Deoksiribonükleaz (DNAaz) Testi	26
2.7.2.2. Termonükleaz Testi	27
2.7.2.3. Mannitol Testi	27
2.8. Enterotoksinler	30

2.8.1. Genel Bilgiler	30
2.8.2. Stafilokokkal Enterotoksinler	31
2.8.2.1. Stafilokokkal Enterotoksin A (SEA)	33
2.8.2.2. Stafilokokkal Enterotoksin B (SEB)	34
2.8.2.3. Stafilokokkal Enterotoksin C (SEC)	35
2.8.2.4. Stafilokokkal Enterotoksin D (SED)	36
2.8.2.5. Stafilokokkal Enterotoksin E (SEE)	36
2.8.2.6. Stafilokokkal Enterotoksin G (SEG)	37
2.8.2.7. Stafilokokkal Enterotoksin H (SEH)	37
2.8.2.8. Stafilokokkal Enterotoksin I (SEI)	37
2.8.2.9. Stafilokokkal Enterotoksin J (SEJ)	37
2.8.2.10. Stafilokokkal Enterotoksin K (SEK)	37
2.8.3. Enterotoksin Oluşumuna Etki Eden Etkenler	38
2.8.3.1. Ekstrasellüler Etkenler	38
2.8.3.1.1. Besin Maddeleri	38
2.8.3.2.1. Sıcaklık	38
2.8.3.1.3. pH Değeri	38
2.8.3.1.4. Atmosferik Koşullar	39
2.8.3.1.5. NaCl ve Su Aktivitesi	39
2.8.3.1.6. Diğer Kimyasallar	39
2.8.3.1.7. Rekabetçi Özellik	40
2.8.4. Epidemiyoloji	40
2.8.5. Toksin Teşhis Yöntemleri	40
2.8.5.1. ELISA	41
2.8.5.2. RIA	43
2.8.5.3. PCR	43
2.8.5.3.1. Nested-PCR	43
2.8.5.3.2. Real-Time PCR	44
2.8.5.3.3. Multiplex PCR	44
2.8.5.3.4. Reverse-Transkriptaz PCR	45
2.8.5.3.5. Touch Down PCR	45
2.8.5.3.6. Solid Phase PCR	45
2.8.5.3.7. Asimetrik PCR	46
3. GEREÇ VE YÖNTEM	47

3.1. Gereç	47
3.1.1. Araştırma Materyali	47
3.1.2. Besiyerleri	50
3.1.2.1. Baird Parker Medium (BPM) (Oxoid® CM275)	50
3.1.2.2. Mannitol Salt Agar (Merck® 105404)	50
3.1.2.3. DNase Test Agar (Merck® 110449)	51
3.1.2.4. Ringer Tablet (Merck® 1.15525.0001)	51
3.1.3. Besiyeri Suplementi	51
3.1.3.1. Egg Yolk –Tellurite Emulsion % 20 (Merck 1.03785.0001)	51
3.1.4. Ayraçlar	52
3.1.4.1. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) (Merck 1.08597.1000)	52
3.1.4.2. Bactident® Coagulase (Merck 1.13306.0001)	52
3.1.5. ELISA Test Kiti	52
3.1.5.1. Ridascreen® SET Total (R-Biopharm, Germany, Art. No:R4105)	52
3.1.6. Pozitif Kontrol	52
3.2. Yöntem	53
3.2.1. Çiğ Süt Örneklerinden <i>S. aureus</i> İzolasyonu	53
3.2.1.1. Gram Boyama	53
3.2.1.2. DNAaz Testi	53
3.2.1.3. Katalaz Testi	54
3.2.1.4. Mannitol Fermentasyonu	54
3.2.1.5. Lam Koagulaz Testi	54
3.3. ELISA	54
4. BULGULAR	57
5. TARTIŞMA	62
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	66
KAYNAKLAR.....	67
ÖZGEÇMİŞ.....	76

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat Derece
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
SE	: Stafilokkal enterotoksin
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EIA	: Enzyme Immuno-Assay
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EM	: Eritema Migrans
IFA	: Indirect Immunofluorescence Assay
IgM	: İmmunglobülin M
IHA	: Indirect Hemagglutination Assay
IM	: Inner Membran
Kg	: Kilogram
LPS	: Lipopolisakkarit
Mg	: Miligram
MNL	: Mononükleer Lenfosit
OM	: Outer Membrane
Osp	: Outer surface protein
P	: Protein
PCR	: Polimeraze Chain Reaction
RNA	: Ribonükleik Asit
TMB	:Tetramethylbenzidine
TGK	:Türk Gıda Kodeksi
CIP	:Clean in Place

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Gram (+) Bakteri Hücre Duvarı	7
Şekil 2. Toksin Teşhis Karar Ağacı	31
Şekil 3. Toksik Şok Sendromu Toksini (TSST-1)	32
Şekil 4. Stafilokokkal enterotoksin A	34
Şekil 5. Stafilokokkal enterotoksin B	35
Şekil 6. Stafilokokkal enterotoksin C3	36
Şekil 7. ELISA uygulama basamakları	42

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Stafilokokların Soy Ağacı	14
Tablo 2. Stafilokokların tür ve alt türleri	14
Tablo 3. Stafilokok konakçıları ve sebep oldukları hastalıklar	22
Tablo 4. Stafilokoklarda İdentifikasyon Şeması	28
Tablo 5. <i>S. aureus</i> için üreme ve toksin üretme koşulları	38
Tablo 6. Svap numunelerinin toplandığı yerler	47
Tablo 7. Süt numunelerinin toplandığı yerler	48
Tablo 8. Svap numunelerinden izole edilen <i>S. aureus</i> sayıları	58
Tablo 9. Süt numunelerinden izole edilen <i>S. aureus</i> sayıları ve Stafilokkal enterotoksin varlığı	59

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. ELISA kit içeriği	55
Resim 2. Otomatize Mikropleyt Yıkama Cihazı	56
Resim 3. ELISA Mikropleyt Okuyucu Cihaz	56
Resim 4. ELISA reaksiyonunda kullanılan mikropleyt	56
Resim 5. Svap numunelerinden izole edilen <i>S. aureus</i> kolonileri	57
Resim 6. Süt numunelerinden izole edilen <i>S. aureus</i> kolonileri	57

ÖZET

AYDIN BÖLGESİNDE ÜRÜNE İŞLENECEK ÇİĞ SÜTLERDE STAPHYLOCOCCUS AUREUS VE ENTEROTOKSİN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

**Günday H. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2017.**

Araştırmamızda, Aydın ilindeki farklı üretim tesislerinde çeşitli noktalardan örneklerinde *Staphylococcus aureus* izolasyonu ve ürüne işlenecek olan çiğ süt örneklerinde *S. aureus* ve enterotoksinlerin varlığı ELISA metodu ile tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla 2017 yılı Mayıs ayında Aydın ilinde bulunan çiğ süt ürünü işleyen tesislerden toplam 28 adet svap numunesi ve 86 adet çiğ süt örneği, *S. aureus* sayıları ve stafilokokkal enterotoksin (SETA, B, C, D, E Total) varlığı yönünden incelenmiştir. Analizi yapılan çiğ süt örneklerinde *S. aureus* sayımı TSE 6582 ISO 6888 standardı çerçevesinde gerçekleştirilmiştir. Analizler sonucunda incelenen 86 adet çiğ süt örneğinin tamamının *S. aureus* sayısı yönünden Türk Gıda Kodeksi, 2009/14 Tebliğ numaralı, Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliğinde Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliğ'e uygun olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada stafilokokkal enterotoksin varlığının saptanması amacıyla ELISA yöntemi kullanılmıştır. Test sonucunda 86 adet çiğ süt örneğinin hiçbirinde stafilokokkal enterotoksin varlığı belirlenmemiştir. Sonuç olarak incelenen çiğ sütlerde enterotoksin tespit edilmemiş olmakla birlikte süt işleme tesislerinin çeşitli noktalarından alınan numunelerde *S. aureus* varlığı saptanmasıyla, halk sağlığının risk altında olduğu gösterilmiştir. Bu sebepten süt işleme tesislerinde üretim hijyeni, temizlik ve dezenfeksiyon protokolleri ve personelin bilgilendirilmesi konularına önem verilmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Çiğ Süt, *Staphylococcus aureus*, Stafilokokkal Enterotoksin, ELISA, identifikasyon.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AND ENTEROTOXIN PRESENCE IN RAW MILK OF PRODUCTION IN AYDIN REGION

Günday H. Adnan Menderes University Institute of Health Sciences Department of Microbiology, Master Thesis, Aydın, 2017.

The purpose of this study is the investigation of the presence of *Staphylococcus aureus* and enterotoxin in raw milk for production found in different enterprises of Aydın province. For this reason we examined 28 swab samples taken from different points and 86 raw milk samples for *S. aureus* count and staphylococcal enterotoxins (SETA, B, C, D, E Total). *S. aureus* analyses in raw milk samples were conducted within the framework of TSE 6582 ISO 6888 standard. According to Turkish Food Codex (Number: 2009/14), all of the samples of 86 total raw milk examined were determined to be appropriate in terms of *S. aureus* count. *S. aureus* analyses in raw milk samples were conducted within the framework of TSE 6582 ISO 6888 standard In this study ELISA test used for the presence of staphylococcal enterotoxins. The result of test, neither of 96 raw milk samples was contaminated with staphylococcal enterotoxin. As a result, it has been shown that enterotoxin was not detected in the raw milk examined but the presence of *S. aureus* in samples taken from various points of milk processing plants showed that public health is at risk. Therefore, it is necessary to give importance to production hygiene, cleaning and disinfection protocols and informing the personnel at milk processing plants.

Key words: Raw milk, *Staphylococcus aureus*, Staphylococcal enterotoxin, ELISA, identification.

1. GİRİŞ

Stafilokokların, 1800'lü yılların ortalarında Louis Pasteur'un yaptığı araştırmalarla başlayan, İskoç cerrah Sir Alexander Ogston'un mikroskopta ilk kez görüntülemesiyle Şekil alan serüvenleri günümüz mikrobiyolojisine ışık tutar niteliktedir. *Micrococcaceae* familyasında yer alan stafilokoklar doğada yaygın olarak birçok Şekilde toprakta, suda, havada ve bitkilerde bulunurlar. Ayrıca en önemli suşlarından olan *Staphylococcus aureus* da dahil olmak üzere birçok türü, insanların üst solunum yolları ve deri mikroflorasında bulunurlar. Stafilokoklar hem hastane infeksiyonlarında hem de gıda sektöründe epidemi yapabilme özellikleri bulunduğundan halk sağığı açısından önemli mikroorganizmalardır. Yüksek toksisiteli enterotoksin sentezleyerek gastrointestinal sistem üzerine etkili olan insanlar için potansiyel patojen özelliğı taşıyan *S. aureus* *genusun* en önemli suşudur (Normanno ve ark 2007).

Stafilokokkal gıda zehirlenmeleri, enterotoksijenik stafilokok türlerinin gıdalarda üremeleri sırasında sentezledikleri, gastrointestinal sistemler üzerine etkili olan enterotoksinlerin meydana getirdiğı gıda kaynaklı intoksikasyonlardır. Fakat tüm türler gıdalarda enterotoksijenik özelliğı sahip değıildir. Örneğın türün en önemli suşu olan *S. aureus* suşlarının sadece % 6.25'lik kısmı enterotoksijenik özelliğı sahiptir (Bergdoll 1991).

Türkiye'de gıda zehirlenmeleri ile ilgili resmi raporlar bulunmamasına karşılık; çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalar, gıda zehirlenme olaylarının yaklaşık 1/3'ünün *genusun* önemli türlerinden olan *S. aureus*'lar ile kontamine gıdalardan kaynaklandığını ortaya koymaktadır (Mutluer 1993). Gıda kaynaklı mikrobiyolojik hastalıklar içinde *S. aureus* zehirlenme oranının Macaristan'da % 40, ABD'de % 45 ve Japonya'da % 25-30 olduğı bildirilmiştir (Nakazawa 1992).

Özellikle süt ve süt ürünleri kaynaklı stafilokokkal gıda zehirlenmelerinin oranı ülkelerin beslenme alışkanlıklarına göre farklılık göstermektedir. Le Loir (2003)'in vardığı bu sonuç, İngiltere'de 1969, 1990 yılları arasında süt ve süt ürünleri kaynaklı zehirlenmelerinin % 8 'lik, ABD'de 1975, 1982 yılları arası süt ve süt ürünleri kaynaklı gıda zehirlenmelerinin % 1.4, Fransa'da 1999, 2000 yılları arası peynir başta olmak üzere süt ve süt ürünleri kaynaklı gıda zehirlenmelerinin %32 oranında Stafilokokların sebep olduğı zehirlenmeler olmasıyla desteklenmiştir. Çeşitli ülkelerde rastlanma sıklığı coğrafi koşullara ve beslenme alışkanlıklarına göre değıişim gösterse de ortak kanı başta sağılık

sektörü olmak üzere sanayi alanında ekonomik kayıplarla devam eden birçok zarara neden olmaktadır (Küplülü ve ark 2002).

Sağlık sektöründe başta gıda zehirlenmelerine yol açan *S. aureus*, ikinci veya üçüncü patojen olarak bilinmektedir (Atanassova 2001). ABD’de her yıl 6-80 milyon insan bu patojenden etkilendiği tespit edilmiş ve bu vakaların 9000’inin ölümle sonuçlandığı tespit edilmiştir (Buzby 1997, Le Loir ve ark 2003).

ABD’de etkinin ekonomik boyutları ise yine yıllık 5 milyar dolar olarak bildirilmiştir. Araştırmalarla bunlara ek olarak üretim kaybı ve medikal masraflarla 1.5 milyar dolar harcama yapıldığı görülmüştür (Todd 1989). Yine ABD’de, çikolatalı sütlerde tespit edilen stafilokkal enterotoksin A'nın, 850 çocuğun zehirlenmesine yol açtığı tespit edilmiştir (Evenson 1988).

Halk arasında çoğu insan, günlük yaşamda ve dengeli beslenmek amacı ile süt ve süt ürünlerini tercih etmeleri, aynı zamanda süt ve süt ürünlerinin gelişme çağında olan çocuklar tarafından daha çok tüketilmesi, süt ve süt ürünlerinde bulunan *Staphylococcus aureus* ve enterotoksinlerinin varlığının tespitini halk sağlığı açısından oldukça önemli kılmaktadır. Süt ve mandıra ürünlerindeki enterotoksin çok düşük konsantrasyonlarda olsa bile (0.5-0.75 ng/ml) gıda zehirlenmesine yol açabilmektedir. Araştırmamızda, Aydın ilindeki farklı üretim tesislerinde çeşitli noktalardan örneklerinde *S. aureus* izolasyonu ve ürüne işlenecek olan çiğ süt örneklerinde *S. aureus* ve enterotoksinlerin varlığı ELISA metodu ile tespit edilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

1860 yılında Louis Pasteur'un yara infeksiyonları üzerine yaptığı çalışmalardan etkilenen Joseph Lister, ameliyat sonrası infeksiyonların önlenmesi için yara ve cerrahi dokular üzerine doğrudan karbolik asit uygulaması yapmıştır. Fakat yara ve cerrahi dokularda infeksiyonlara sebep olan ve üzüme benzediği için (Latince, staphyle) “stafilokoklar” olarak adlandırılan mikroorganizmalar, mikroskopta ilk kez 1881 yılında İskoç cerrah Sir Alexander Ogston tarafından görülmüştür (Waldvogel ve ark 2000). 1984 yılında, saf kültürde altın renkli (*S aureus*) ve beyaz (*Staphylococcus albus*) renkli iki stafilokokus kolonisini Alman bilim adamı Anton Rosenberg tarafından gözlemlemiştir. Bakteriler ve diğer patojen mikroorganizmalarla oluşan infeksiyonların önlenmesi ve tedavisinde kullanılan etkili ajanların keşfi modern tıbbın ve veteriner hekimliğin en önemli gelişmelerinden biri olmakla birlikte, anti enfektif potansiyele sahip maddeler aslında binlerce yıldır kullanılmıştır. Arsenik ve bizmut gibi ağır metaller 1900’lu yıllarda sifiliz dahil bazı infeksiyonların tedavisinde kullanılmıştır (Cengiz 1999).

1930’lu yıllarda, günümüzde de hastanelerdeki yara infeksiyonlarının başlıca sebeplerinden olan *S. aureus*'un, plazmayı koagüle eden koagülaz enzim testi keşfedilmiştir. 1941 yılında Boston Hastanesinde yapılan bir araştırmaya göre *S. aureus*'un öldürücü etkisi % 81 olarak bildirilmiştir. Aynı sene içerisinde İngiliz Polis Memuru, *S. aureus*'a bağlı olarak ciddi bir şekilde hastalanmış, penisilin ile tedavi edilmiştir. 1940’lı yılların başında, benzil-penisilin, antiseptik ve aseptik protokollere karşı ne kadar etkin bir çözüm olarak görülmüş olsa da takip eden yıllarda *S. aureus* ve suşlarının penisilinaz enzimi üretmeye başlamasıyla penisilin direnci yüksek stafilokoklar türemeye başlamıştır. Bakterinin Kraus ve Clairmont tarafından 1900’da alfa toksini, Glenny ve Stevens tarafından 1935’te β toksini bulunmuştur. Winslow 1920 yılında, Stafilokokları, Micrococcacea familyasına dahil etmiştir. Smith ve Price 1938’de gama toksin ve Williams ile Harper 1947’de delta toksin varlığını açıklamışlardır. Evans’ın glikozu anaerobik fermente edebilme yeteneklerini 1957 yılında belirlemesi ile *Staphylococcus* cinsinde ayrı bir soy olarak sınıflandırılmıştır. Takip eden yıllarda Winslow ve Winslow tarafından ikinci tür olan *Staphylococcus epidermidis* öne sürülmüştür. *S. aureus* 1972’ye kadar bilinen tek türdür ve *S. epidermidis* ile arasındaki temel fark, koagülaz üretimine

dayanmaktadır. Stafilocoklar, 1957 yılında mannitolün aerobik kullanımı ve koagulaz oluşturma yeteneklerine bakılarak *S. aureus* ve *S. epidermidis* olarak iki tür olarak tanımlanmıştır. 1959 yılında nümerik taksonominin kullanıma girmesiyle KNS homojen bir grup olmasına karşın, KNS'lerin heterojen bir grup olduğu saptanmıştır. Todd ve arkadaşları tarafından 1978'de yeni bir hastalık olarak “*Toksik Şok Sendromunu*” tanımlanmıştır (Akçam ve ark 2007). Aynı tarihlerde tetrasiklin, kloramfenikol ve eritromisine karşı çoklu direnç gösteren *S. aureus* suşları bildirilmiştir. KNS türleri ilk defa Baird-Parker bir şema ile tanımlamıştır. İlk semisentetik penisilinaza dirençli antimikrobiyal ajan olan metisilin 1959 yılında klinik kullanıma girmiştir. Bundan iki yıl sonra, 1961 yılında, insanlarda ilk metisiline dirençli *S. aureus* izolatlarının varlığı İngiltere’de bildirilmiştir. 1965’de “Subcommittee on the Taxonomy of Staphylococci and Micrococci ” tarafından *Micrococcus saprophyticus*, daha sonra 1971’de yine aynı komite tarafından DNA ve hücre duvarı içeriğindeki farklılık ve anaerobik koşullarda daha yavaş üremesi gibi ayrıcalıklar nedeniyle *Staphylococcus saprophyticus* olarak yeniden tanımlanmıştır (Bergdoll 1991).

Hayvanlarda ise ilk MRSA izolatı 1972 yılında mastitisli sığırlardan izole edilirken, bunu 1988 yılında kedi ve 1989 yılında köpek izolatları izlemiştir. Daha sonra dünyanın pek çok yerinde izolat sayısının artması ile MRSA infeksiyonlarının hayvanlarda da önemli bir problem olmaya başladığı görülmüştür (Leonard ve Markey 2008).

Üçüncü tür olan *S. saprophyticus* 1974’te Stafilocoklara eklenmiştir. Baird ve Parker 1974 yılında stafilocokları, *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* olmak üzere üç türe ayırmıştır. Tür sayısı 1980’de 13 ve 4, 1984’de ise 20 olmuştur. *S. intermedius* ve *S. hyicus* hariç yeni türlerin tamamı koagulaz negatiftir (Patrick 1990).

2.2. Etiyoloji

Stafilocok cinsi, gram pozitif, 0.5-1.5 µm çapında, spor oluşturmeyen, hareketsiz, fakültatif anaerobik (*S. saccharolyticus* hariç), katalaz pozitif (*S. saccharolyticus*, *S. subsp. anaerobius* hariç), ve kemorganotrofik bakterilerdir. İsimlerini Yunancada üzüm salkımı anlamına gelen *staphy*, yuvarlak granül anlamına gelen *koko*’dan almaktadırlar (Holt ve ark 2005).

1800’lü yılların ortalarında keşfedilen stafilocoklar, sayıları günden güne keşfedilen yeni suşlarla artmakta olup, günümüzde cins içerisinde 40 tür ve 28 alt türden

oluşmaktadır. Stafilocok genusu, insan ve hayvan derisinde, üst solunum yolu ve alt ürogenital sistem mukoz membranlarında bolca bulunmaktadır. Dışarıdan gıda yoluyla alımlarında sindirim kanallarına yerleşerek izole edilebilir bir hal alırlar. Suşların geneli çevre koşullarına gösterdikleri direnç dolayısıyla uzun süre canlılıklarını korurlar. Özellikle organik materyaldeki konaklarda, 2, 3 aydan daha fazla canlılıklarını sürdürebilirler (Holt ve ark 2005). Sporsuz bakteriler içerisinde dış etkenlere ve dezenfektanlara karşı en fazla dayanabilen bakterilerdir.

Stafilocoklar, mezofil mikroorganizmalardır. Optimum üreme sıcaklıkları 30-37 °C arasında olup 10–42 °C’de üremeyi sürdürebilmektedirler. Patojen özellikteki cinsin en önemli üyesi olan *S. aureus*, optimum üreme sıcaklığı 37 °C, toksin oluşturabilme optimum aralığı ise 40-45 °C olarak tespit edilmiştir (Erol 2003). Ayrıca bazı türler 60 °C sıcaklığa 30 dk dayanarak canlılıklarını sürdürebilmektedirler. Halofilik mikroorganizma olmamalarına karşın tuz içeriği %7,5 olan ortama karşı direnç gösterebilir ve %10 içerikte de üreme faaliyeti gösterebilmektedirler. Erol (2003) yaptığı bir araştırmada, *S. aureus*’un, 0-20 tuz içeriğinde üreyebildiğini, 0-10 içerikte de toksin üretebilmekte olduğunu bulmuştur.

Gıda maddelerinde üreyerek 10⁶ kob/g sınır değerine ulaşmalarıyla toksijenik faaliyet gösterirler (Bergdoll 1991) Bu değere ulaşmak için ise yüksek nem içerikli ortamlara ihtiyaç duyarlar. Bu nem değer aralığı yaygın tür *S. aureus* için 0.83 A_w alt limittir. Aynı türün toksin sentezleyebilme spektrumunu ise 0.86-0.99 A_w değerindedir (Erol 2003).

Stafilocoklar kültür ortamlarında çok hızlı üreyen mikroorganizmalardır. Üremeleri için temel besiyerleri yeterlidir. Katı ve sıvı besiyerlerinde bir gecelik inkübasyonda yoğun olarak ürerler. Suş, petri kabında, 2-4 mm’lik, S tipli, kenarları düzgün, yuvarlak ve parlak koloniler oluştururlar. Kanlı agarda ürediklerinde birçok patojen tür hemoliz oluşturur ve CO₂ hemoliz oluşumunu artırır. Sıvı ortamlarda ise, homojen bulanıklık yaparak ürerler ve üreme süresi arttıkça bulanıklık düzeyi artar dipte tortu oluşur. Mikroskop altında, katı besiyerlerinde üzüm salkımı, çalkalanmış sıvı besiyerlerinde tek tek kok halinde gözlemlenebilmektedirler (Akan ve ark 2013).

Suşların, kimyasal maddelere olan duyarlılıkları ilk olarak penisilin bulduğu yıllarda araştırılmaya başlanmıştır. Keşfin ilk yıllarında tüm suşlar penisiline duyarlı iken, 1960’lı yılların başında %50’si, 1970 yıllara gelindiğinde ise %90 düzeyinde penisiline direnç geliştirmişlerdir. Bu direncin, stafilocoklardan salınan ve genellikle plazmidle

kodlanan penisilinaz (β -laktamaz) enzimi nedeniyle oluştuğu savunulmaktadır (Holt ve ark 2005).

Laktobasillus türü tarafından üretilen veya gıdalara ilave edilen peroksit *S. aureus*'un gelişimini inhibe edebilmektedir. Yine *S. aureus* üzerinde 1000 ppm iodinun öldürücü (Sheldrake ve ark 1980) ve laktik asidin ise enterotoksin sentezini inhibe edici (Domenech ve ark,1992) özelliği taşıdığını saptamışlardır.

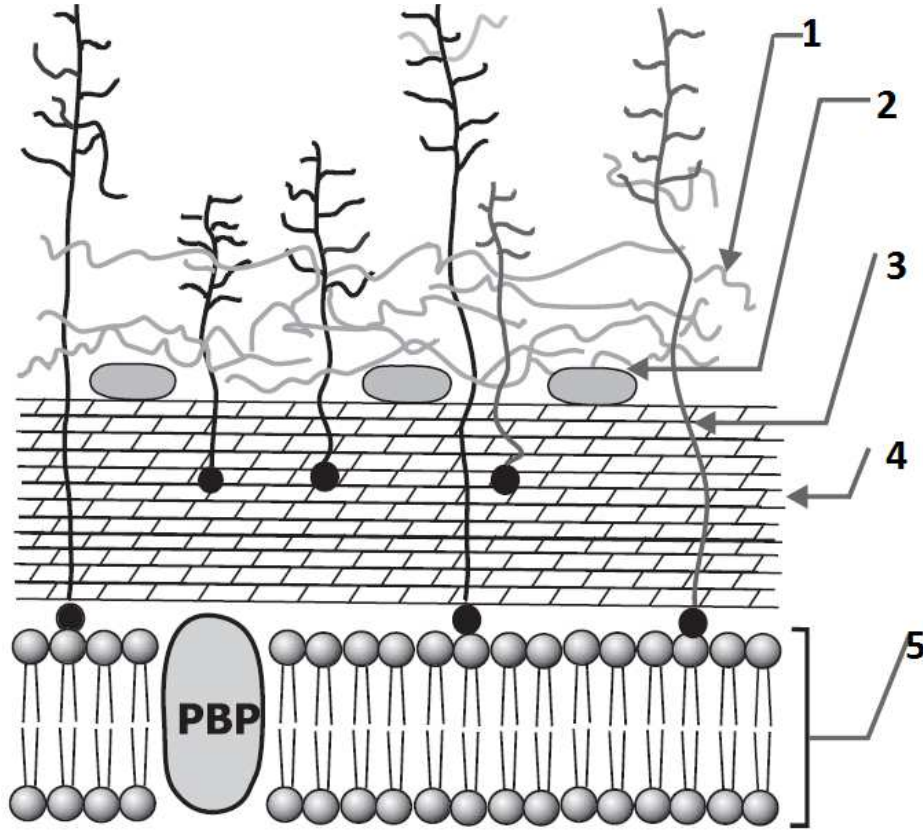
Yapılan araştırmalar göre stafilokoklar, ekstrasellüler koşul zorluklarına dirençli bakteriler olarak görünmelerine rağmen kendileriyle benzerlik gösteren yapılara karşı direnç gösteremeyen bir özellik sahip oldukları tespit edilmiştir. Bu rekabete dayanıksız halleri, Haines, 1973'te sıvı besiyerinde *Pediococcus cerevisiae* kullanarak *S. aureus* suşu arasındaki etkileşimi incelemiş, inceleme sonucunda *S. aureus* orjinli toksinlerin %95 azalma gösterdiğini tespit etmiştir (Erol ve İşeri 2004).

Salamura beyaz peynir yapımında kullanımı sağlanan starter kültür popülasyonunda bulunan *Streptococcus lactis* ve *Streptococcus cremoris* türlerinin, tüm aşamalar ve belirli süredeki raf ömründe *S. aureus* gelişimini ve toksijenik özelliğini tamamen inhibe ettiği saptanmıştır (Mutluer ve ark 1993). Benzer şekilde, Gonzalez ve ark (1994), sektörde kullanılan içerisinde *Lactobacillus sake*, *Pediococcus pentosaceus* ve *S. xylosus* bulunduran starter kültür kullanımında toksijenik stafilokok sekonder metabolitlerin varlığına rastlanamadığını bildirmiştir.

2.3. Morfoloji ve Kimyasal Özellikler

2.3.1. Hücre Duvarı

Genel olarak Gram (+) bakterilerin sahip olduğu hücre duvarı, aynı zamanda tipik bir stafilokok hücre duvarını temsil etmekte ve Şekil 1'de gösterilmektedir.



Şekil 1. Gram (+) Bakteri Hücre Duvarı

2.3.1.1. Kapsül

Bazı *S. aureus* kökenlerinde en dışta polisakkarid bir kapsül yapısı bulunur. PK (-) stafilokoklarda ise glikokaliks bir yapı salgılanır. “Slime” faktör adı da verilen bu yapı kateter başta olmak üzere yabancı cisimlere tutunmayı ve antibiyotik etkisinden organizmayı korumayı sağlar (Balaban ve Avraham, 2000).

2.3.1.2. Yüzey Proteinleri

Protein A, sadece *S. aureus*'da bulunur. Ig'lerin Fc reseptörlerine bağlanarak bakteriyi fagositozdan ve kompleman etkisinden korur (Nagaraja ve Nagaraju 2013).

2.3.1.3. Teikoik Asit

Özgül reseptörler (*fibronektin*) yardımıyla hücreye yapışmayı sağlar. Fajlar için reseptör görevi görür. Teikoik asit türe özgü farklılıklar gösterir. (*S. aureus* ribitol teikoik asit, *S epidermidis*'te gliserol teikoik asit taşır) (Balaban ve Avraham 2000).

2.3.1.4. Peptidoglikan

Satifilokoklar hücre duvarı yapısı tipik gram pozitif mikroorganizma yapısında olup kalındır (30-60 nm). *S. aureus*'un hücre duvarı kalınlığı 120 nm'nin üzerine de çıkabilir. Hücre duvarı peptidoglikan, teikoik asit ve proteinlerden oluşmuştur. Gram (-) hücre duvarının aksine Gram (+) hücre duvarı bileşiminde Lipopolisakkarid değeri 0 ve protein içeriği oranı %0 olarak saptanmıştır. Bu komponentlerden proteinler ökaryotik hücrelere bağlanma ve adezyon için önemli fibronektin, fibrinojen, laminin ve kollajen içerirler. Adezyon proteinlerinin bağlanması ile dokulara bakteriyel tutunma mekanizması gerçekleşmiş olur. Antijenik proteinlerden en çok çalışılmış olanı Protein A'dır ve *S. aureus* suşlarının % 90-98'inde mevcuttur (Balaban ve Avraham 2000).

2.3.1.5. Stoplazmik Membran

Membranöz matrix, solunum enzimlerini ve hücre duvarı sentezinden sorumlu enzimleri içerir (penisilin bağlayıcı proteinleri PBP, transpeptidaz, karboksipeptidaz gibi) (Balaban ve Avraham 2000).

2.3.2. Enzimler

Koagülaz (*S. aureus*'da bulunur, *protrombin* ile bağlanarak plazmayı koagüle eder), katalaz, lipaz, stafilokinaz (*fibrinolizin*), DNAaz, lipaz enzimleri ile klinik bulgulara yol açar. Hyalüronidaz ile yayılma gösterir. Penisilinaz hücre dışına salınarak penisilini hidrolize eder (Penisilinaz bir virulans faktörü değildir). Stafilokoklar lipaz, hiyaluronidaz, fibrinolizin, penisilinaz, katalaz, koagulaz ve DNAaz gibi birçok enzim üretirler. Bu enzimler özellikle stafilokokların komşu dokulara yayılımını kolaylaştırarak infeksiyon patogeneğinde rol alırlar (Balaban ve Avraham 2000).

2.3.2.1. Katalaz

Tüm stafilokok türleri toksik hidrojen peroksidi toksik olmayan oksijen ve suya ayırıştırıcı katalaz enzimi üretir. Bakteriler, bu enzim sayesinde fagositlerin içinde toksik oksijen radikalleri tarafından öldürülmeye direnç kazanır. Hemoprotein yapısındadır. Süperoksit dismutaz ve indirgenmiş flavoproteinlerin oksitlenmesi sırasında bakteri hücresi

içerisinde açığa çıkan toksik hidrojen peroksiti su ve oksijene katalize eder (Dinges ve ark 2000).

2.3.2.2. Koagulaz

Stafilokoklar bağlı ve serbest olmak üzere 2 tip koagulaza sahiptir. Ekstraselluler bir proenzimdir. Stafilokok hücre duvarına bağlı koagulaz doğrudan fibrinojeni fibrine dönüştürebilir ve stafilokoklarda kümelenmeye sebep olur. Serbest koagulaz ise bir plazma globulin faktörü (coagulase reacting factor) ile reaksiyona girerek bir trombin benzeri faktör (staphylothrombin) oluşturur. Bu faktör fibrinojeni fibrine dönüştürerek bağlı koagulazla aynı sonucu oluşturur. Koagulaz, stafilokok absesinin çevresinde fibrin oluşumuna sebep olur ve böylece infeksiyon lokalize edilerek organizma fagositozdan korunur. Stafilokokların başka türleri de koagulaz üretebilir fakat bunlar genellikle hayvan patojenleridir ve nadiren insan infeksiyonuna neden olurlar. Koagulaz pozitif stafilokokların üzerinde oluşan kalın fibrin tabakasının, mikroorganizmayı fagositoza karşı koruyarak, patojenliğe katkı sağladığı ileri sürülmektedir (Dinges ve ark 2000).

2.3.2.3. Lipaz

S. aureus'un tüm suşları ve *Koagulaz Negatif Stafilokoklar*'ın % 30'undan daha fazlası birkaç farklı lipaz üretirler (Cauwelier ve ark 2004). Lipaz, yağları hidrolize ederek vücudun lipid içeren bölgelerinde stafilokokların yaşamasını sağlamakta ve stafilokokların yüzeysel dokuları invaze ederek frunkül ve karbonkül gibi infeksiyonlarının gelişimine neden olmaktadır (Akan ve ark 2013).

2.3.2.4. Hiyalüronidaz

S. aureus'ların % 90'dan fazlası tarafından üretilir. *S. aureus*'un dokulara yayılımını kolaylaştırır (Cauwelier ve ark 2004). Bağ dokusunun aseluler matriksindeki asit mukopolisakkaridler olan hiyaluronik asidi hidrolize eden enzimlerdir (Akan ve ark 2013).

2.3.2.5. Deoksiribonükleaz

DNAaz enzimleri endo ve ekzonükleaz aktivitesine sahip, nukleik asitleri 3-fosfomononükleotidlere parçalayan fosfodiesterazlardır (Akan ve ark 2013).

2.3.2.6. Fibrinolizin

Stafilokinaz olarak da adlandırılan bu enzim, *S. aureus* suşlarının neredeyse tamamı tarafından üretilir. Fibrin pıhtısını çözer (Ameh ve ark 1999).

2.3.2.7. Nükleaz

Diğer bazı türler de bu enzimi üretiyor olmasına rağmen, termostabil nükleaz enzimi, *S. aureus* için önemli bir markerdir. Bu enzimin infeksiyon patogenezindeki fonksiyonu bilinmemektedir (Aydın ve Paracıkoğlu 2006).

2.3.2.8. Laktamaz

Klinik kullanıma girdiği dönemlerde hemen tüm stafilokok kökenleri penisiline duyarlı iken, günümüzde özellikle hastane kaynaklı izolatlarda bu oran %5'in altına düşmüştür. Stafilocoklarda penisilin direncine neden olan mekanizma beta-laktamaz üretimidir (Akan ve ark 2013).

2.3.2.9. Penisilinaz

Penisilin tedavide ilk olarak kullanıldığı 1941'de Stafilocok izolatlarının %90'dan fazlası bu antibiyotiğe duyarlıydı. Ancak, bu organizmaların primer olarak penisilinaz (beta-laktamaz) üretebilmeleri, penisiline çok hızlı bir şekilde direnç gelişmesine sebep oldu. Beta-laktamaz enzimi, Penisilinler, Sefalosporinler ve benzeri Beta-laktam antibiyotikleri hidrolize ederek, bu antibiyotiklere direnç gelişimine neden olur. Betalaktam halkasındaki karbonil grubu ile bir ester köprüsü oluşturan bu enzimler, siklik amid bağına bozar ve bir açıl-enzim türevi oluştururlar. Bu reaksiyonları sonucunda betalaktam antibiyotiklerle reaksiyona giren üç grup protein vardır:

- Karboksi peptidazlar (Düşük molekül ağırlıklı PBP'ler).
- Transpeptidazlar (Yüksek molekül ağırlıklı PBP'ler)
- Penisilinazlar

Bütün PBP'lerin yanı sıra, beta-laktamazların çoğunluğu da aktif bölgelerinde bir serin aminoasidine sahiptirler. Bu nedenle "serin peptidazlar" olarak adlandırılan bir enzim üst ailesinde yer alırlar. Bu enzimlerin beta-laktam ajanlara bağlanması sırasında önce bir açıl-enzim türevi oluşmaktadır. Bunu izleyen basamakta, bir deaçilasyon işlemi gerçekleşir

ve enzim açıl molekülünden ayrılarak rejenere olur. PBP'ler ve Beta-laktamazlar arasındaki farkı bu deaçilasyon basamağının hızı belirler. Beta-laktamazlar açıl türevinden kısa sürede ayrılır, ancak PBP'lerde bu basamak gerçekleşmez. Sonuçta reaksiyon beta-laktamazların aksine enzim inaktivasyonu ile sonlanır. Geniş bir enzim grubu olan betalaktamazlar moleküler yapılarına ve işlevsel özelliklerine göre sınıflandırılırlar. Bu güne kadar dört farklı moleküler sınıf (A, B, C, D) tanımlanmıştır. A, C ve D moleküler sınıflarında yer alan Beta-laktamazlar yukarıda açıklanan serin-ester aracılıklı mekanizma ile işlev görürler. Sınıf B Beta-laktamazlar ise kofaktör olarak çinko gerektiren metalloenzimlerdir. A sınıfı, tercihen substratı penisilinler olan beta-laktamazlardan oluşur (Belay ve Rasooly 2002).

Bu grup enzimler içerisinde *S. aureus*'un beta-laktamazları (Grup 2a) da yer alır. Gram (+) bakteriler arasında Beta-laktamaz üreten en önemli patojen Stafilocoklardır. Stafilocokkal beta-laktamazlar tercihen penisilinleri hidrolize ederler. Çoğu indüklenbilir ve ekstrasellüler olarak salınabilen enzimlerdir. Stafilocokkal Beta-laktamazlar genellikle küçük plazmidlerle veya transpozonlarla taşınmakla beraber, büyük plazmidlerin kodladığı beta-laktamazlar ve diğer direnç mekanizmaları da bulunmaktadır. Bu Beta-laktamaz enzimini kodlayan genler sadece *S. aureus*'lar arasında değil, *S. aureus* ve *S. epidermidis* arasında da konjugasyonla transfer edilebilir (Bilgehan 2004).

2.3.3. Toksinler

Stafilocokkal toksinler yaklaşık olarak tüm toksijenik suşlar dahil olmak üzere bir grup enzim ve sitokin üretirler. Salgılanan bu enzim ve sitokinler [hemolizinler (alfa, beta, gamma, delta)], nükleazlar, proteazlar, lipazlar, hiyaluronidaz ve kollagenaz bulunmaktadır. Bu mevcut proteinleri görevi konakçı üzerindeki dokuları, bakterinin gelişimine uygun hale getirmektir (Dinges ve ark 2000).

2.3.3.1. Hemolizin Toksinler

Alfa, beta, gama ve delta toksinler irinleşmeden sorumludur. Hemolizin etkileri vardır (Balaban ve Avraham, 2000).

2.3.3.1.1. Alfa-Hemolizin Toksin

Alfa hemolizini kodlayan gen (*hla*), ilk olarak 1984 yılında Gray ve Kehoe tarafından *S. aureus*'un kormozondundan klonlanmıştır. Toksin proteini, 33000 moleküler ağırlığa sahiptir ve yapısında sistin bulundurmaz. Yapılan araştırmalar, yapısında *hla* geni bulundurmasına rağmen alfa toksin üretmeyen suşların varlığına dair bilgi içermektedir. Alfa toksin memeli hücrelerine, özellikle tavşan eritrosinlerine karşı toksik olup, 1 µg'ı tavşanlara intravenöz verildiğinde letal etki göstermektedir. Tavşan eritrosinin alfa toksine karşı hemolize duyarlılığı, memelilere kıyasla yüz kat, insan kıyasla bin kat fazladır (Dinges ve ark 2000).

2.3.3.1.2. Beta-Hemolizin Toksin

Beta toksinini 1935 yılında bulunmuş olup toksinin hemolitik aktivitesinin 37°C'de muamele ve 10 °C'de inkübasyondan sonra daha çok arttığı anlaşılmış ve buna bağlı olarak toksin "sıcak-soğuk" hemolizin olarak adlandırılmıştır. Toksin 35000 moleküler ağırlığa sahiptir ve 330 aminoasitlik polipeptidi kodlamaktadır. (Hamit 2008).

2.3.3.1.3. Delta Hemolizin Toksin

Memeli hücrelerde membran zararlanmalarına sebep olan toksin, 26 aminoasitten oluşmakta, 26 rezidülük uzunluğa ve ortalama 3000 moleküler ağırlığa sahiptir. Toksin yüksek oranda sitotoksik etkisi olmasına rağmen, hastalık etiolojindeki önemi tam olarak bilinmemektedir. Yapılan araştırmalar, yüksek konsantrasyonlarda toksinin sahip olduğu letal aktiviteyi ve dermonekrotik etkiyi ortaya koymaktadır (Dinges ve ark 2000).

2.3.3.1.4. Gama Hemolizin Toksin

S. aureus genusunun, genellikle tüm suşları tarafından üretilmektedir. Lökosidin ile benzer özellik göstererek, her iki toksin çeşidi de birbiriyle ilişkisi olmayan S ve F komponentlerinden salgısal protein olarak üretilir (Dinges ve ark 2000).

2.3.3.2. Lökosidin

Nötrofil ve makrofajları eritir. Sitolitik bir toksindir (Panton-Valentin toksini). Ek ekzoproteinlere sahiptir (Dinges ve ark 2000).

2.3.3.3. Eksfoliyatif Toksin

Stafilokokkal haşlanmış deri sendromuna yol açar. Stratum granulosum üzerine toksik etki etmektedir. Ek ekzoproteinlere sahiptir. Antijenik olarak ETA, ETB, ETC, ETD olmak üzere dört çeşit toksin serotipi üretilmektedir. (Hamit 2008)

2.3.3.4. PTSAg Ekzotoksin Familyası

PTSAg (*Pirojenik Toksin Süperantijenleri*), *S. aureus* ve *Streptococcus pyogenes* tarafından salgılanan ekzotoksin grubudur. Aile TSST-1 ve birçok tipin bulunduğu stafilokokkal enterotoksinleri ile streptokokal enterotoksinleri içermektedir. Her tür ortak olarak en az, pirojenite, süperantijen ve endotoksin letalitesinin güçlendirilmesi olmak üzere üç özelliği taşırlar. Her aile üyeleri de sahip oldukları spesifik özellikleriyle farklılık gösterirler (Dinges ve ark 2000). Aile içi ortak benzerliklerinin yanında SE'ler hem fonksiyonel anlamda hem de birçok genetik ve biyokimyasal özellikleri paylaşmaktadırlar (Schliever ve ark 1995).

2.3.3.4.1. Stafilokokkal Enterotoksiler A-E

Besin zehirlenmesine yol açar. Enterotoksin-A, MSS irritasyonu ön planda olarak kusmanın belirgin olduğu bir besin zehirlenmesi tablosuna yol açar. Bu etki MSS'deki kusma merkezine toksik etkisiyle olduğu sanılmaktadır. Enterotoksin-B stafilokoksik enterokolite yol açar. C ve D süt ürünleriyle ilgili zehirlenmelerde sık bulunur. SE'ler bunlara ek emetik ajan özelliği de taşımaktadır. Ek ekzoproteinlere sahiptir (Dinges ve ark 2000).

2.3.3.4.2. Toksik Şok Sendromu Toksini - 1 (TSST-1)

Süperantijen özelliğindedir ve toksik şok sendromuna neden olur. TSST-1 mukozal yüzeylerden geçme ve bakteriyel hücre duvarı-uyarımlı arthritisi reaktif etme özelliklerine sahiptir. Ek ekzoproteinlere sahiptir (Balaban ve Avraham 2000).

2.4. Taksonomi

Stafilokok, makrokok, jeotgalikok ve salinikok *genuslarıyla* birlikte Bacillus sınıfı *Bacillales* cinsi *Stapylococcaceae* familyası içinde yer alırlar. Genel taksonomide *hücresel*

organizmalar ana grubunun *Bacteria* aleminde ve bu alemin de *Firmicutes* kolunda yer alırlar. Yeni toksinlerin bulunması sebebiyle bu sınıflandırma sıklıkla yenilenmektedir. Grubun en önemli üyesi koagulaz pozitif ve termostabil nukleaz pozitif bir bakteri olan *S. aureus* 'dur (Bilgehan 2004). Soy ağacı Tablo.1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Stafilokokların Soy Ağacı

Alan (Domain)	<i>Bacteria</i>
Alem (Kingdom)	<i>Eubacteria</i>
Bölüm (Phylum)	<i>Firmicutes</i>
Sınıf (Class)	<i>Bacilli</i>
Takım (Order)	<i>Bacillales</i>
Familiya (Family)	<i>Staphylococcaceae</i>
Cins (Genus)	<i>Staphylococcus</i>

Stafilokokların sınıflandırmasında koagulaz üretimi en önemli biyokimyasal özelliklerindedir. Bunun yanında kümeleştirici faktör (*clumping factor*) de araştırılabilir. Antijenik yapı olarak serbest koagulazdan farklı olması testin negatif çıktığı durumlarda serbest koagulaz açısından tüp testi ile de kontrolü gerekmektedir (Marples ve Cooke 1988, Kotilainen 1990). Koagulaz pozitif olanlar *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. aureus subsp. anaerobius*, *S. delphini* ve *S. schleiferi subsp. coagulans*'tır (Jay 1996). Stafilokokların tür ve alt türleri Tablo 2.'de belirtilmiştir.

Tablo 2. Stafilokokların tür ve alt türleri

1	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>S.aureus subsp. anaerobius</i>
2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
3	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
4	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
5	<i>Staphylococcus warneri</i>
6	<i>Staphylococcus hominis</i>
7	<i>Staphylococcus simulans</i>

8	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>
9	<i>Staphylococcus capitis</i>
	<i>S.capitis subsp. capitis</i>
	<i>S.capitis subsp. ureolyticus</i>
10	<i>Staphylococcus schleiferi</i>
	<i>S.schleiferi subsp. schleiferi</i>
	<i>S.schleiferi subsp. coagulans</i>
11	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
12	<i>Staphylococcus auricularis</i>
13	<i>Staphylococcus cohnii</i>
	<i>S. cohnii subsp. cohnii</i>
	<i>S. cohnii subsp. ureolyticum</i>
14	<i>Staphylococcus xylosum</i>
15	<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>
16	<i>Staphylococcus caprae</i>
17	<i>Staphylococcus pulvereri</i>
18	<i>Staphylococcus intermedius</i>
19	<i>Staphylococcus hyicus</i>
20	<i>Staphylococcus chromogenes</i>
21	<i>Staphylococcus sciuri</i>
22	<i>Staphylococcus gallinarum</i>
23	<i>Staphylococcus lentus</i>
24	<i>Staphylococcus felis</i>
25	<i>Staphylococcus muscae</i>
26	<i>Staphylococcus piscifermentus</i>
27	<i>Staphylococcus vitilis</i>
28	<i>Staphylococcus equorum</i>
29	<i>Staphylococcus dephini</i>
30	<i>Staphylococcus carnosus</i>
31	<i>Staphylococcus caseolyticus</i>
32	<i>Staphylococcus kloosii</i>
33	<i>Staphylococcus arlettae</i>

2.5. Epidemiyoloji

Stafilokoklar doğada çok yaygın olarak bulunan gram pozitif bakterilerdir. Fizyolojik olmayan çevre koşullarına uzun süre dayanabilirler, yüksek tuz ve lipid içeren ortamlarda üreyebilirler (Bilgehan 2004). Bu özellikleriyle fırsatçı mikroorganizma olarak tanınmaktadırlar. İnsan ve hayvan mikroflorasında doğal olarak bulunan bu mikroorganizmalar, hayvanda stres oluşumu ve her iki canlıda da açık yaraların oluşmasıyla hastalık etkeni özelliklerini ortaya çıkarırlar. Hayvanlarda stafilokoklardan ileri gelen başlıca infeksiyonlar; mastitis, botriyomikozis, enzootik piyemi, artritis ve gıda zehirlenmeleridir (Waldvogel 2000).

Stafilokoklar, ısı işlem görmüş sığır, domuz, hindi ve tavuk eti, süt ürünleri, balık ürünleri, yumurta gibi hayvansal gıdalar ve bunları içerisinde bulunduran unlu mamül ve soslar stafilokokkal gıda zehirlenmelerine sebep olmaktadır. *S. aureus* enterotoksinlerinin neden olduğu intoksikasyonlarda inkübasyon süreleri kısa olup alındıktan 2-4 saat sonra klinik semptomlar oluşmakta ve bu semptomlar 48 saat sonra tekrar kaybolmaktadır (Bergdoll 1991). Çeşitli ülkelerde rastlanma sıklığı coğrafik koşullara ve beslenme alışkanlıklarına göre değişkenlik göstermektedir. Görülen vakalardaki ölüm oranları düşük ve klinik belirtiler hafif olsa da, en sık görülen gıda intoksikasyonlarından biridir (Mossel 1990).

Stafilokokkal gıda zehirlenmelerine sebep olan intoksikasyon, mide bulantısı, kusma, şiddetli kramplar, abdominal ağrı ve diyare olarak kendini gösterir. Baş dönmesi, baş ağrısı, genel halsizlik nabızda zayıflık, yüzeysel solunum, şok ve enteritis de diğer görülen semptomlardır. Kusma, stafilokokkal gıda zehirlenmelerinde görülen başlıca semptomdur. Toksinlerin bağırsaktaki lokal sinir reseptörlerinin uyarılmasına bağlı olarak vagus ve sempatik sinirler üzerinden geçen impulsların beynin subortikal kusma merkezine ulaşması sonucu emetik tepki oluşmaktadır (Sutherland ve Varnam 2002).

Diyare ise diğer sık görülen semptomdur. Stafilokokkal enterotoksinlerin intestinal hücreler üzerine direkt etkisi, E.coli enterotoksinlerinden farklı olarak açık değildir. *S. aureus* kaynaklı intoksikasyonlar için yapılan tahminlere göre ABD’de yıllık yaklaşık 1.5 milyar dolarlık maddi kayıp söz konusudur (Todd 1989).

Stafilokokkal intoksikasyon tehlikesi, koloni popülasyonunun 10^5 kob/g değerine ulaşmasıyla başlar (Bergdoll 1991)

İntoksikasyonların başlıca nedenleri olarak, yetersiz hijyen, uygun olmayan sıcaklıklarda muhafaza, organizmanın çevresel koşullara direnci ve türün yüksek sıcaklık derecelerine dayanıklı toksin üretmeleri görülmektedir. Meme içi iltihabı olarak bilinen mastitis etkeni olan stafilokoklar çeşitli iltihaplı enfeksiyöz hastalıklara yol açmakla beraber insanlarda menenjit, septisemi, artrit, dermatit, endokardit ve eklem romatizmalarına neden olmaktadır. Mastitisli hayvan memesinden sağılan bir sütlerin, enteropatojenik *S. aureus* suşlarının önemli kaynağı olduğu ve sayısının $1,5 \times 10^7$ kob/ml 'yi geçebileceği bildirilmiştir (Kınık 1998).

Genus içerisinde hem koagülaz negatif, hem de koagülaz pozitif türler bulunmakta ve bu özellik patojeniteyle ilişkili en önemli faktörlerdendir. Koagülaz pozitif, *S. aureus* ve *S. intemedius* ve koagülaz değişken özellik gösteren *S. hyicus*, hayvan ve insanlarda ciddi hastalıklara sebep olur. Koagülaz negatif türler düşük virulans özelliklere sahip olmakla beraber bazıları insan ve hayvanlarda hastalığa sebep olurlar. Türün sebep olduğu infeksiyonların ilk basamağı, pek çok yenidoğan çocuk ve yetişkinin tür ile kolonize olumasıyla başlar. Mikroorganizma tercihen cilt ve giysilerde, rektum, perineal bölgelerde nadiren de vajinal bölgede bulunur. Cilt ve mukoz membranlarından direkt kontakt ya da aerosol yoluyla yeni konaklara kontamine olurlar (Gilmour 1990).

Stafilokokkal gıda zehirlenmesi vakalarında ölüm oranı çok düşük olsa da, çocuk ve yaşlılarda bu oranın % 0.03 ile % 4.4 arasında değiştiği bildirilmiştir (Jay 1996).

2.6. Virulans Faktörleri

2.6.1. Toksisite

Sokari (1991), yaygın olarak tüketilen kırmızı et, balık ve sebzedden oluşan 880 gıda örneğinden izole ettiği 552 (%62) koagülaz pozitif *S. aureus* suşundan 269'unun (%48) enterotoksijenik olduğunu saptamış ve bunlar içerisinde SEA oluşturanların en sıklıkla bulunduğunu bildirmiştir. Aynı çalışmada incelenen balık örneklerinde ise SEB ve SEA enterotoksinleri dominant olarak bulunmuştur.

Harvey ve arkadaşlarının (1982) yaptığı bir araştırmada ise kanatlı çiftlikleri ve kanatlı işleme tesisleri ile işlenmiş kanatlı etlerinden izole edilen *S. aureus*'ların en çok SED'yi oluşturduğu saptanırken, bazı izolatların SEA, bazılarının ise SEA ve SED'nin her ikisini de oluşturduğu bildirilmiştir.

Kısa ve arkadaşları (1996) ise inceledikleri sade kremalı örneklerin 4'ünde (%36.4), kakaolu kremalı örneklerin 12'sinde (%22.6) ve meyveli kremalı örneklerin 9'unda (%28.1) olmak üzere toplam 25 (%26.0) pastadan izole edilen koagulaz pozitif stafilocokların, stafilocokkal enterotoksin oluşturma özelliğinde olduğunu saptamışlardır.

Erol ve Usca (1996), toplam 50 donmuş piliç karkas örneğinin 33'ünden (%66) izole ettikleri koagulaz pozitif stafilocokların 7'sinin (%21.2) enterotoksin oluşturma özelliğinde olduğunu; bunlardan 3'ünün yalnızca SEA, 2'sinin yalnızca SED, 1'inin SEA ve SEB, 1'inin de SEA, SEB ve SEC'yi birlikte oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Erol ve arkadaşlarının (1996), A tipi enterotoksin oluşturan *S. aureus*'un çığ köftede üreme ve toksin oluşturma yeteneğinin belirlenmesi amacıyla yaptıkları çalışmada, 10^3 , 10^4 ve 10^5 kob/g düzeyinde SEA oluşturan *S. aureus* ile deneysel olarak kontamine edilen çığ köftelerin, 24 saatlik süre içerisinde oda sıcaklığında toksin oluşturmadıkları saptanmıştır.

Bone ve arkadaşları (1989) gıda zehirlenmelerine sebep olan, koyun sütünden yapılan peynirler üzerinde yaptıkları çalışmada canlı patojen bakterilerin varlığına rastlamazken, peynir örneklerinde *S. aureus* tarafından oluşturulan SEA'yı saptamışlardır.

1969-90 yılları arasında İngiltere'de 359 stafilocokkal gıda zehirlenmesi bildirilmiştir. Kırmızı et, kanatlı eti ve bunlardan yapılan ürünler bu vakaların %75'inden sorumlu tutulmuştur. Diğer gıdaların ise balık ve deniz kabukluları ile süt ve süt ürünleri olduğu bildirilmiştir. Gıda örneklerinden izole edilen *S. aureus*'ların %79'unun SEA'yı ya tek başına ya da diğer enterotoksinlerle birlikte oluşturduğu saptanmıştır (Wieneke 1993).

Eksfoliatin A ve B, bazı *S. aureus* ve *S. hyicus* (sHET) suşları tarafından üretilir. *S. hyicus* (shET) bebeklerde stafilocokkal scalded-deri sendromu (SSSS) ve domuzlarda dermatitise neden olur. Toksik şok sendromu toksini (TSST-1; enterotoksin F, pirojenik eksotoksin C), toksik şok sendroma neden olur. Lökosidin, bazı türlere (sığır, insan) ait makrofaj ve nötrofillerin hücre membranının permabilitesini değiştirerek ölümüne neden olduğu tespit edilmiştir (Çetinkaya 2000).

2.6.2. Patojenite

Stafikok genusu içerisindeki birçok tür, toprakta, suda, havada ve doğal mikroflora olarak insan, hayvan ve bitkilerde bulunmaları, onları potansiyel patojen mikroorganizmalar yaptığı savunulmaktadır (Normanno 2007). Başta *S. aureus* olmak

üzere gıdalarda bulunmasının önemlerinden birisi de indikatör mikroorganizma olarak fonksiyon görmeleridir (Acco 2003).

Çeşitli kaynaklardan izole edilen stafilokoklar *in vivo* ve *in vitro* olarak üretildikleri ortama konakçı üzerine etkili peptidoglikan, kapsüler substantlar, clumping faktör ve protein-A gibi sellüler; alfa toksin, beta hemolizin, gama hemolizin, epidermolitik toksin, pirojenik toksin, lökosidin, lizozim, nükleazlar (DNAaz ve RNAaz), hyaluronidaz ve slime faktör gibi ekstrasellüler maddeler salgıladıkları gösterilmiştir (Holt ve ark 2005).

Canlı veya cansız bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri organik bir ekzopolisakkarid matriks içine gömülü ve hareketsiz olarak birbirine, bir katı yüzeye veya bir ara yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunmuş halde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluk olarak tanımlanan, Biyofilm ve DNAaz, stafilokokların patojenitesini gösteren en önemli etkenler olarak gösterilmektedir (Schlegelova 2008).

Stafilokok genusunun oluşturduğu biyofilm sayesinde tıbbi aletlere, gıda ekipmânlarına, tezgâh yüzeylerine tutunarak çapraz kontaminasyona sebep olmaktadır. Yine oluşturulan bu biyofilmin, stafilokokların antibiyotik dirençlerini artırarak virulans faktörlerinin sürdürülebilirliğini arttırdığı da savunulan önemli görüşler arasında yer almaktadır. Biyofilm, mikroorganizmayı konakçının savunma hücrelerinden, antibiyotik, çeşitli kimyasal ve dezenfektanlardan koruyan ekzopolisakkarit yapıda bir bariyerdir (Schegelova 2008). Bu yüzden gıda endüstrisinde hijyen ve sanitasyon koşulları başta olmak üzere tüm gıda zincirinde dikkate alınması gereken bir risk faktörüdür (Gündoğan 2012).

2.6.3. İnvazivite

Stafilokokların virulansında rol oynayan faktörler hücre duvar yapıları, kapsül, yüzey proteinleri, toksinleri ve enzimleridir *S. aureus* virulansı en yüksek olan stafilokok türüdür. Ancak infeksiyon olup olmaması mikroorganizmanın virulansı ile konak savunma sisteminin oluşturacakları dengeye bağlıdır. Stafilokokların genus içerisinde invazifitesi en yüksek olan türü, hücre duvarı yapısında A-protein bulunduran *S. aureus*'tur. *S. aureus*, sahip olduğu bu hücre duvarı yapıtaşını Ig G'ye bağlayarak kompleman aktivasyonunu önleme, bakteriyi fagositozdan koruma ve konak bağışıklık yanıtına karşı koyabilme fonksiyonuna sahiptir. Kapsül, invaziv invazyona katkıda bulunur ve mikroorganizmaya,

konak hücrelerin stoplazmalarından iletilebilme özelliği kazandırır. Clumping faktör, fibrinojeni bağlayarak etkili olur (Akan ve ark 2013).

2.6.4. İnfektivite

Stafilokok infeksiyonları genellikle endojen kaynaklıdır ve florada bulunan bir suşla infeksiyon oluşur ancak ender olarak ekzojen infeksiyonlar da gözlenir. Ekzojen infeksiyonlarda bulaşma genellikle direkt temas veya indirekt olarak fomitlerle gerçekleşmektedir. Endojen kaynaklı stafilokokkal infeksiyonlar, normal konakçı savunmasının kaybolduğu veya bozulduğu (immunsupresyon) hayvan ve insanlarda daha sık olarak ortaya çıkmaktadır (Quinn ve ark 2006).

İnsan ve hayvanlarda stafilokok infeksiyonları çoğunlukla koagülaz pozitif etkenler tarafından oluşmaktadır. Stafilokok türlerinin, hayvanlarda neden olduğu klinik tabloların başında septisemi ve irinli yara infeksiyonu gelmektedir. Ayrıca mastitislerin en genel etkenidir. Tavuk ve hindilerde artiritis, septisemi, gangrenöz dermatit ve omfalitis, köpeklerde otitis eksterna ve üriner kanal infeksiyonuna neden olduğu tespit edilmiştir. Stafilokokların neden olduğu mastitisler çok farklı klinik formlara neden olmaktadır. Mastitis etiolojisinde stafilokok türlerinin rolü %60-70 civarındadır. Etkenin virulens özelliklerine bağlı olarak oluşan mastitisler, subklinik, akut, gangrenöz ve kronik olabilir. Genellikle infeksiyonların çoğunluğu subklinik seyir göstermekle birlikte ölümlü de sonuçlanabilen per akut ve gangrenöz formlar da görülebilmektedir. Sığır mastitisi bazı durumlarda koagülaz negatif stafilokoklardan da ileri gelebilir. Bunlar arasında *S. epidermidis*, *S. hyicus*, *S. xylosum* ve *S. sciuri* bulunmaktadır (Akan ve ark 2013).

Süt sektöründe mastitis en önemli infeksiyon tipidir. Süt ineklerinin memelerine kontamina olan *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma* sp. ve *S. aureus*, klinik ve subklinik mastitise sebep olurlar. Özellikle bu subklinik inek memelerinden elde edilen sütlerle, sağlık sütlerin paçallanması ile endüstride önemli kayıplara sebep olurlar (Ameh 1999).

Pastörizasyon işlemine tabi tutulan sütlerde, işlem sonrası kontaminasyon büyük önem taşımaktadır. Rekabetçi özelliği düşük olan stafilokoklar için pastörizasyondan sonraki aşamada yaşanan bir kontaminasyon, mikroorganizmanın en kısa sürede 10^6 kob/ml'ye çıkabilmesi için arzu edilen ortam oluşturmaktadır (Bergdoll 1991).

Kuzu piyemisi, kuzularda görülen bu hastalık kene piyemisi olarak da isimlendirilmektedir. Hastalığın primer etkeni *S. aureus* olarak kabul edilmektedir. Ancak hastalığın ortaya çıkmasında, *Ixodes ricinus* kenelerinin rolü de bulunmaktadır. Kene enfestasyonuna bağlı olarak, deride oluşan lezyonlardan *S. aureus*'un vücuda girmesi sonucunda infeksiyon şekillenmektedir. Hastalığın oluşmasında, keneler tarafından kuzulara bulaştırılan *Ehrlichia phagocytophila* ve immunsupresyon da önemli olmaktadır. Hastalık özellikle 2-10 haftalık yaştaki kuzularda etkili olur ve kenelerin yoğun olduğu mevsimlerde (ilkbahar, yaz) daha fazla oranda ortaya çıkar. Bazı kuzularda eklem problemleri de görülebilir. Kene mücadelesinin iyi yapılması ve başarılı olması, hastalıkta oluşan ekonomik kayıpların azaltılmasında büyük rol oynar (Quinn ve ark 2006).

Eksudatif epidermitis, tüm yaştaki domuzlarda görülmesine karşın özellikle süt emen domuzlarda önemli kayıplara neden olur. Hastalığın etkeni *S. hyicus*'tur. Hastalık tüm dünyada domuz yetiştiriciliği yapılan çiftliklerde domuz yavruları arasında oldukça yaygındır. Hastalık etkeninin sağlıklı domuzların deri ve vaginal mukozasında bulunması, hastalığın ortaya çıkmasında deride oluşan yaralanmaların ve stres faktörlerinin önemini ortaya koymaktadır. Ayrıca çevresel stres faktörlerine maruz kalan domuzlarda daha sık gözlenmektedir (Akan ve ark 2013).

Botriyomikoz, kronik seyirli irinli ve granümatöz bir yara infeksiyonudur. Etken çoğunlukla *S. aureus* kabul edilir. Çoğunlukla atlarda bir yara infeksiyonu şeklinde ortaya çıkar ayrıca inek ve domuzlarda görülebilir (Quinn ve ark 2004).

İnsanlarda birçok vakadan izole edilmektedir ve bunların başlıcaları, nosokominal infeksiyonlar, sinuzit, tonsillit, pneumoni, osteomyelit, toksik şok sendrom ve gıda zehirlenmesidir.(Aydın ve Paracıkoğlu 2006) Stafilokokların önemli türlerinin neden olduğu infeksiyonlar ve konakçılar Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. Stafilokok konakçları ve sebep oldukları hastalıklar

Tür	Konakçı	Hastalık
<i>S. aureus</i>	Sığır	Mastitis
	Koyun	Mastitis, kuzu epiyemisi
	Keçi	Mastitis, Dermatit
	Domuz	Memede botriyomikoz
	Kanatlı	Artiritis, septisemi, gangrenöz dermatit
<i>S. saprophyticus</i>	Memeli	İdrar yolu infeksiyonu
<i>S. simulans</i>	Sığır	Mastitis
<i>S. xylosus</i>	Sığır	Mastitis
<i>S. caprae</i>	Keçi	İdrar yolu ve Kan dolaşım infeksiyonlar
<i>S. intermedius</i>	Kedi/Köpek	Çeşitli infeksiyonlar
<i>S. hyicus</i>	Domuz	Eksudatif epidermitis
	Sığır	Mastitis
<i>S. chromogenes</i>	Sığır	Mastitis
<i>S. sciuri</i>	Domuz	Eksüdatif epidermidis
<i>S. gallinarum</i>	İnsan	Göz ve Hepatit B infeksiyonu
<i>S. carnosus</i>	Et ve et ürünleri	-
<i>S. kloosii</i>	Koyun	-
<i>S. arlettae</i>	Memeli	-

2.7. İdentifikasyon

Genel olarak stafilokokları ve *S. aureus*'u diğer mikroorganizma ve mikroorganizma topluluklarından ayırt etmede genusa ve suşa özgü özelliklerden yararlanır. Bu identifikasyon yöntemleri alt kısımda tanımlanmakta, türler arası farklılıklar Tablo 2.4.'de gösterilmektedir.

2.7.1. Genel Stafilokok İdentifikasyon Yöntemleri

2.7.1.1. Katalaz testi

Micrococcaceae familyasındaki stafilokok ve mikrokokları, *Streptococaceae* familyası üyelerinden ayırt edici bir deneydir. Bu test eritrosit içeren besiyerlerinde yapılmamalıdır. Çünkü eritrositlerde katalaz enzimi bulunmakta ve deney sonunda hatalı pozitiflik gözlenmektedir. *Micrococcaceae* familyası (*Staphylococcus* spp. ve *Micrococcus* spp.) katalaz pozitif, *Streptococaceae* familyası üyeleri ise katalaz negatiftirler (Arda ve ark 2006, Bilgehan 2004).

2.7.1.2. Koagülaz Testi

Koagülaz enzimi plazmanın pıhtılaşmasında görev alır. Trombin katalizörlüğü ile meydana gelen fibrinojenden fibrin oluşumunu sağlar. Bakteriler bu enzim sayesinde plazmayı pıhtılaştırır. Oluşturdukları fibrin zırhı ile kaplanarak fagositoza karşı korunurlar. Koagülaz testi, *S. aureus*'un diğer stafilokoklardan ayırt edilmesinde en çok önem taşıyan deneydir. Stafilokok kolonisi görüntüsü veren ve gram boyasında gram (+) koklar saptanan tüm izolatlarda yapılmalıdır. Pigment hemoliz, mannitole etki gibi deneylerin hiç birisi *S. aureus*' un ayırımında bu kadar değerli değildir. Tüp deneyi ve lam deneyi olmak üzere iki şekilde yapılabilir. Tüp deneyinde stafilokokların besiyerine saldıkları serbest koagülaz; lam deneyinde ise kümeleştirme faktörü olarak da bilinen bağlı koagülaz araştırılmaktadır. Lam deneyi hızlı sonuç vermekle birlikte, *S.aureus* suşlarının % 10-15'i bu yöntemle negatif sonuç verebilir. Mannitolü yalnız *S. aureus* parçaladığı halde koagülaz negatif olanlar parçalamazlar (Bilgehan 2004, Waldvogel 2000).

2.7.1.3. Lam Koagülaz Testi

S. aureus suşlarının çoğu hücre duvarında bağlı koagülaza veya clumping faktöre sahiptir. Bu faktör hızlı hücre aglütinasyonuna sebep olan plazmadaki fibrinojen ile direk tepkimeye girer. Bu test kanlı agar, CCNA ya da diğer nonselektif nutrient besiyerinde üreyen kolonilerden yapılabilir. Fakat yüksek tuz oranı *S. aureus*'un bazı suşlarında otoaglütinasyona sebep olduğu için bu test, yüksek tuz içeren besiyerlerinden (mannitol salt agar gibi) yapılmamalıdır. Clumping faktöre sahip olmayan suşlar serbest koagülaz üretebileceği için, herhangi bir suş lam koagülaz testinde negatif çıkar ise bu sonuç bir tüp

koagülaz testi ile doğrulanmalıdır. *S. lugdunensis* ve *S. schleiferi* gibi koagülaz negatif bazı suşlar clumping faktör üretip lam koagulaz testi ile pozitif sonuç verebilirler (Koneman ve ark 2006).

2.7.1.4. Tüp Koagülaz Testi

Bu metot ile saptanan koagulaz ekstrasellüler olarak salınır ve bir kompleks oluşturmak için plazmadaki Koagulaz Reaktif Faktör-Coagulase Reacting Factor (CRF) ile reaksiyona girerek stafilotrombin oluşturur. Stafilotrombin de fibrinojenle reaksiyona girerek fibrin oluşumunu tetikler. Bazı suşlar, 35 °C’de uzayan inkübasyon periyodunda pıhtının çözülmesine sebep olan fibrinolizin üreteceği için testler 35 °C’de 4 saat inkübasyondan sonra oda ısısına alınmalıdır ve 18–24 saat sonra tekrar okunmalıdır. Nadiren bazı *S. aureus* suşları koagülaz negatif olabilmektedir. Yukarıda sözü edildiği gibi hem tüp hem de lam koagülaz testi için önerilen ortam EDTA’lı tavşan plazmasıdır. Enterokok türleri gibi organizmalar sitratı kullanabildiği için sitratlı plazma kullanılmamalıdır. Şayet katalaz testi yapılarak stafilokok olduğu kesin tanımlanmamış ise yanlış pozitif sonuca gidilebilir. İnsan plazması çeşitli miktarda CRF ve antistafilokokkal antikolar içerdiğinden koagülaz testi yapmada kullanılmamalıdır. Tüp koagülaz testi *S. aureus* identifikasyonu için referans testdir. Bu test, pozitif sinyal veren kan kültüründen doğrudan tavşan plazması içerisine inokule edilerekte yapılabilir (Koneman ve ark 2006).

2.7.1.5. Mannitol Fermantasyonu

Karışık bakteri florası içeren materyalden stafilokokların ayırımı için kullanılmaktadır. *S. aureus* mannitolü daima kullanır. Reaksiyon mannitolün asit bileşiklere dönüşmesine dayanır. *S. epidermidis* mannitol fermentasyonu yönünden nadiren pozitifdir. Mannitole etki etmesi, koagülaz testinden sonra *S. aureus*’u diğer stafilokoklardan ayırt etmede en yararlı testtir (Bilgehan 2004, Waldvogel 2000).

2.7.1.6. Basitirin Direnci

Micrococcaceae familyasındaki mikrokok cinsi basitrasine duyarlı, stafilokok cinsi basitrasine dirençlidir (Bilgehan 2004).

2.7.1.7. Novobiosin Direnci

S. saprophyticus ve çok nadir olarak izole edilen bazı koagulaz olumsuz stafilokoklar (*S. cohnii*, *S. lentus*, *S. sciuri* ve *S. xylosus*) bu antibiyotiğe dirençli olduğu halde *S. epidermidis* ve *S. aureus* duyarlıdır (Bilgehan 2004).

2.7.1.8. Glukoz Fermantasyonu

Micrococcaceae familyasındaki mikrokok genusu oksidatif, stafilokok genusu fermantatif etki verir (Bilgehan 2004).

2.7.1.9. Dizi ve Amplifikasyon Analizi

Moleküler tanısal yöntemler, geleneksel yöntemler kullanarak identifikasyon yapılması zor veya imkânsız olan infeksiyöz etkenlerin tanımlanmasında en değerli yöntemler olarak kabul edilmektedirler. İnfeksiyöz hastalıkların moleküler tanısı çoğunlukla nükleik asit odaklıdır. Bakteri ribozomlarının 30S ve 50S alt birimlerinden elde edilen 5S ve 16S rRNA'ların baz dizileri çalışmalarda çok yaygın olarak kullanılmaktadır. rRNA'lar bütün mikroorganizmalarda bulunurlar ve mikroorganizma evrimi ile ilişkilerini araştırmada idealdirler. Bütün ribozomlardaki işlevleri aynıdır; sabit ve kritik rolleri nedeni ile de yapıları zaman boyunca çok az değişir. Ana filogenetik grupların çoğunda 16S rRNA bir veya daha çok karakteristik nükleotid dizilerine sahiptir; bunlara "oligonükleotid imzaları" denir. 16S rRNA gen sekansı 1980'li yıllardan beri bakterilerin sınıflandırılmasında ve genotipik analizleri için önemli bir araç olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin kullanılmasıyla pek çok yeni cins ve tür ayrılmıştır. rRNA mutasyonlardan en az etkilenen genetik materyaldir. Bu amaçla araştırılan 16S rRNA, rRNA 30 S alt ünitesinde yer alan bir dizidir. Özellikle kültürde üretilmemiş veya klasik yöntemlerle zor tanımlenebilen bakterilerin identifikasyonu için 16S rRNA hedef dizidir. 16S rRNA'nın birkaç bölgesi tüm bakterilerde çok iyi korunmuştur. Bu korunmuş bölgelerden seçilen primerler tüm bakterilerde 16S rRNA amplifikasyonunu sağlar ve bunlara üniversal primerler denir. Çoğaltılan bölgeler aynı zamanda tür identifikasyonunu sağlayan özgün değişken bölgeleri de içerir. Bundan dolayı 16S rRNA gen sekansına dayalı analiz yöntemleri insanlarda klinik tanı laboratuvarlarında bakteriyel izolatların identifikasyonunda kullanılan önemli bir yöntem haline almıştır. Bakterilerin 16S rRNA sekansına dayalı moleküler identifikasyonu veteriner klinik sahada karşılaşılan bakterilerin

tanımlanmasında da kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle veteriner rutin teşhis laboratuvarlarında KNS tür düzeyinde identifikasyonları zor ve zaman alıcı olduğundan bu yöntem tercih edilmektedir. Günümüzde bazı KNS'lerin de artık mastitise neden olan önemli patojen mikroorganizmalar oldukları bilinmektedir. Bu nedenle KNS olarak tanımlanan etkenlerde tür düzeyinde identifikasyon, yapılması gerekli bir analiz olarak ele alınmaktadır. Sekans yöntemi için bakterinin izolasyonu, bunlardan DNA ekstraksiyonu ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile 16S rRNA geninin çoğaltılarak sekanslanması gerekmektedir (Osek 2003).

2.7.1.10. Lateks Aglütinasyonu

Bu yöntemde plazma ile kaplanmış lateks parçacıkları kullanılır. Latekse bağlı fibrinojen clumping faktörü saptar. Ayrıca parçacıklarda bulunan immunglobulin molekülleri stafilokokkal hücre duvarı proteini olan protein A'yı da saptayabilir. Bu protein, IgG moleküllerinin Fc reseptörü ile bağlanabilmektedir. Bir agar plağından alınan kolonilerin test materyali ile karışması sonucu lateks-mikroorganizma süspansiyonu hızlı bir kümeleşme gösterir. Ayrıca *S. lugdunensis* ve *S. schleiferi*'nin bazı suşları da clumping faktör üretir ve bu test ile pozitif reaksiyon verebilir (Koneman ve ark 2006).

2.7.1.11. Pasif Hemoaglütinasyon

Eritrositler ya da sentetik olarak hazırlanmış polistiren lateks gibi parçacıklar, çeşitli yöntemlerle çok çeşitli antijenlerle kaplanabilirler. Bu şekilde kaplanmış olduğu antijenin taşıyıcısı durumuna gelen eritrosit ya da parçacıklar, elektrolitli ortamda bu antijenlerin antikoları ile karşılaştıklarında aglütinasyon verirler. Dolaylı hemaglütinasyon denilen bu testler çok duyarlı olup, ortamda çok az antikor bulunması bile sonuç vermek için yeterlidir. *S. aureus* hücrelerinin yüzeyindeki clumping faktörü saptamak için fibrinojen ile sensitize edilmiş koyun eritrositleri bu amaçla kullanılır (Koneman ve ark 2006).

2.7.2. *S. aureus* İdentifikasyon Yöntemleri

2.7.2.1. Deoksiribonükleaz (DNAaz) Testi

Bazı *S. aureus* suşları zayıf ya da şüpheli tüp koagülaz reaksiyonu oluşturabilirler ve nadiren gerçekten koagülaz negatif olabilirler. Bu vakalarda koagülaz ile çok iyi uyum

gösteren ek testler yapmak gerekebilir. *S. aureus* endonükleolitik ve ekzonükleolitik aktiviteye sahip olan DNAaz ve termostabilnükleaz üretir (Gudding 1983). Bu enzimlerin her ikisi de nükleik asiti hidrolize eder. DNAaz içeren bakteriler, DNA içeren besiyerinde DNA'yı parçalayıp oligonükleotidler oluştururlar. Bu deneyde DNA'lı plak besiyerine saf kültürden çizgi ekimi yapıp 35°C'de 18-24 saat bekletildikten sonra plak yüzeyine 1 N HCl damlatılmasına dayanır. Bakteri DNAaz yapıyorsa ekim çizgisinin çevresinde saydam bir zon oluşur. Endikatör olarak besiyerine toluidin mavisi konulmuş ise DNAaz varlığında bakteriler ekim çizgisi çevresinde parlak pembe bir zon oluştururlar. İndikatör olarak Methyl green konmuş besiyerinde ekim çizgisi etrafında besiyerinin yeşil rengi açılır (Brakstad ve ark 1995). Besiyerine katılan toluidin mavisi DNAaz aktivitesini maskeleyebildiği için % 0.005'i aşmamalıdır. Bu test *S. aureus*'un identifikasyonunda ek bir test olarak yardımcı olmakla birlikte başka Stafilocoklar da pozitif DNAaz reaksiyonu verebilir (Fung 2006).

2.7.2.2. Termonükleaz Testi

Bu test için yine aynı DNAaz test besiyeri kullanılır. Sadece agar içerisinde 3 mm çapında çukur açılır ve 15 dakika su banyosunda kaynamış 24 saatlik sıvı kültür ile bu kuyucuklar doldurulur. Plaklar 35°C'de 1 gece inkübe edilerek çukurların çevresinde pembe bir hale oluşup oluşmadığı izlenir. Bazı hayvan izolatları (*S. caprae*, *S. schleiferi*, *S. intermedius* ve *S. hyicus* gibi) ısıya dirençli termonükleaz üretir. Bazı koagülaz negative stafilocoklar (*S. epidermitis*, *S. simulans*, *S. capitis*, *S. carnosus* gibi) zayıf pozitif reaksiyon verebilirler. *S. aureus* endonükleaz testinin özgüllüğü, *S. aureus* enzimlerine karşı hazırlanmış monoklonal veya poliklonal antikorlarla seroinhibisyon reaksiyonu veya *S. aureus* ısı stabil endonükleazını kodlayan nuc geni PCR ile gösterilerek doğrulanabilir (Quinn ve ark 2004).

2.7.2.3. Mannitol Testi

S. epidermidis ve diğer koagülaz negatif türlerin aksine, *S. aureus* mannitolü fermente edebilir. *S. aureus*'un dışkı, çevre ve nasal taşıyıcılarda taranmasında bu özelliği kullanılır. Kullanılan besiyeri "mannitol salt agar"dır. Bu besiyeri mannitol (% 1), NaCl (% 7.5), fenol kırmızısı ve peptonlar içerir. Bu yüksek tuz konsantrasyonu, enterokoklar dışındaki diğer mikroorganizmaların üremesini engeller ve seçici olarak Stafilocoklar ürer. İzole

edilen *S. aureus* kolonileri, çevresinde mannitolden asit oluşumunu gösteren sarı bir zon varlığı ile saptanabilir. Nadiren başka stafilokok türleri de mannitolden asit üretebilir. Bu sebeple bu besiyerinde üretilen mannitol pozitif organizmalar kanlı agar besiyerine pasajlanıp koagülaz üretimi açısından test edilmelidir. *S. aureus*'un identifikasyonunu sağlayan moleküler yöntemlerin çoğu PCR bazlıdır. İlk testler identifikasyonu doğrulamak için amplifikasyon ürünlerini Southern blotlamasını gerektiriyordu. Fakat daha sonra, türe spesifik hedef bölgelerin amplifikasyonu için düzenlenmiş, protein genleri gibi hedef bölgeler içeren primer aralığı geliştirildi. Nükleaz (nuc), koagülaz (coa), protein A (spA) ve yüzey-ilişkili fibrinojen bağlayan protein genleri gibi genler de *S. aureus*'un tanımlanmasında önemlidir. Ayrıca Stafilokokkal Metisilin direncinin tespiti için mecA ve 16S rRNA gibi spesifik gen bölgelerini değerlendiren multipleks PCR yöntemi de mevcuttur (Grisold ve ark 2002). Ticari olarak bulunan real-time PCR ile başarı sağlanmıştır. Real-time PCR, ekipmanı olmayan rutin laboratuvarlarda PCR'ye alternatif sunmak için bir kolorimetrik mikrokuyucuk formatında, coa geninden mRNA transkripsiyonunun izotermal sinyal aracılı amplifikasyonu kullanan yeni moleküler bir yöntem de gösterilmiştir (Osek 2003).

Tablo 4. Stafilokoklarda İdentifikasyon Şeması

	<i>S. aureus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. simulans</i>	<i>S. xylosus</i>	<i>S. caprae</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. hycius</i>	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. sciuri</i>	<i>S. gallinarum</i>	<i>S. carnosus</i>	<i>S. caseolyticus</i>	<i>S. kloosii</i>	<i>S. arlettae</i>	<i>S. delphini</i>
Koloni büyüklüğü \geq 6mm	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	-	d	d	+
Koloni pigmenti	+	d	-	d	-	-	-	+	d	d	-	d	d	+	-
Anaerobik gelişim	+	(+)	+	d	(+)	(+)	+	+	(+)	(d)	+	(±)	-	-	(+)
Aerobik gelişim	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Staphylokoagülaz	+	-	-	-	-	+	d	-	-	-	-	-	-	-	+

	<i>S. aureus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. simulans</i>	<i>S. xyloso</i>	<i>S. caprae</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. hycius</i>	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. sciuri</i>	<i>S. gallinarum</i>	<i>S. carnosus</i>	<i>S. caseolyticus</i>	<i>S. kloosii</i>	<i>S. arlettae</i>	<i>S. delphini</i>
Kümeleşme faktörü	+	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Termonükleaz	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	ND	-	-	-
Hemoliz	+	-	(d)	-	(d)	d	-	-	-	(d)	-	-	(d)	-	+
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Modifiye oksidaz	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
Alkaline fosfotaz	+	-	(d)	d	(+)	+	+	+	+	(+)	+	-	d	(+)	+
Pirolidonil arilamidaz	-	-	+	d	d	+	-	d	-	-	+	+	d	-	ND
Ornitin dekarboksilaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
Üreaz	d	+	+	+	+	+	d	+	-	+	-	-	d	-	+
β-Glokosidaz	+	d	-	+	-	d	d	d	+	+	-	-	d	ND	ND
β-Glukoronidaz	-	-	d	+	-	-	+	-	-	d	-	-	d	+	ND
β-Galaktozidaz	-	+	+	+	-	+	-	-	-	d	+	-	d	d	ND
Arginin dihidrolaz	+	-	+	-	+	d	+	+	-	-	+	d	-	-	+
Asetoin üretimi	+	+	d	d	+	-	-	-	-	-	+	-	d	-	-
Nitrik Redüksiyonu	+	-	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Esculin hidroliziz	-	-	-	d	-	-	-	-	+	+	-	ND	d	-	ND
Novobiosin direnci	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
D-Trehaloz	+	+	d	+	(+)	+	+	+	+	+	d	d	+	+	-
D-Mannitol	+	d	+	+	d	(d)	-	d	+	+	+	-	+	+	(+)
D-Mannoz	+	-	d	+	+	+	+	+	(d)	+	+	-	-	+	+
D-Turanoz	+	+	-	d	-	d	-	d	(±)	+	-	-	-	+	ND
D-Ksiloz	-	-	-	+	-	-	-	-	(d)	+	-	-	(d)	+	-
D-Cellobioz	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	ND
L-Arabinoz	-	-	-	d	-	-	-	-	d	+	-	-	d	+	-

	<i>S. aureus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. simulans</i>	<i>S. xylosus</i>	<i>S. caprae</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. hyicus</i>	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. sciuri</i>	<i>S. gallinarum</i>	<i>S. carnosus</i>	<i>S. caseolyticus</i>	<i>S. kloosii</i>	<i>S. arlettae</i>	<i>S. delphini</i>
Maltoz	+	+	(±)	+	(d)	(±)	-	d	(d)	+	-	+	d	+	+
Sükroz	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	d	(±)	+	+
N-Asetilglukosemin	+	d	+	+	-	+	+	d	d	+	ND	ND	-	-	ND
Rafinoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	ND	-	+	ND

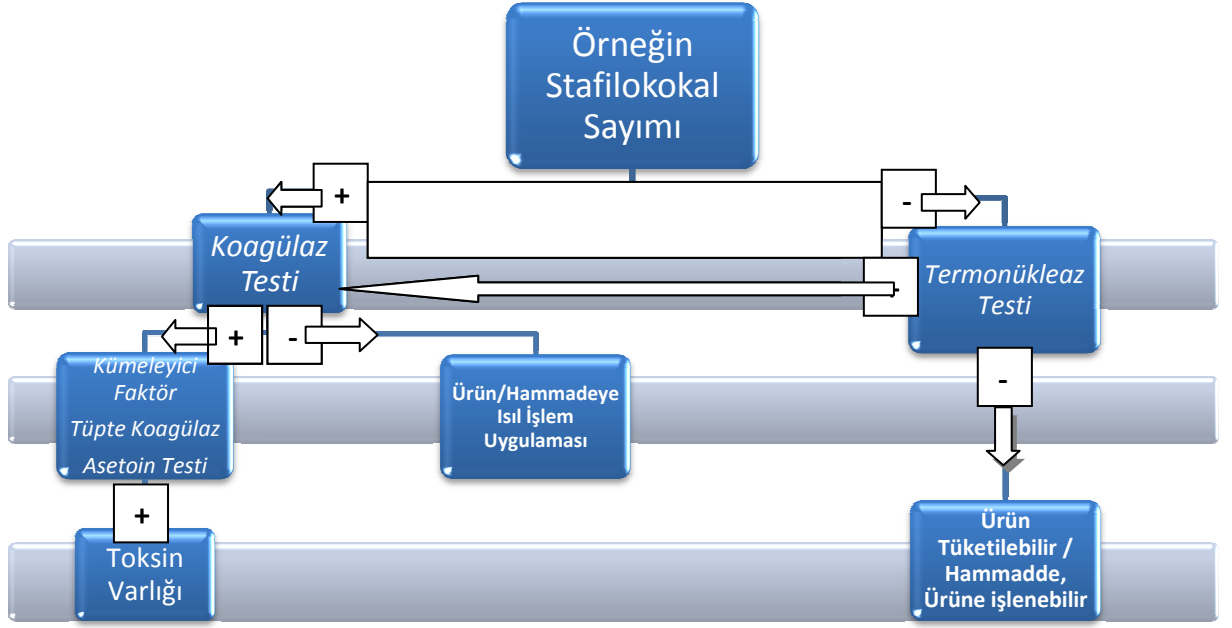
Semboller : +, türün %90 veya fazlası pozitif, ±, türün %90 veya fazlası zayıf-pozitif, -, türün %90 veya fazlası negatif, d, türün %11-89 arası pozitif, ND, tespit edilemedi, parantezler geciken reaksiyonlardaki sonuçları temsil etmektedir.

2.8. Enterotoksinler

2.8.1. Genel Bilgiler

Stafilokokkal gıda zehirlenmeleri, enterotoksijenik özelliğe sahip stafilokokların gıdalarda 10 kob/g veya daha yüksek sayıya ulaşması sırasında sentezlenen bir ekzotoksin olan enterotoksinin, alimenter yol ile alımı sonucu oluşmaktadır. *S. aureus* enterotoksijenik stafilokoklar içerisindeki en önemli türdür. *S. aureus* dışında *S. intermedius*, *S. hyicus* ve *S. epidermidis* türleri de enterotoksin oluşturma özelliğine sahiptir (Bilgehan 2004).

Gıda maddelerinde stafilokk kaynaklı toksinlerin varlığı, gıdayı tüketilemez hale getirmektedir. Tekrar tüketime uygun hale gelmesi proteinik yapıdaki toksinleri ısıl işlem vb. yöntemlerle mümkün olmaktadır. Gıdanın toksin ile kontamine olup olmadığının bu işlemlerden önce teşhisi mümkündür. Bu teşhis aşamasında oluşturulan karar ağacı ile ürün/hammaddenin tüketime uygunluğu aşağıdaki Şekil 2'deki karar ağacı izlenerek tespit edilebilir;

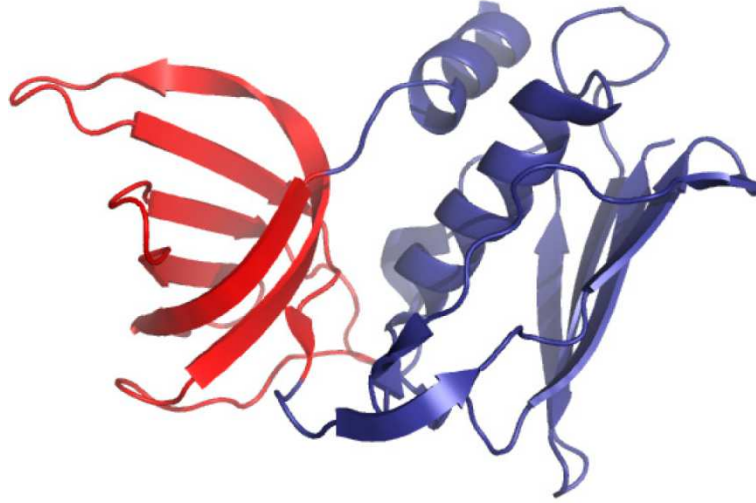


Şekil 2. Toksin Teşhis Karar Ağacı

2.8.2. Stafilokokkal Enterotoksinler

Stafilokokkal enterotoksinler (SE), yaklaşık 26-31 kDa'lık tek zincirli polipeptid, heterojen gruplardır. Bunların çoğu bazik ya da nötral proteinlerdir (Jablonski 1997). Hidroliz yoluyla 18 aminoasit üretirler ve yüksek oranda lizin, aspartik asit, glutamik asit ve tirozin içerirler. Zincirde sadece iki adet yarım sistin rezüdüğü ile bir veya iki adet triptofan molekülü bulunur (Jay 1996).

Serolojik olarak belirlenen 7 toksin (SEA, SEB, SEC, SEC2, SEC3, SED, SEE) olduğu belirtilmiş ise de, toksin şok sendromu yapan, TSST-1(SEF) toksini ve SEG, SEH toksinleri enterotoksin çeşitleri arasında yerini alarak sayıyı 10 farklı tür olarak güncellemiştir (Su 1997). Şekil 3'de de toksik şok sendromu toksini (TSST-1)'nin gen yapısı ve PDB bilgisi gösterilmektedir.



TSST-1 **PDB: 3MFG**

Şekil 3. Toksik Şok Sendromu Toksini (TSST-1)

Stafilokokkal enterotoksinleri sentezleyen genler de tüm diğer PTSAg'ler gibi bakteriyofaj, plazmid ve heterologgenetik elementler tarafından taşınırlar ve taşınma şekilleri de patojenite adalarına göre farklılık gösterir. Bu ekspresyonu üç düzenleyici sistem kontrol ederek yönlendirmektedir. Bunlar; *agr*, *sar* ve *katabolit baskılayıcı* sistemlerdir (Dinges ve ark 2000).

SE'ler higroskopik özelliklerinden dolayı su ve tuzlu solüsyonlarda çözünebilme özelliğine sahiptirler. Enterotoksinler pH < 2'de pepsin hariç insan intestinal sisteminin proteolitik enzimlerine dirençlidirler (Munson ve ark 1998).

Isıya dayanıklı SE'lerin en önemli özelliği olup gıdalardaki enterotoksinlerin pişirme, pastörizasyon veya diğer ısı uygulamaları ile tamamen inaktive edilemedikleri bilinmektedir (Jay 1996). SE'lerin ısıya dayanıklılıkları üzerine yaptıkları bir çalışmada, SEA ve SEB'nin 100 °C'de 90 dakikada, 120 °C'de 30 dakikada, SEC'nin 100 °C'de 180 dakikada, 120 °C'de 60 dakikada tamamen inaktive olduğu bildirilmiştir. Termal dayanıklılıkta önemli kriterler; toksinin saflığı, serolojik tipi, yaklaşık toksin miktarı, ısı işlemi uygulanan medium, ortam pH değeri ile teşhis ve saptama yöntemidir (Bergdoll 1991).

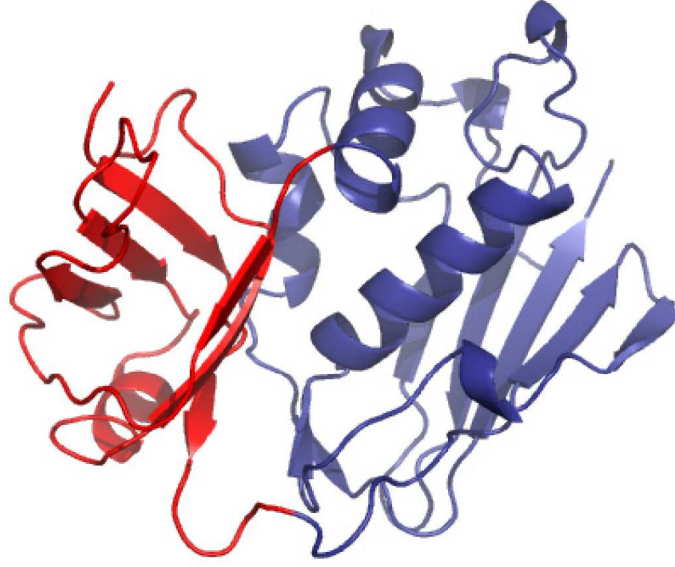
Toksinler kurumaya ve gama ışınlarına yüksek direnç gösterirler. Tampon çözelti içinde SEA toksinlerinin 8.0 kGy gama ışını uygulaması ile yıkımlandığı, bununla beraber kıyma örneklerinde bu düzeydeki ışın uygulamalarından sonra SEA'nın %27-34'ünün yıkımlanmadığı bildirilmiştir. SE'lerin spesifik olmayan T hücre poliferasyonunu uyaran süperantijen fonksiyonlarının yanı sıra güçlü gastrointestinal toksin olma özellikleri de vardır. SE'lerin ısıya ve tripsin, pepsin gibi gastrointestinal enzimlere dirençli olmaları en önemli özelliklerinden biridir (Erol 2003).

Stafilokokkal enterotoksinler, genellikle suşa özgü olmakla beraber, bir tür birden fazla toksin üretebilmektedir. Türler içerisinde SEA, SEB, SEE, 239-296 aminoasit rezidüsünden oluşur. SEC3, 236 aminoasit rezidüsünden oluşur (Bergdoll 1991).

Yapılan araştırmalar en sık rastlanan toksinin enterotoksin A olduğunu göstermiştir (Gilmour 1990). İntoksikasyonun şiddeti alınan toksin miktarına bağlıdır. Evenson ve arkadaşlarına (1988) göre 100-200 ng enterotoksin A'nın alınması ile gıda intoksikasyonu oluşur. Gıda intoksikasyonlarına en çok A toksinin neden olduğu ve bunu B ve D toksininin izlediği birçok araştırmacı tarafından ifade edilmiştir (Notermans 1984).

2.8.2.1. Stafilokokkal Enterotoksin A (SEA)

SEA'yı kodlayan entA geni, bir bakteriyofaj tarafından taşınmaktadır. Bu fajın sirkularizasyon ve karşılıklı gen aktarımının bakteriyel kromozom içerisinde tamamlandığı saptanmıştır. entA geninin faj bağlanma bölgesine yakın bir yerde lokalize olduğu, 771 baz çiftinden oluştuğu ve 257 aminoasit rezidüsünün entA prekürsörünü kodladığı bildirilmektedir. Bu yapıda 24 rezidülük bir N-terminal hidrofobik ön dizilimi işlenmekte ve 27.100 Da moleküler ağırlığındaki SEA'nın son şeklini oluşturmaktadır (Notermans 1984). Şekil 4'de de stafilokokkal enterotoksin A'nın gen yapısı ve PDB bilgisi gösterilmektedir.

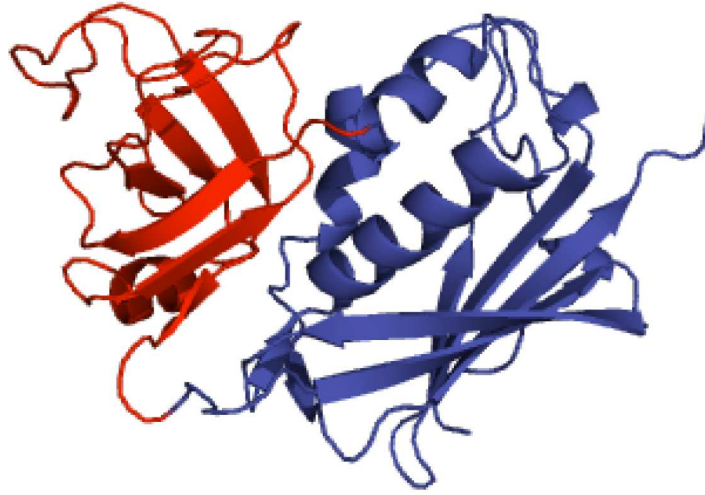


SEA
PDB: 1SXT

Şekil 4. Stafilokokkal enterotoksin A

2.8.2.2. Stafilokokkal Enterotoksin B (SEB)

SEB salınımını düzenleyen entB geninin kodlama bölümü yaklaşık 900 nükleotit içerir. SEB prekürsör proteinleri 267 aminoasitden (31.400 Da) oluşur ve 27 aminoasitlik N-terminal sinyal peptidini içine alır. Gıda zehirlenmelerinde *S. aureus*'un klinik izolatları içinde entB geninin kromozomal yapıda olduğu, fakat diğer bakteri suşlarında genin 750 kb (kilobaz)'lık bir plazmid tarafından taşındığı bildirilmektedir (Balaban ve Avraham 2000). Şekil 5'de de stafilokokkal enterotoksin B'nin gen yapısı ve PDB bilgisi gösterilmektedir.

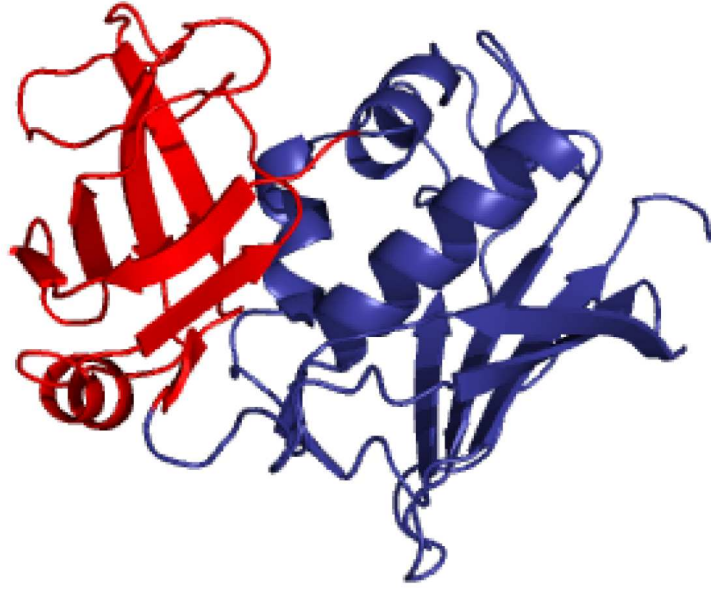


SEB
PDB: 1SBB

Şekil 5. Stafilokokkal enterotoksin B

2.8.2.3. Stafilokokkal Enterotoksin C (SEC)

Antijenik olarak SEC'nin SEC1, SEC2 ve SEC3 olmak üzere üç farklı alt tipi bulunmaktadır. Bütün SEC'ler 801 baz çifti ve 27 rezidülük bir sinyal peptid içermektedir. SEC1 ve SEC2'nin sinyal peptidleri benzerdir. entC1 nükleotid dizilimi entB'yi kodlayan genle %74, SPE A ile %59 gibi oldukça yüksek bir oranda benzerlik gösterir. SEC3'ün sinyal peptidi diğer SEC'ler ile %77.7'lik bir benzerlik gösterir. SEC3 ve SEC2'nin olgun formu arasında yalnızca 4 aminoasitlik bir fark (%98 benzerlik) vardır. Diğer yandan SEC1'in SEC2 ile arasında 7 (%97.4 benzerlik), SEC3 ile arasında da 9 aminoasitlik (%97.9 benzerlik) bir fark olduğu bildirilmiştir (Hovde 1990). Şekil 6'da da stafilokokkal enterotoksin C3'ün gen yapısı ve PDB bilgisi gösterilmektedir.



SEC3
PDB: 1JCK

Şekil 6. Stafilokokkal enterotoksin C3

2.8.2.4. Stafilokokkal Enterotoksin D (SED)

SED'yi kodlayan gen olup bu gen 27.6 kb penisilinaz plazmidi üzerinde yer alır. Bu plazmid pIB485 olarak bilinir. entD geni 30 aminoasitlik sinyal peptid içeren 258 aminoasidi kodlar. 228 aminoasit olgun polipeptid yapısı 26,360 Da moleküler ağırlığa sahiptir ve diğer SE'lerin dizilimine yüksek düzeyde benzerlik gösterir. SED süperantijeni MHC sınıf II molekülleri ile yüksek düzeyde afinite göstermek için Zn^{+2} 'ye bağlanır ve bunun sonucunda SED Zn^{+2} ile birlikte kristalize olur (Balaban ve Avraham 2000).

2.8.2.5. Stafilokokkal Enterotoksin E (SEE)

entE geni 771 baz çifti içerir ve 26.000 Da moleküler ağırlığı ile olgun ekstraselüler bir form oluşturur. DNA dizilimleri SEE, SED ve SEA'nın yakın ilişkili olduğunu göstermektedir. SEE, SEA ile birlikte %84 gibi yüksek bir oranda dizilim benzerliğini paylaşır (Couch 1988).

2.8.2.6. Stafilokokkal Enterotoksin G (SEG)

entG geni 777 nükleotid içerir ve 233 aminoasitli toksine dönüşmek üzere bölünen 258 aminoasitli prekürsör proteini kodlar SEG SPEA, SEB, SEC ve SSA'ya (*Streptococcus süperantijen A*) en çok benzeyen toksindir (Munson 1998).

2.8.2.7. Stafilokokkal Enterotoksin H (SEH)

SEH, 27,300 Da moleküler ağırlığında bir enterotoksindir. SEH grup I ile %36-38 oranında benzerlik gösterir (Su 1993). SEH, diğer SE'ler ile benzer yapıya sahiptir, fakat biyolojik özellikleri daha az karakterize edilmiştir. SEH, SEA'dan daha az potansiyele sahip olmasına rağmen insan T hücreleri içerisinde güçlü mitojenik aktivite gösterir ve insan MHC sınıf II molekülüne bağlanma afinitesi yüksektir (Munson 1998).

2.8.2.8. Stafilokokkal Enterotoksin I (SEI)

entI geni 729 nükleotid içerir ve 242 prekürsör proteini kodlayan aminoasit ile sonlanır. 24.928 Da moleküler ağırlığında olgun proteinlere karşılık 218 aminoasitten oluşan toksin formuna dönüşür. SEI, grup I'e grup II'den daha çok benzerlik gösterir, fakat diğer SE'lere oranla bu benzerlik daha azdır. SEI %26-28 aminoasit oranıyla en fazla SEA, SEE ve SED'ye benzer (Munson 1998).

2.8.2.9. Stafilokokkal Enterotoksin J (SEJ)

entD bir plazmid tarafından kodlanmaktadır. Enterotoksin D ve J'nin açık okuma bölümleri zıt yönlerde yer almakta ve birbirinden her bir kolu 21 nükleotid uzunluğunda olan dönüşüm tekrarı içeren 895 nükleotid intergenik bölgeyle ayrılır. 269 aminoasitli SEJ proteini SEA, SEE ve SED'ye % 64-66 oranlarında dizilim benzerliği gösterir. PCR uygulamaları, entJ determinantının bütün SED'leri kodlayan plazmidlerde bulunabileceğini düşündürmektedir (Zhang 1998).

2.8.2.10. Stafilokokkal Enterotoksin K (SEK)

SEK yeni bir enterotoksindir. 26.000 Da moleküler ağırlığına sahiptir ve deneysel çalışmalarda izoelektrik noktası 7.0-7.5 olarak belirlenmiştir (Dinges ve ark 2000).

2.8.3. Enterotoksin Oluşumuna Etki Eden Etkenler

Enterotoksijenik türler için, toksin oluşturma koşulları, vejetatif gelişme koşullarına göre farklılık göstermektedir. Örnek olarak *S. aureus* için bu değerler aşağıdaki Tablo 5’de, genel stafilokok koşulları ise açıklamalarda verilmiştir.

Tablo 5. *S. aureus* için üreme ve toksin üretme koşulları

	Üreme		Toksin Üretme	
	Optimum	Aralık	Optimum	Aralık
Sıcaklık °C	37	6,7-47,8	40-45	10-47,8
pH	6,7	4-10	6-7	4,5-9,8
A_w Değeri	0,98	0,83	0,98	0,86-0,99
NaCl	0	0-20	0	0-10
Atmosfer	Aerob	Aerob-Anaerob	Aerob	Aerob-Anaerob

2.8.3.1. Ekstrasellüler Etkenler

2.8.3.1.1. Besin Maddeleri

Düşük su aktivitesi değerine sahip besi yerine prolin ilave edilmesiyle SEB oluşumunun stimüle edildiğini ancak, glisin, betain ve karnitin ilavelerinde bu etkinin görülmediği bildirilmiştir. Demir, inorganik fosfat, karbondioksit veya bikarbonat içeren besiyerleri sekonder metabolitlerin oluşumunu artırmaktadır. Magnezyumun SEC, demirin ise SEB oluşumunu yüksek düzeyde etkilediği bildirilmiştir (Quinn ve ark 2004).

2.8.3.2.1. Sıcaklık

S. aureus’un üremesi için gerekli optimum sıcaklık derecesi 37 °C iken enterotoksin üretimi için optimum sıcaklık 40-45 °C arasında değişmektedir (Quinn ve ark 2004).

2.8.3.1.3. pH Değeri

Enterotoksinlerin oluşumu için optimum pH değerleri 6-7 arasındadır. SEB oluşumu ile karşılaştırıldığında SEA oluşumu pH değişikliklerine daha toleranslıdır (Tompkin

1973). pH değerinin azalması suşların gelişmesinden çok, toksin oluşturmalarını kısıtlamaktadır ve özellikle enterotoksin B ve C daha çok etkilenmektedir (Bergdoll 1991). Bir araştırmada ürünün başlangıç pH değeri 6.78 iken bu muhafaza sıcaklığının etkisi ile bakterilerin gelişmelerine bağlı olarak düzenli olarak azaldığı ortaya konmuştur. Burada laktik asit bakterilerinin gelişmelerinin yanı sıra kremada bulunan şekerin anaerobik bakteriler tarafından kullanılması pH'nın düşmesinde etkili olmuştur (Notermans 1984, Bergdoll 1991).

2.8.3.1.4. Atmosferik Koşullar

Belay ve Rasooly, anaerobik koşulların *S. aureus*'un gelişimi ve SEA oluşumu üzerine etkilerini araştırdıkları bir çalışmada, stafilokok hücre yoğunluğunun aerobik koşullarda anaerobik koşullara göre 9-17 kat daha fazla olduğu bulunmuş ve SE oluşumunun gelişmeye bağlı olduğu gösterilmiştir. Anaerobik ortamda yavaş gelişme az toksin oluşumuna neden olurken her iki koşulda da inkübasyonun 120. dakikasından sonra SEA belirlenebilmiştir.

2.8.3.1.5. NaCl ve Su Aktivitesi

% 5'lik NaCl konsantrasyonları tuzsuz ortamlara oranla *S. aureus* üremesini artırırken, %7.5 ve %10 düzeylerindeki tuz konsantrasyonu üremeyi kısmen geciktirdiği bildirilmiştir. Qi ve Miller'in, düşük a_w değerinin SEA ve SEB biyosentezi üzerine etkisini araştırdıkları bir çalışmada, SEB oluşumunun düşük a_w değerine SEA oluşumundan daha duyarlı olduğunu ortaya koymuşlardır (Carpenter 1974). Notermans ve ark (1984), yüksek stafilokok sayısına ulaşan kolonilerde yaptığı gözlemlerde bile 0,93 a_w değerinde B ve C tipi enterotoksinleri tespit edememiştir. Lotter ve Leistner (1978), enterotoksin A'nın ve enterotoksin D'nin 0,86 a_w değerinde, suşlar tarafından oluşturabileceğini saptamışlardır.

2.8.3.1.6. Diğer Kimyasallar

Laktobasiller tarafından üretilen veya gıdalara ilave edilen H_2O_2 *S. aureus*'un üremesini inhibe edebilmektedir. Sheldrake ve ark. 1000 mg/L iodyin *S. aureus* sayısının azaltılmasına oldukça etkili olduğunu saptamışlardır. *S. aureus* FRI-100 ve FRI- 472 suşlarının gelişimi üzerine en fazla prüvik asit, FRI- 137 suşuna laktik asit ve S6 suşuna laktik, sitrik, asetik, prüvik ve propiyonik asitlerin hepsinin etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Bir çalışmada laktik asidin enterotoksin sentezini büyük ölçüde inhibe ettiği saptanmıştır (Domenech 1992).

2.8.3.1.7. Rekabetçi Özellik

Stafilokokların genel olarak zayıf rekabetçi özelliğe sahip bakterilerdir. Sıvı besi yerinde *Pediococcus cerevisiae* ve toksin oluşturan *S. aureus* suşları arasındaki etkileşimler stafilokokların 20 kat daha az SEA, SEB ve SEC oluşturmalarıyla sonuçlanmıştır (Haines 1973).

2.8.4. Epidemiyoloji

Stafilokokkal gıda zehirlenmeleri, sindirim sistemi üzerine etkili enterotoksin kaynaklı olduğundan bu içeriğe sahip gıdanın alımı zehirlenme safhasından büyük önem taşımaktadır. Kontaminasyona uğramış gıdanın tüketimini takip eden 2-6 saatlik bir süreçte şiddetli karın ağrısı, sancı, bulantı, kusma ve ishale kendini gösterir. Genellikle ateş görülmezken, yetişkin insan için 0,1-1 mg enterotoksinin gıda ile alınması yeterlidir. Akut semptomların süresi genellikle 24 saatten kısa olduğu için, stafilokokkal gıda zehirlenmelerine gereken önem verilmemektedir (Evenson 1988).

İnsanın doğal mikroflorasında bulunan, stafilokokların, bu özelliklerinden dolayı başlıca gıdaya bulaşma aracı "sektör çalışanları" olarak kabul edilmektedir. Toksin tipine bağlı olarak SE'nin dozu değişir. Genel olarak alınan gıdanın 1 gramında 1ng SE bulunması belirtilerin ortaya çıkması için yeterli olmaktadır (Sutherland ve Varnam 2002).

Genel olarak ilgili kaynaklarda minimum toksin dozunun 1 µg veya daha az olarak bildirilmesine rağmen, 94-184 ng düzeyindeki SEA'nın okul çocuklarında intoksikasyona neden olduğu bildirilmiştir (Evenson 1988).

2.8.5. Toksin Teşhis Yöntemleri

Stafilokokkal intoksikasyonların teşhisinde, enterotoksinlerin gıdalarda varlıklarının belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Metodolojik çalışmalar göstermiştir ki enterotoksinlerin ve tiplerinin saptanmasında ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), RIA (*Radio Immuno Assay*) ve RPLA (*Reserved Passived Latex Agglutination*) tekniklerini uygulandığı bilinmektedir. ELISA tekniği, yüksek duyarlılığa sahip, güvenilir, kolay uygulanabilen ve çabuk sonuç veren bir teknik olması nedeniyle

önerilmektedir (Park 1994). Son zamanlarda enterotoksinlerin saptanması için ticari test kitleri üretilmiştir. RIDASCREEN, TEVRA, TRANSIA, VIDAS, SET-EIA ve RPLA gibi ticari kitler çeşitli gıdaların analizlerinde kullanılmaktadır (Brett 2006).

2.8.5.1. ELISA

Antijen antikor reaksiyonunu gerçekleştirmek için birçok yöntem olmasına rağmen son yıllarda en çok kullanılan yöntem ELISA testidir. Bu yöntemde, antijen ya da antikor bir enzimle işaretlenmekte ve immunolojik reaksiyon, enzimatik bir aktivite sonucu ölçülmektedir. ELISA testinin direkt, indirekt ve sandviç ELISA gibi farklı şekilleri olmasına rağmen en sık kullanılanı sandviç ELISA yöntemidir (Fung 2006).

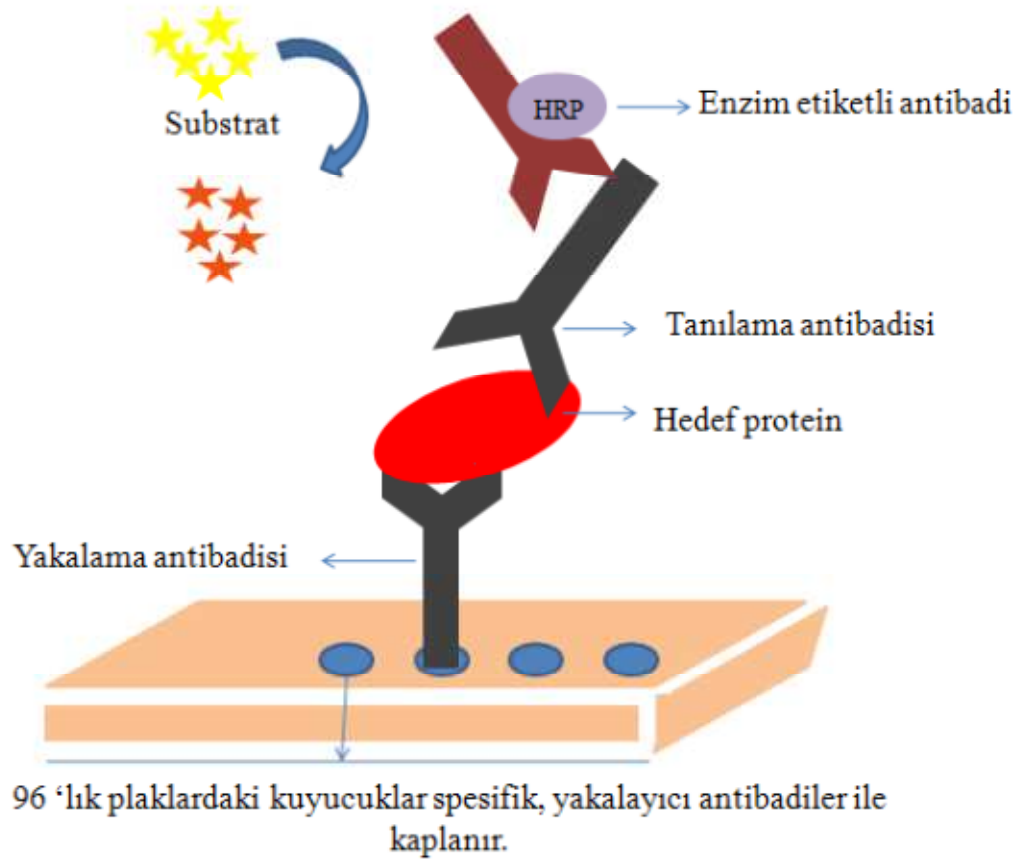
Patojen mikroorganizmaları ve toksinlerini belirlemek için birçok ELISA testi geliştirilmiştir. Fakat bunun yanında ELISA'nın manuel prosedürü çok zahmetli olduğu için son zamanlarda bazı ELISA testleri (VIDAS, Assurance EIA, Transia Elisamatic II, Detex vb) tamamen otomatik hale getirilmiştir. Bu sistemler ile *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp., *E. coli* 0157, stafilokokkal enterotoksin ve *Campylobacter* sp. gibi patojen ve toksinleri kısa sürede otomatik olarak teşhis edilmektedir. Günümüzde kullanılan birçok ELISA kiti yüksek standarda sahiptir ve otomatik olarak çalıştıkları için hız ve verimi arttırmakta ve insan hatalarını azaltmaktadırlar (Fung 2006).

ELISA yöntemi toksin tespit sürecinde, Türk Gıda Kodeksi (TGK)'ne göre 0,1 ng/ml hassaslıkta çalışan bu yöntemde stafilokokkal enterotoksin varlığının tespit edilememesi gerekmektedir (Sağlam 1999).

ELISA hücresel komponent bazlı bir teknolojidir. Bu teknoloji özel mikroorganizmaları ya da hücresel komponentleri algılamak için bir antijen-antikor reaksiyonunu kullanır (Moldenhauer ve Yvon 2005). İmmüanaliz yöntemleri genellikle proteinlerin antijen-antikor etkileşimi ile hedefin varlığının ölçülmesinde kullanılırlar. Algılama sinyali radyoaktif, kolorimetrik veya floresan olabilir. İmmüanalizlerin hassasiyeti ve seçiciliği kullanılan antikorla ilişkilidir. ELISA tekniği en güvenilir kantitatif algılama metodudur. ELISA antijenin veya antikorun katı yüzey üzerine yerleştirilmesine göre farklı şekillerde uygulanır;

- Yarışmalı ELISA
- Dolaylı ELISA
- Sandviç ELISA

ELISA mikrobiyologlar arasında yiyecek, su, ve çevresel veya klinik örneklerde hassas ve kantitatif olarak bakterilerin veya toksinlerinin algılanmasında popüler olarak kullanılmaktadır. ELISA endosporlar, kapsüller, ya da endospor oluşturan bakterilerin hücre duvarları komponentlerini algılamak için kullanılabilir. ELISA testlerinde birkaç adım olup, bağlanmamış bileşikleri atmak için yıkamayı da içerir. İlk önce çoklu plağın katı yüzeyine bir antikor bağlanır. Daha sonra bütün mikroorganizmaları veya endosporları içeren bir antijen süspansiyonu test edilmek üzere antikor kaplanmış yüzeye uygulanır. Antikor antijeni yakalayıp yüzeye bağlar. Bir enzim ile bağlanmış bir antikor antijene bağlanır ve uygun bileşik eklendiğinde enzim kataliz görevi görerek onu oksitleyerek renkli ya da floresan bir bileşiği spektrofotometre gibi uygun bir cihazla algılanabilecek şekilde üretir (Şekil 7). Tipik ELISA algılama limitleri endospor ve tüm hücre algılaması için 10⁴-10⁶ bakteri aralığındadır (Speight ve Hallis 1997).



Şekil 7. ELISA uygulama basamakları

2.8.5.2. RIA

RIA (Radioimmunoassay), kültür filtratları ve gıda ekstraktlarında enterotoksinlerin saptanması için geniş oranda kullanılmıştır. Bu metot antikor moleküllerin üzerindeki bağlanma bölümlerine, örneklerde işaretlenmemiş bu toksin ile standart radyoaktif işaretlenmiş toksinin yarışması esasına dayanır. Genel olarak hızlı (3-4 saat) ve 1-10 ng/g düzeyinin altında toksinleri saptayabilen bir yöntemdir. Dezavantajları ise non-spesifik reaksiyonlar, yüksek oranda purifiye enterotoksin gerektirmesi, antijenik epitopların işaretlenmesi esnasında mümkün olabilecek advers etkiler, radyoizotopların kısa yarılanma ömrü, radyonüklidlerin insan sağlığına zararları ve pahalı saptama cihazlarına gereksinim olmasıdır (Brett 2006).

2.8.5.3. PCR

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), moleküler biyoloji ve genetik alanında geniş bir kullanıma sahip olan bir yöntemdir (Edel 1998). Bu enzimatik reaksiyon, ortamda polimeraz enzimi ve sentez için uygun moleküller bulunması halinde, DNA ve RNA dizisinin seçilip tanınması ve amplifikasyonunu sağlayan yöntemdir. Bu yöntem moleküler markırların çalışmaları için alternatif bir yol sağlamaktadır. PCR, bakteri, virüs, mantar, protozoon ve parazit gibi hastalık etmenlerinin teşhisinde kullanılmasının yanı sıra, mikrobiyal çalışmalar, adli tıp ve genetik hastalıkların tanısında da kullanılmaktadır. PCR tekniğinin bulunmasından günümüze kadar pek çok yeni metotlar geliştirilmiştir. Çoğaltılması istenilen DNA dizisinin bulunduğu durumlarda kullanılan metotlar; Nested-PCR, Real- Time PCR, Multipleks PCR, Kantitatif PCR, Touch Down PCR, Solid Phase PCR, ve Revers Transkripsiyon PCR'dır (Sevindik 2013).

2.8.5.3.1. Nested-PCR

PCR tekniğinin spesifitesini artırmak için geliştirilen yöntemdir. Bu yöntemde, birbirini takip eden iki polimeraz zincir reaksiyonu mevcuttur. Yöntemde istenilen amplifiye dizilerin iç bölgesinin çoğaltılması amacıyla dizayn edilen primerlerin kullanıldığı 2 PCR işlemi uygulanmaktadır. Uygulanan ilk amplifikasyonda, hedef DNA dizisinin dış bölgesine özgü iki dış primer kullanılarak uzun bir bölgenin çoğaltılması gerçekleştirilmektedir. İkinci amplifikasyon mekanizmasında, ilk amplifikasyondan gelen bölgenin iç bölgesine bağlanan iki iç primer kullanılarak küçük alanın çoğaltılması

sağlanmaktadır. Bu yöntem ile günümüzde pek çok protozoon, bakteri, virüs ve birçok hastalık etmeni teşhis edilmektedir (Karataş 2012).

2.8.5.3.2. Real-Time PCR

Real-time PCR, DNA ya da mRNA örneklerinin çoğaltımını ve ürünlerinin miktarını tek bir tüpte tespit edebilen son zamanlarda popüler olmuş bir tekniktir (Klein 2002). Gen anlatımının belirlenmesi, farklılaşma ve patolojik durumların saptanması için çok önemlidir. Medikal araştırmalarda ve moleküler tanı çalışmalarında biyolojik materyalle çalışırken çok sayıda doku örneğine veya hücre miktarına ihtiyaç duyulur. Real-time PCR metodu ile çok az miktardaki biyolojik bir örneğin özelliğini hızlı, güvenilir ve hassas bir şekilde ortaya koyulabilmektedir (Bustin 2005). Real-time RCR, infeksiyon hastalıklarında patojenlerin belirlenmesinde diziye özgü floresan probalar sayesinde klinik laboratuvarında tercih edilen ve rutin olarak uygulanan bir yöntem haline gelmiştir. Bu yöntem sayesinde çok sayıda mikrobiyal patojen tanımlanmış olup antibiyotiklere karşı dirençli olan türler tespit edilmiştir. Vanamisine dirençli *Enterococcus faecalis*'den *E. faecium*, çok yaygın bir patojenite etkeni olan *Candida* sp.'nin bazı önemli türleri belirlenerek bu infeksiyon ajanlarına özgü floresan primer ve probalar geliştirilmiş ve tanıda kullanılmaya başlanmıştır (Günel ve Aydın 2009). Real-time PCR tekniği ile et ve et ürünlerinde *Salmonella* spp. *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica*, *S. aureus*, *C. jejuni* gibi pek çok patojen bakterinin tanımlanması için çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bu araştırmalar sonucunda real-time PCR'ın hızı, hassasiyeti, spesifitesi ve otomasyona uygun olması gibi avantajlarından dolayı gıda kaynaklı patojenlerin tespitinde umut verici bir yöntem olduğu ileri sürülmüştür. Bunun yanı sıra bu yöntem ile malaria hastalığına neden olan *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, ve *P. ovale* türleri teşhis edilmiştir (Perandin ve ark 2004).

2.8.5.3.3. Multiplex PCR

Bu PCR metodunda kalıp DNA dizisini çoğaltmak amacıyla aynı reaksiyon içerisine birden fazla primer çifti ilave edilerek çoğaltma işlemi yapılmaktadır. Bu metot ağırlıklı olarak virüs ve viroidlerin genlerinin çoğaltılmasında kullanılmaktadır (Levy ve ark 1992). Multiplex PCR ile genetik çalışmalar yapılmış ve hastalık etmeni patojen mikroorganizma teşhis edilmiştir. Yapılan araştırmalar ile multiplex PCR ile bu hastalık etmenlerinin

tanımlanması ve teşhisi sağlanmıştır (Houf ve ark 2000). Multiplex PCR, *E. coli* (STEC) bakterilerinin tanımlanması için en hassas yöntem olarak kabul edilmektedir. Siga toksin üreten *E. coli* (STEC), insanların mide ve bağırsakların önemli hastalık etmenidir. Yapılan araştırmalar sonucunda insanlardan izole edilen *E. coli* (STEC) bakterilerinin teşhis edilmesinde multiplex PCR (mPCR) yönteminden yararlanılmış ve başarı sağlanmıştır (Osek 2003).

2.8.5.3.4. Reverse-Transkriptaz PCR

Revers Transkriptaz PCR yöntemi, normal PCR'dan farklı olarak RNA çoğaltımını amaçlayan hücrelerden izole edilen RNA moleküllerinin retrovirüslerden izole edilen Revers transkriptaz enzimi yardımıyla komplementer DNA (cDNA) sentezini gerçekleştirmesi sonucu, gen ekspresyonu analizlerinin yapılabildiği hızlı ve hassas bir yöntemdir. İlk olarak RNA kalıp olarak kullanılarak tamamlayıcı DNA sentezlenir, sonra DNA-RNA sarmalının ayrılması sağlanır, son olarak da ayrılan DNA dizisi kalıp olarak kullanılarak çift zincirli DNA dizisi çoğaltılması sağlanır (Santagati ve ark 1997).

2.8.5.3.5. Touch Down PCR

Touch Down PCR tekniği ile istenmeyen DNA dizilerinin çoğaltımı sağlanmaktadır. İlk aşamada primer sıcaklığı çok yüksek tutularak primerlerin spesifik şekilde hedef diziyeye bağlanması amaçlanmaktadır. Daha sonra turlar ilerledikçe bu sıcaklığın Tm seviyesine düşürülmesine dayanmaktadır (Karataş 2012).

2.8.5.3.6. Solid Phase PCR

Solid Phase PCR DNA çip teknolojisinin kullanıldığı, tek nükleotid polimorfizm ve DNA dizi analizlerinde kullanılan yüzeye sabitlenmiş DNA'nın üretiminde kullanılacak bir polimeraz zincir reaksiyon çeşididir. Çoğaltma işlemi yüzeye 5' ucundan tutturulmuş primerler tarafından gerçekleştirilir (Karataş 2012). Bu yöntem, su ya da havadaki herhangi bakteri veya virüs tespitini sağlayabilmektedir (Toranzos 1992). Klinik örneklerden bakterilerin hızlı bir şekilde tespit edilmesi hasta için antimikrobiyal tedavi için önemli bir unsurdur. DNA çip teknolojisi kullanılarak patojen bakterilerin teşhis edilmesi araştırmalar sonucu kanıtlanmıştır (Mitterer ve ark 2004). Geleneksel olarak havada bulunan bakteriler sınırlı kültür temelli yöntemler ile izlenilmesi sağlanmaktadır.

Ancak birçok bakteri hücresi aerosol stres örnek koşullarından dolayı kültür edilemeyebilmektedir. PCR, kültür gereksinimi ortadan kaldırmak için hedef nükleik asit sekanslarının tespiti için ve amplifikasyonuna imkân vermektedir. Solid PCR (SP-PCR) ile yapılan çalışmalarda havadaki mikroorganizmaların tespit edilmesinde kullanıldığı ve havada bulunan mantar sporlarının tespitinde kullanılacağı belirtilmiştir (Alvarez ve ark 1994).

2.8.5.3.7. Asimetrik PCR

Asimetrik PCR, DNA dizi analizi ve hibridizasyon problemlerinin kullanıldığı durumlar için DNA'nın çift sarmalından sadece birinin çoğaltılmasına olanak sağlayan bir polimeraz zincir reaksiyon türüdür. Reaksiyonda kullanılacak olan primerlerden birinin miktarı yüksek tutulup çoğunlukla o primerin bağlanacağı bölgenin çoğaltımı sağlanır. Bunun yanı sıra genel çoğaltma prensibi klasik polimeraz zincir reaksiyonunun aynısıdır. Asimetrik PCR yöntemi ile moleküler işaretleme probu kullanılarak adenovirüslerdeki hedef genlerin tespiti, *E. coli* kültür ürünlerinin belirlenmesi, bitki virüslerinin teşhisinde kullanılmaktadır (Karataş 2012).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Araştırma Materyali

Bu çalışmada, Mayıs 2017 tarihlerinde Aydın ili ve çevresinde faaliyet gösteren 4 adet (A, B, C, D tesisleri olmak üzere) farklı süt üretim tesisinden 28 adet svap numunesi ve süt toplama tanklarından 50'şer ml olmak üzere alınan 86 adet çiğ süt örneği steril kaplarda soğuk zincir altında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına getirilerek *S. aureus* düzeyleri ve stafillokal enterotoksinlerin varlığı yönünden incelendi. Toplanan svap numuneleri ve süt numuneleri Tablo 6 ve Tablo 7'de gösterilmektedir.

Tablo 6. Svap numunelerinin toplandığı yerler

NO	Tarih	Saat	Yer	Durum
A	14 Mayıs 2017	18:00	Kaynatma Kazan içi No:5	CIP
A	16 Mayıs 2017	18:00	Kaynatma Kazan içi No:3	CIP
A	16 Mayıs 2017	18:00	Dış Depo Tankı No:3 Hat Girişi	CIP
A	16 Mayıs 2017	18:00	Dış Depo Tankı No:3 Tank içi	CIP
A	14 Mayıs 2017	18:00	Kaynatma Kazanı No :3 Hat Girişi	CIP
A	16 Mayıs 2017	18:00	Tulum Peyniri Pres Tank Hat Girişi	CIP
A	16 Mayıs 2017	18:00	İç Depo Tankı No:2	CIP
A5	8 Mayıs 2017	11:45	84 Araç Tank İçi	Yıkanmamış
A9	8 Mayıs 2017	11:45	7165 Araç Tank İçi	CIP
A13	10 Mayıs 2017	11:45	Depo Tank İçi	CIP
A13	10 Mayıs 2017	11:45	Depo Tank Hat girişi	CIP
B1	9 Mayıs 2017	11:30	Depo Tankı	CIP
B2	11 Mayıs 2017	11:00	Hat Boru Girişi	CIP
B2	11 Mayıs 2017	11:00	Depo Tank	CIP
C6	8 Mayıs 2017	11:00	Depo Tank No:1	-
C6	8 Mayıs 2017	11:00	386 Araç Tankı İçi	Yıkanmamış
C8	8 Mayıs 2017	10:30	386 Araç Tank İçi	Yıkanmış
C8	8 Mayıs 2017	10:30	386 Araç Tank hat girişi	Yıkanmış
C10	10 Mayıs 2017	10:30	Depo Tank içi No:2	CIP

C12	11 Mayıs 2017	10:30	Depo Tank No:2	Yıkanmış
C12	12 Mayıs 2017	10:45	Depo Tank No:4	Yıkanmış
C13	11 Mayıs 2017	10:30	056 Araç Tankı İçi	CIP
C13	12 Mayıs 2017	10:45	056 Araç Tankı Hat Girişi	CIP
D13	13 Mayıs 2017	10:00	İşleme Haznesi	CIP
D13	13 Mayıs 2017	10:00	Mayalama Hattı Girişi	CIP
D4	8 Mayıs 2017	10:30	Depo Tank	Yıkanmamış
D4	8 Mayıs 2017	10:30	Kaynatma Kazanı	Yıkanmamış
D14	16 Mayıs 2017	10:10	Araç Depo Tankı	Yıkanmamış

Tablo 7. Süt numunelerinin toplandığı yerler

Örnek	Alındığı Tarih
A1	4 Mayıs 2017
A1A	5 Mayıs 2017
A1B	5 Mayıs 2017
A3A	6 Mayıs 2017
A3B2	6 Mayıs 2017
A3B1	6 Mayıs 2017
A3S	6 Mayıs 2017
A4	8 Mayıs 2017
A5	8 Mayıs 2017
A6	8 Mayıs 2017
A7	8 Mayıs 2017
A9	8 Mayıs 2017
A10	8 Mayıs 2017
A10A	8 Mayıs 2017
A11	10 Mayıs 2017
A12	10 Mayıs 2017
A13	10 Mayıs 2017
A13A	10 Mayıs 2017
A14	11 Mayıs 2017
A15	11 Mayıs 2017
A16	11 Mayıs 2017
A17	11 Mayıs 2017
A18	11 Mayıs 2017
A19	11 Mayıs 2017
A20	12 Mayıs 2017
A20A1	12 Mayıs 2017
A20A2	12 Mayıs 2017
A21	12 Mayıs 2017
A22M	12 Mayıs 2017

A23M	12 Mayıs 2017
A24M	12 Mayıs 2017
A25	13 Mayıs 2017
A26	13 Mayıs 2017
A27	13 Mayıs 2017
A28	13 Mayıs 2017
A29	13 Mayıs 2017
A30	13 Mayıs 2017
A31	16 Mayıs 2017
A32	16 Mayıs 2017
A33	16 Mayıs 2017
A34	16 Mayıs 2017
A35M	16 Mayıs 2017
A36M	16 Mayıs 2017
B1	8 Mayıs 2017
B1A	8 Mayıs 2017
B2	11 Mayıs 2017
B2A	11 Mayıs 2017
B3	16 Mayıs 2017
B3A	16 Mayıs 2017
C1	4 Mayıs 2017
C2	5 Mayıs 2017
C3	6 Mayıs 2017
C4	6 Mayıs 2017
C5	6 Mayıs 2017
C6	8 Mayıs 2017
C7	8 Mayıs 2017
C8	8 Mayıs 2017
C9	8 Mayıs 2017
C10	10 Mayıs 2017
C11	10 Mayıs 2017
C12	11 Mayıs 2017
C13	11 Mayıs 2017
C12	12 Mayıs 2017
C13	12 Mayıs 2017
C14	12 Mayıs 2017
C15	13 Mayıs 2017
C16	13 Mayıs 2017
C17	16 Mayıs 2017
C18	16 Mayıs 2017
D1B	5 Mayıs 2017
D1A	5 Mayıs 2017
D2	6 Mayıs 2017
D3	8 Mayıs 2017

D4	8 Mayıs 2017
D3A	8 Mayıs 2017
D7	8 Mayıs 2017
D8	10 Mayıs 2017
D8A	10 Mayıs 2017
D9	10 Mayıs 2017
D10	11 Mayıs 2017
D10A	11 Mayıs 2017
D11	12 Mayıs 2017
D12	12 Mayıs 2017
D12A	12 Mayıs 2017
D13	13 Mayıs 2017
D14	16 Mayıs 2017

3.1.2. Besiyerleri

3.1.2.1. Baird Parker Medium (BPM) (Oxoid® CM275)

Tryptone	10,0 gr
Lab-Lemco Powder	5,0 gr
Yeast Extract	1,0 gr
Sodium pyruvate	10,0 gr
Glisin	12,0 gr
Lithium chloride	5,0 gr
Agar	20,0 gr

Besiyerinin pH'sı 6,8-7.0'a ayarlanarak BPM'den 63 gr tartılarak 1000 ml distile su içerisinde karıştırıldı. Elde edilen karışım 121°C'de 15 dk otoklavlanarak steril edildi. Sterilizasyon işleminden sonra 50°C'ye kadar soğutuldu. Karışıma 50 ml Egg Yolk-tellurite emülsiyon ilave edilerek hazırlandı.

3.1.2.2. Mannitol Salt Agar (Merck® 105404)

Pepton	10,0 gr
Meat Extract	1,0 gr
NaCl	75,0 gr
Mannitol	10,0 gr

Phenol Red	0,025 gr
Agar	12,0 gr

Besiyerinin pH'sı 6,8-7.0'a ayarlanarak 108,0 g/L olacak şekilde ısıtılarak distile su içinde eritildi ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edildi. 50 °C'a soğuyunca steril petri kutularına 12.5'er mL döküldü.

3.1.2.3. DNase Test Agar (Merck® 110449)

Tryptose	20,0 gr
NaCl	5,0 gr
Deoxyribonucleic asit	1,0 gr
Phenol Red	0,025 gr
Agar	15,0 gr

Besiyerinin pH'sı 6,8-7.0'a ayarlanarak 42,0 g/L olacak şekilde ısıtılarak damıtık su içinde eritildi ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edildi. 50 °C'a soğuyunca steril petri kutularına 12,5'er mL döküldü.

3.1.2.4. Ringer Tablet (Merck® 1.15525.0001)

500 ml distile suya 1 tablet ilave edilerek karıştırıldı. Karışım 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildi. Daha sonra 50°C'ye kadar soğutuldu ve Numunelerin sulandırılması ve dilüsyonlarının hazırlanması için kullanıldı.

3.1.3. Besiyeri Suplementi

3.1.3.1. Egg Yolk –Tellurite Emulsion % 20 (Merck 1.03785.0001)

Steril Egg Yolk (Yumurta Sarısı)	200 ml
NaCl	4.25 gr
Yeast Extract	1.0 gr
Potassium tellurite	2.1 gr

1 litre steril ve 50 °C'ye kadar soğutulan besiyerine 50 ml Egg Yolk -tellurite emülsiyon ilave edilerek örneklerin bakteriyolojik analizinde kullanılacak besiyeri hazırlandı.

3.1.4. Ayıraçlar

3.1.4.1. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) (Merck 1.08597.1000)

S. aureus'un *Streptococcus* sp.'lerden ayırımında kullanıldı.

3.1.4.2. Bactident® Coagulase (Merck 1.13306.0001)

S. aureus identifikasyonu aşamasında kullanıldı.

3.1.5. ELISA Test Kiti

3.1.5.1. Ridascreen® SET Total (R-Biopharm, Germany, Art. No:R4105)

1 x Mikrotiter plate 96 kuyucuklu

1 x Pozitif kontrol 2 ml, SET A,B,C,D,E içermektedir; c=2 ng/ml

1 x Negatif kontrol 2 ml

1xKonjugat 1, 11 ml

1xKonjugat 2, 11 ml

1xSubstrat/kromojen 13ml

1xKromojen 7ml, tetrametil benzidin

1xStop solusyon 13ml

10x WashBuffer pH 7.2, 100 ml

Süt örneklerindeki *Staphylococcus aureus* enterotoksininin varlığının araştırılması ELISA tekniği ile SET A, B, C, D, E Total test kiti (Ridascreen®, Germany) kullanılarak gerçekleştirildi. Analiz prosedürü üretici firmanın talimatları doğrultusunda uygulandı.

3.1.6. Pozitif Kontrol

Araştırmamızda pozitif kontrol olarak Anabilim Dalı stoklarında bulunan *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach ATCC® (25923) kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Çiğ Süt Örneklerinden *S. aureus* İzolasyonu

Analizi yapılan çiğ süt örneklerinde *S. aureus* sayımı TSE 6582 ISO 6888 (2001) standardı çerçevesinde gerçekleştirildi. Numuneler, aseptik şartlarda stomacher torbalarına 10'ar ml olacak şekilde alınıp, üzerine 90 ml steril fizyolojik peptonlu su ilave edilerek karıştırıcıda 2 dakika boyunca homojenize edildi. Homojenize edilen örneklerden 10⁻²'ye kadar seri dilüsyonlar hazırlandı. Bu dilüsyonlardan Egg yolk-Tellurite Emulsion içeren Baird Parker agara yüzeyde yayma plak yöntemiyle inokulasyon yapıp, 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından etrafı şeffaf hare ile çevrili, gri ve siyah renkli karakteristik koloniler *S. aureus* şüpheli koloniler olarak değerlendirildi. Şüpheli kolonilere gram boyama, DNAaz testi, mannitol fermentasyonu, lam koagülaz testi ve katalaz testi uygulandıktan sonra, pozitif sonuç veren koloniler *S. aureus* olarak değerlendirildi.

3.2.1.1. Gram Boyama

S. aureus şüpheli olarak ön identifikasyonu yapılan ve saflaştırılan bakteriler Gram boyama tekniği ile boyandı (Downes ve Ito 2001). Bu amaçla lam üzerinde % 0.9 NaCl içerisinde çözündürülen bakteriler ateşte fikse edildikten sonra 2 dakika kristal viyole, yıkamayı takiben 1 dakika iodine ve 15 saniyeyi % 95 etanol ile muamele edildi. Karşıt boyaması için 30 saniye safranin içerisinde bekletildi. Mikroskop altında 100x objektifte bakterilerin renkleri ve morfolojileri incelenmiş olup Gram pozitif ve tek ya da ikili veya üzüm salkımı morfolojisinde düzensiz kümelenmiş mikroorganizmalar *Staphylococcus* sp. şüpheli olarak identifikasyonlarına devam edildi.

3.2.1.2. DNAaz Testi

S. aureus izolatları, DNAaz enzimi üretmekte ve koloni etrafındaki DNA'yı yapısal birimleri olan nükleotidlerine parçalamaktadır. Bu amaçla öncelikle şüpheli koloniler DNAaz agara öze yardımıyla geçildi ve 37°C'de, 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası petri yüzeyini kaplayacak biçimde, 1N HCl ilave edildi ve DNA'nın HCl ile muamelesi sonrası presipitasyon varlığı incelendi. Sonuç olarak DNA'nın mikroorganizmalar tarafından kullanılmayan bölgeleri mat, *S. aureus* tarafından bakteri

DNAaz enzimi sayesinde DNA'nın parçalandığı bölgelerde şeffaf zonlar gözlemlendi ve bu sonucu veren koloniler DNAaz pozitif olarak değerlendirildi (Koneman ve ark 2006).

3.2.1.3. Katalaz Testi

Bakteri kültüründen alınmış birkaç koloni temiz bir lam üzerinde birkaç damla % 3'lük H₂O₂ ile karıştırıldı. Gaz kabarcıklarının çıkması katalaz pozitif olarak değerlendirildi (Koneman ve ark 2006).

3.2.1.4. Mannitol Fermentasyonu

Besiyeri bileşimindeki yüksek tuz konsantrasyonu refakatçi floranın gelişimini baskılamaktadır. Mannitol *S. aureus*'un gelişimini desteklerken, aynı zamanda koloni etrafında fenol red ile belirlenen sarı zon oluşumunu sağlamaktadır. BPA'da gelişen *S. aureus* izolatları Mannitol Salt Agar'a pasajı yapıldı. Besiyerinin fenol kırmızısı renginin sarıya dönüşmesi mannitol fermentasyonu açısından pozitif olarak değerlendirildi (Muratoğlu 2010).

3.2.1.5. Lam Koagülaz Testi

Temiz bir lam üzerine 1 damla EDTA'lı tavşan plazması damlatılarak bir öz dolusu *S. aureus* şüpheli koloni ile süspansiyon edildi. On saniye içinde tebeşir tozu görünümünde aglutinasyon oluşup oluşmadığı gözlemlendi. Her izolat için steril serum fizyolojik kullanılarak testin kontrolü yapıldı (Koneman ve ark 2006).

3.3. ELISA

Aseptik şartlarda alınan ve soğuk zincirde laboratuara getirilen çiğ süt numuneleri ticari kitin prosedüründe (r-biopharm® AG, Darmstadt, Germany. Art. No.:R4105) belirtilen şekilde hazırlanarak 10 °C'de 5000 rpm devirde 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra yüzeyde oluşan süpernatant kısım dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Kit ve reaktifler kullanım öncesi oda sıcaklığına getirildikten sonra, her sterili bir izolat için kullanılan mikrotiter plağın A-G'ye kadar olan kuyucuklarına uzaklaştırma işleminin ardından kalan plazmadan 100 µl, H kuyucuğuna ise pozitif

kontrolden 100 µl konulduktan sonra kuyucukların içindeki sıvıların iyice karışması sağlanıp 37 °C’de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda plaklar uygun şekilde boşaltılarak, kullanım talimatlarına uygun olarak hazırlanmış olan yıkama solüsyonundan her bir kuyucuğa 300 µl yıkama solüsyonu konularak yıkandı. Kuyucukların yıkama solüsyonu ile yıkanması işlemi 5 kez tekrar edildi ve her işlem sonrasında bu sıvı tamamen boşaltıldı. Yıkama yapılan kuyucukların üzerine 100 µl enzim konjugat 1 ilave edilip 37 °C’de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında tekrar kuyucuklardaki sıvılar boşaltılıp 5 kez yıkama işlemi gerçekleştirildi. Yıkama sonrasında kuyucuklara 100 µl enzim konjugat 2 ilave edildi ve 37 °C’de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Yine kuyucuklardaki sıvılar boşaltılıp 5 kez yıkama işlemi tekrar edildi. Yıkama yapılan kuyucuklara bu kez substrat-kromojen karışımından 100 µl ilave edilip 37 °C’de 15 dakika inkübasyonu takiben yıkama işlemi yapılmadan kuyucuklara 100 µl stop solüsyonu eklendi ve 30 dk içerisinde 450/620 nm absorbans değerinde ELISA cihazı okuyucusunda (Thermo® MultiSkan) okuma işlemi gerçekleştirildi.

Her bir örnek için F ve G kuyucuklarında bulunan negatif kontrollerin Optik Dansite (OD) değerlerinin aritmetik ortalamasına 0.15 ekleyerek eşik değer belirlendi. Buna göre örneklerin OD değerleri eşik değerinin altında ise negatif, eşit veya üzerinde ise pozitif olarak kabul edildi.

ELISA testi aşamasında kullanılan kit, yıkama ve okuyucu cihazı, mikropleyt görüntüleri Resim 1, Resim 2, Resim 3 ve Resim 4’de gösterilmiştir.



Resim 1. ELISA kit içeriği



Resim 2. Otomatize Mikropleyt Yıkama Cihazı



Resim 3. ELISA Mikropleyt Okuyucu Cihaz



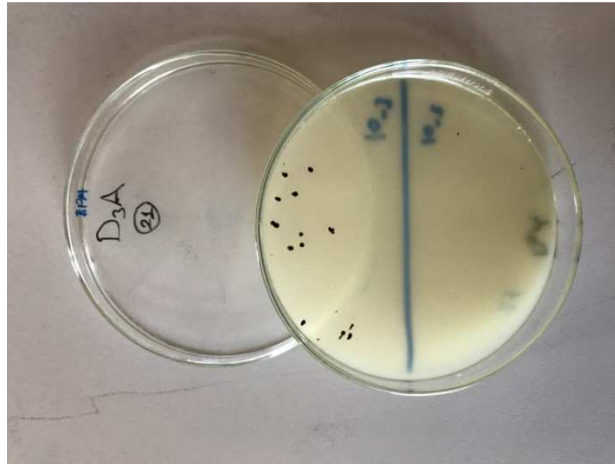
Resim 4. ELISA reaksiyonunda kullanılan mikropleyt

4. BULGULAR

Bu çalışmada, Mayıs 2017 tarihlerinde Aydın ili ve çevresinde faaliyet gösteren 4 adet (A, B, C, D tesisleri olmak üzere) farklı süt üretim tesisinden 28 adet svap numunesi ve süt toplama tanklarından 50'şer ml olmak üzere alınan 86 adet çiğ süt örneği steril kaplarda soğuk zincir altında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına getirilerek *S. aureus* düzeyleri ve stafilokkal enterotoksinlerin varlığı yönünden incelendi. Svap numunelerinden izole edilen *S. aureus* kolonileri Resim 5'de, süt numunelerinden izole edilen *S. aureus* kolonileri ise Resim 6'de gösterilmektedir. Svap numunelerinden izole edilen *S. aureus* sayıları Tablo 8'de, süt numunelerinden izole edilen *S. aureus* sayıları ve stafilokkal enterotoksin varlığı ise Tablo 9'da sunulmuştur.



Resim 5. Svap numunelerinden izole edilen *S. aureus* kolonileri



Resim 6. Süt numunelerinden izole edilen *S. aureus* kolonileri

Tablo 8. Svap numunelerinden izole edilen *S. aureus* sayıları

NO	Tarih	Saat	Yer	Durum	<i>S. aureus</i> (kob/ml)
A30	14 Mayıs 2017	18:00	Kaynatma Kazan içi No:5	CIP	Üreme olmadı
A31	16 Mayıs 2017	18:00	Kaynatma Kazan içi No:3	CIP	Üreme olmadı
A32	16 Mayıs 2017	18:00	Dış Depo Tankı No:3 Hat Girişi	CIP	$4.2 \times 10^1 - 5.2 \times 10^1$
A33	16 Mayıs 2017	18:00	Dış Depo Tankı No:3 Tank içi	CIP	$4.2 \times 10^1 - 5.2 \times 10^1$
A34	14 Mayıs 2017	18:00	Kaynatma Kazanı No :3 Hat Girişi	CIP	$5.8 \times 10^1 - 6.2 \times 10^4$
A35	16 Mayıs 2017	18:00	Tulum Peyniri Pres Tank Hat Girişi	CIP	Üreme olmadı
A36	16 Mayıs 2017	18:00	İç Depo Tankı No:2	CIP	Üreme olmadı
A5	8 Mayıs 2017	11:45	84 No'lu Araç Tank İçi	Yıkanmamış	$5.8 \times 10^1 - 6.2 \times 10^4$
A9	8 Mayıs 2017	11:45	7165 No'lu Araç Tank İçi	CIP	Üreme olmadı
A13	10 Mayıs 2017	11:45	Depo Tank İçi	CIP	Üreme olmadı
A13	10 Mayıs 2017	11:45	Depo Tank Hat girişi	CIP	Üreme olmadı
B1	9 Mayıs 2017	11:30	Depo Tankı	CIP	$5.8 \times 10^1 - 6.2 \times 10^4$
B2	11 Mayıs 2017	11:00	Hat Boru Girişi	CIP	$4.2 \times 10^1 - 5.2 \times 10^1$
B2	11 Mayıs 2017	11:00	Depo Tank	CIP	$4,2 \times 10^1 - 5,2 \times 10^1$
C6	8 Mayıs 2017	11:00	Depo Tank No:1	-	$5.8 \times 10^1 - 6.2 \times 10^4$
C6	8 Mayıs 2017	11:00	386 No'lu Araç Tankı İçi	Yıkanmamış	Üreme olmadı
C8	8 Mayıs 2017	10:30	386 No'lu Araç Tank İçi	Yıkanmış	Üreme olmadı
C8	8 Mayıs 2017	10:30	386 No'lu Araç Tank hat girişi	Yıkanmış	$5.8 \times 10^1 - 6.2 \times 10^4$
C10	10 Mayıs 2017	10:30	Depo Tank içi No:2	CIP	$4.2 \times 10^1 - 5.2 \times 10^1$
C12	11 Mayıs 2017	10:30	Depo Tank No:2	Yıkanmış	$3.0 \times 10^2 - 1.3 \times 10^3$
C12	12 Mayıs 2017	10:45	Depo Tank No:4	Yıkanmış	$5.8 \times 10^1 - 6.2 \times 10^4$
C13	11 Mayıs 2017	10:30	056 No'lu Araç Tankı İçi	CIP	$5.8 \times 10^1 - 6.2 \times 10^4$
C13	12 Mayıs 2017	10:45	056 No'lu Araç Tankı Hat Giriş	CIP	$5.8 \times 10^1 - 6.2 \times 10^4$
D13	13 Mayıs 2017	10:00	İşleme Haznesi	CIP	$1.6 \times 10^2 - 3.0 \times 10^4$
D13	13 Mayıs 2017	10:00	Mayalama Hattı Girişi	CIP	$5.8 \times 10^1 - 6.2 \times 10^4$
D4	8 Mayıs 2017	10:30	Depo Tank	Yıkanmamış	Üreme olmadı
D4	8 Mayıs 2017	10:30	Kaynatma Kazanı	Yıkanmamış	$5.8 \times 10^1 - 6.2 \times 10^4$
D14	16 Mayıs 2017	10:10	Araç Depo Tankı	Yıkanmamış	$5.8 \times 10^1 - 6.2 \times 10^4$

Toplanan svap numunelerinin bulguları açısından, A, B, C, D işletmelerinden toplanan svap numunelerinden; CIP (otomantik temizleme) ve diğer yıkama prosedürü uygulanmasına rağmen Dış Depo Tankları, Tank içi, Kaynatma kazanı ve Mayalama hatlarından alınan numunelerde yoğun miktarda *S. aureus* varlığı saptanmıştır. Aynı şekilde araç tank içi ve girişlerinden de yoğun miktarda *S. aureus* varlığı saptanmıştır.

Tablo 9. Süt numunelerinden izole edilen *S. aureus* sayıları ve Stafilokkal enterotoksin varlığı

Örnek	Alındığı Tarih	Stafilokkal Enterotoksin	<i>S. aureus</i> (kob/ml)
A1	4 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
A1A	5 Mayıs 2017	Rastlanmadı	Üreme olmadı
A1B	5 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
A3A	6 Mayıs 2017	Rastlanmadı	$3.0 \times 10^2 - 1 \times 10^3$
A3B2	6 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
A3B1	6 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
A3S	6 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
A4	8 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
A5	8 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
A6	8 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
A7	8 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
A9	8 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
A10	8 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
A10A	8 Mayıs 2017	Rastlanmadı	Üreme olmadı
A11	10 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
A12	10 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
A13	10 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
A13A	10 Mayıs 2017	Rastlanmadı	Üreme olmadı
A14	11 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
A15	11 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
A16	11 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
A17	11 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
A18	11 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
A19	11 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
A20	12 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
A20A1	12 Mayıs 2017	Rastlanmadı	$<1.0 \times 10^1$
A20A2	12 Mayıs 2017	Rastlanmadı	Üreme olmadı
A21	12 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
A22M	12 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
A23M	12 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
A24M	12 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
A25	13 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
A26	13 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
A27	13 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
A28	13 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
A29	13 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
A30	13 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
A31	16 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
A32	16 Mayıs 2017	Rastlanmadı	

A33	16 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
A34	16 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
A35M	16 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
A36M	16 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
B1	8 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
B1A	8 Mayıs 2017	Rastlanmadı	Üreme olmadı
B2	11 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
B2A	11 Mayıs 2017	Rastlanmadı	Üreme olmadı
B3	16 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
B3A	16 Mayıs 2017	Rastlanmadı	Üreme olmadı
C1	4 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
C2	5 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
C3	6 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
C4	6 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
C5	6 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
C6	8 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
C7	8 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
C8	8 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
C9	8 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
C10	10 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
C11	10 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
C12	11 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
C13	11 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
C12	12 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
C13	12 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
C14	12 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
C15	13 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
C16	13 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
C17	16 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
C18	16 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
D1B	5 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
D1A	5 Mayıs 2017	Rastlanmadı	Üreme olmadı
D2	6 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
D3	8 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
D4	8 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
D3A	8 Mayıs 2017	Rastlanmadı	$2.1 \times 10^1 - 1.0 \times 10^3$
D7	8 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
D8	10 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
D8A	10 Mayıs 2017	Rastlanmadı	$< 1.0 \times 10^1 - 3.0 \times 10^2$
D9	10 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
D10	11 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
D10A	11 Mayıs 2017	Rastlanmadı	Üreme olmadı
D11	12 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
D12	12 Mayıs 2017	Rastlanmadı	

D12A	12 Mayıs 2017	Rastlanmadı	Üreme olmadı
D13	13 Mayıs 2017	Rastlanmadı	
D14	16 Mayıs 2017	Rastlanmadı	

Tablo 9’da görüldüğü gibi Aydın ilindeki işletmelerden alınan 86 adet süt örneği içerisinde 14 adedi, TGK 2000/6 Numaralı Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği’nde belirtildiği koşullarda altında ısıl işlem uygulanmış sütler olup, örneklerin 4 (% 29) adedinde *S. aureus* izolasyonu saptanmıştır. Saptanan izolelerin hiç birisinde toksin sentezleyebilecek popülasyon sağlanamıştır. 86 adet süt örneğinin tamamının (% 100) Türk Gıda Kodeksi, 2009/14 Tebliğ numaralı, Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliğinde Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliğ’e göre *S. aureus* sayısı bakımından uygun olduğu saptanmıştır. İncelenen toplam 86 örneğin hiçbirinde stafilokokkal enterotoksin (SET A, B, C, D, E Total) varlığı belirlenememiştir.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada Araştırmamızda, Aydın ilindeki farklı üretim tesislerinde çeşitli noktalardan örneklerinde *Staphylococcus aureus* izolasyonu ve ürüne işlenecek olan çiğ süt örneklerinde *Staphylococcus aureus* ve enterotoksinlerin varlığı ELISA metodu ile tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Sürdürülebilir sağlıklı bir yaşam için, günlük beslenme ve diyet uygulamalarında sıklıkla süt ve süt ürünleri tercih edilmektedir. Süt ve süt ürünleri gelişme çağındaki olan bebekler ve çocuklar tarafından fiziksel ihtiyaçların karşılanması amacı ile günlük diyetlerinin önemli bir kısmını oluşturmak durumundadır. Ancak sütte diğer kontaminantların yanısıra özellikle mikrobiyel kontaminantların bulunması sağlık açısından belli riskleri de beraberinde getirmektedir. Çeşitli önemli patojen etkenlerin sütte ve süt ürünlerinde bulunması istenmemektedir. Bu patojen etkenlerden birisi de *S. aureus*'dur. Çiğ sütte *S. aureus* varlığı toplum sağlığı açısından oldukça önem arz etmektedir (Nassasra 2011).

Çiğ süt çoğu patojen için olduğu gibi *S. aureus* için de uygun bir ortamdır. Sütler normal şartlar altında ve hijyenik kurallara uyularak hazırlansa bile, belli sayıda mikroorganizma bulundurabilmektedir. *S. aureus* süte sağıldığı hayvandan bulaşmaktadır. Özellikle mastitisli hayvanlardan sağılan sütler enteropatogenik *S. aureus* suşlarının önemli bir kaynağıdır. Çiğ sütte bulunan *S. aureus* hayvanın meme kanallarından, vücudundan, havadan, sudan ve süt sağımında kullanılan aletler-ekipmanlar ile muhafazası sırasında buldukları kaplardan gelebilmektedir (Gülbandılar 2006, Çakır 2007).

Çiğ sütlerde *S. aureus* açısından yapılan çalışmalarda farklı izolasyon oranları bildirilmiştir. Jorgensen ve ark (2005) Norveç'te inek ve keçi sütleri ile içinde peynir örneklerinin de bulunduğu çiğ süttten yapılan ürünlerde enterotoksijenik *S. aureus* varlığını inceledikleri bir çalışmada inek sütlerinin % 75 düzeyinde *S. aureus* ile kontamine olduğunu bulmuşlardır. Normanno ve ark (2005) İtalya'da 2000-2002 yılları arasında yaptıkları bir çalışmada 437 adet çiğ süt örneğinden 168 (% 38.4) adedinin koagülaz pozitif *S. aureus* içerdiğini belirtmişlerdir. Nohutçu (2005) yaptığı çalışmada 190 adet çiğ süt örneğinden 55 (% 35) adet, Gündoğan ve ark (2012) da, 60 çiğ süt örneğinden 60 (% 100) adet *S. aureus* izole ettiklerini açıklamışlardır. Morandi ve ark (2007) izole ettikleri 112 adet *S. aureus*'un 86'sının çiğ sütlerden 26'sının çiğ sütlerden hazırlanan ürünlerden olduğunu bildirmişlerdir. Rall ve ark (2008) da Brezilya'da yaptıkları çalışmada klasik

kültürel metotlarla 54 çiğ süt örneğinden 38 adet (% 70) *S. aureus* izole etmişlerdir. Virgin ve ark (2009), yaptıkları çalışmada incelenen 542 süt örneğinin 218'inde (% 40.22) *S. aureus* olduğunu belirlemişlerdir. Diğer bir çalışmada Garcia ve ark (2009), İspanya'da 75 süt örneğinin hepsinde (% 100) *S. aureus* saptamışlardır. Yılmaz ve Gönülalan (2010), Kayseri ilinde yaptıkları çalışmada toplam 60 adet çiğ süt örneğinin 30'unun Türk Gıda Kodeksi 2000/6 Tebliğ numaralı, Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği'ne *S.aureus* sayısı yönünden uygun olmadığını bildirmişlerdir. Gönülalan ve Ertaş (2010) inceledikleri 100 süt örneğinin 60'ında (% 60) *Staphylococcus* spp. üremesi tespit etmişlerdir. İnceledikleri 300 izolata yaptıkları katalaz ve koagülaz testi ile izolatlardan 42'sinin (% 14) *S. aureus* olduğunu belirlemişlerdir.

Yapılan çalışmalar incelendiğinde genel olarak çiğ sütte yüksek oranlarda *S. aureus* izole edilebildiği görülmektedir. Çalışmamızda 86 adet çiğ sütlerden % 4.65 oranında *S. aureus* izole edilmiş olması, örnek alınan işletmelerdeki süt tanklarındaki hijyen kalitesinin yeterli olmasıyla ilişkilendirilebilir. Süt numunelerinde *S. aureus* olmamasına rağmen, araç tanklarından alınan numunelerde çıkan yüksek miktar *S. aureus* sayıları, üretim tesislerinden ısıl işlemlerin doğru uygulandığını, fakat CIP prosedürlerinin ve diğer hijyenik uygulamaların yetersiz olduğunu göstermektedir.

Gıdalarda *S. aureus*'un gelişmesi ve toksin oluşturması birçok faktöre bağlıdır. Bunlar pH, tuz miktarı, a_w değeri, rekabetçi mikroflora ve gıda maddesinin kimyasal içeriğidir. Bununla birlikte gıdada bulunan rekabetçi floranın engelleyici veya destekleyici etkisinin de bulunduğunu belirtilmiştir (Sancak ve ark 2006).

Genel olarak enterotoksijenik *S. aureus*'ların gıdada 10^6 kob/g veya daha büyük düzeyine ulaşmaları sonucu yeterli miktarda toksin oluşabilir. İnsanlarda intoksikasyon oluşturacak minimum düzeydeki enterotoksini üretebilen minimum hücre sayısı, suşun tipi, toksin tipi ve substrata (gıdanın kompozisyonu, sıcaklık ve diğer fiziksel ve kimyasal parametreler gibi) bağlı olarak değişiklik gösterir. Saptanabilir düzeyde SEA yaklaşık 10^4 kob/g'a kadar düşük sayıdaki hücre tarafından üretilebilmektedir. SEA, SEB ve SED üreten *S. aureus* suşunda hücre sayısı 6×10^6 kob/ml olduğunda üretilen SEA miktarı 1 ng/ml iken sayı 3×10^7 kob/ml düzeyine yükseldiğinde 4 ng/ml düzeyine ulaşmıştır (Erol 2007, Ünlütürk ve Turantaş 1999).

Çiğ sütlerle ilgili yapılan çalışmalarda farklı düzeylerde enterotoksin varlığı bildirilmiştir. Umoh ve ark (1990) inceledikleri 42 inek sütünün 13'ünün enterotoksijenik *S. aureus* içerdiğini ve bu izolatların 5'inden SEA, 3'ünden SED saptandığını

belirtmişlerdir. Lamprell ve ark (2004) Fransa'da çiğ süttten yapılan peynirlerden izole edilen 852 *S. aureus* izolatından 63'ünün (% 7,3) enterotoksijenik olduğu ve çalışmadan farklı olarak, izolatların en çok SED'yi ürettiği bulunmuştur. Jorgensen ve ark (2005) Norveç'teki çiğ sütlerden yaptıkları çalışmada en çok SEC toksininin tespit edildiğini bildirmişlerdir. Normanno ve ark (2005) tarafından süt ve süt ürünlerine ait 364 izolattan 362'si *S. aureus* olarak tanımlanmış ve 362 izolattan 217'sinin (% 59,9) enterotoksijenik olduğu belirlenmiştir. SEC'nin kontamine süt ve süt ürünlerinin tüketimine bağlı ortaya çıkan stafilkokkal intoksikasyonların önemli bir nedeni olabileceği bildirilmektedir, fakat çalışmamızda SEC enterotoksini saptanmamıştır.

Joffe ve Baranovics (2006) tarafından yürütülen çalışmanın sonucunda, Letonya'da marketlerde satışa sunulan süt ve süt ürünü örneklerinin % 44.1, mastitisli sütlerin % 25, çiğ süt örneklerinin ise % 22.5 düzeyinde *S. aureus* ile kontamine olduğu bulunmuştur. Enterotoksijenik *S. aureus*'un % 77.3 düzeyinde en çok mastitisli sütlerden izole edildiği ve izolatların en çok SEA ürettikleri belirtilmiştir. Sonuç olarak, mastitisin süt ve süt ürünlerinin enterotoksijenik *S. aureus* ile kontaminasyonunda önemli bir rol oynayabileceği ifade edilmektedir.

Fujikawa ve Morozumi (2006), UHT sütlerde *S. aureus* ve enterotoksin üretimine ilişkin bir model üzerinde çalışmışlardır. Geliştirdikleri modele göre sütte bulunan *S. aureus* sayısı $10^{6.5}$ kob/ml düzeyine erişinceye kadar toksin üretiminin ve bakteri sayısını arasında pozitif bir ilişki olduğunu ortaya koymuşlardır. Aynı modele göre 14 °C ve 32 °C'ler arasında sıcaklıkta muhafazanın toksin üretiminin olumlu yönde etkilendiğini belirlemişlerdir.

Cremonesi ve ark (2006), İtalya'da büyükbaş ve küçükbaş hayvanların sütleri ile yaptıkları çalışmada; 111 örneğin hepsinde koagülaz pozitif *S. aureus* saptamışlardır. Örneklerin 95 tanesi (% 86) enterotoksinlerden en az birini içerdiğini bildirmişlerdir. 73 büyükbaş süttünden 58 adedinde (% 79), 38 küçükbaş süttünden 37'sinde (% 97) enterotoksin belirlemişlerdir.

Soejima ve ark (2007), yağsız süttü *S. aureus* ile kontamine ederek 35 °C'de inkübe etmişler ve bu koşulların *S. aureus* gelişimini ve SEA üretimini hızlandırdığını bildirmişlerdir.

Boynukara ve ark (2008), 408 süt numunesinden elde ettikleri 106 *S. aureus* suşunun 27 tanesinin enterotoksijenik olduğunu belirtmişlerdir. 25 suşun SEA, 2 suşun SEB yönünden pozitif olduğu bildirilmiştir.

Yılmaz ve Gönülalan (2010), Kayseri ilinde yaptıkları çalışmada toplam 60 adet çiğ süt örneğinin 37 adedinin Stafilokokkal enterotoksinlerin varlığı yönünden, Türk Gıda Kodeksi yönetmeliği gıda maddelerindeki bulaşanların maksimum limitleri hakkındaki 2008/26 nolu tebliğ'e uygun olmadığını bildirmişlerdir. 19 örneğin SEA, 3 örneğin SEB, 9 örneğin SEC, 6 örneğin SED yönünden pozitif olduğunu bildirmişlerdir.

Gönülalan ve Ertaş (2010) inceledikleri 100 süt örneğinin 28 adedinde SE varlığını belirtmişlerdir. Numunelerdeki SE'lerin 10'unun (% 35.7) SEA, 2'sinin (% 7.1) SEB, 5'inin (% 17.8) SEC, 9'unun (% 32.2) SED ve 2'sinin (% 7.1) hem SEA hem de SED olduğunu saptamışlardır.

Çalışmamızda 4 adet farklı işletmeden alınan toplam 96 adet çiğ süt örneğinin hiç birisinde stafilokokkal enterotoksin varlığına rastlanmamıştır. Çalışmamızda *S. aureus* düzeylerinin toksin oluşturabilecek sayıya ulaşamadığı kanaatine varılmıştır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Araştırmada, Aydın ilinde bulunan işletmelerden toplanan çiğ sütler, *S. aureus* ve enterotoksin varlığı yönünden incelenmiştir. Analiz edilen çiğ süt örneklerinin hiçbirinde Stafafilokokkal enterotoksin bulunmamış, ayrıca *S. aureus* sayıları bakımından halk sağlığı açısından güvenli seviyede bulunmuştur.

Çalışmamızda elde edilen verilere göre çiğ sütlerde *S. aureus* açısından oluşabilecek riskleri en aza indirmek için uygulanması gereken genel önlemlere aşağıda değinilmiştir.

- Sütün taşınması, depolanması ve işlenmesinde kişisel hijyen kurallarına uyulması,
- Çapraz kontaminasyonun önlenmesi,
- Süt ile temas halindeki personelin yeterli hijyen eğitimine sahip olması,
- Sütün uygun sıcaklıklarda muhafazanın sağlanmasıdır.

Sonuç olarak, Aydın ilindeki işletmelerden alınan ve perakende satış ile tüketicinin alımına sunulan çiğ sütlerin güvenli bir gıda maddesi olarak düşünülmesinin, sağlıklı beslenme yolunda bir risk arz etmediği ortaya konulmuştur. Üreticinin, perakendecinin, tüketicinin; hayvan sağlığı, hayvan refahı, hijyen ve sanitasyon, gıda güvenliği ve tehlikeleri konusunda, sorumluluk sahibi kamu kurum ve kuruluşları, medya ve sivil toplum örgütleri tarafından artan bir şekilde bilgilendirilmesinin önemli bir görev ve sorumluluk olarak kabul edilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Acco M, Ferreira FS, Henriques JAP, Tondo EC.** Identification of multiple-resistant strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. *Food Microbiology* 2003, 20, 489-93.
- Akan M, Diker KS, Çarlı T, Yardımcı H, Şen A, Sareyyüpoğlu B.** Veteriner Mikrobiyolojisi ve Epidemiyolojisi. Açıköğretim Fakültesi Yayınları, Ankara, 2013, 14-27.
- Akçam FS, Tinaz BG Kaya O, Tigli A, Türe E, Hoşoğlu S.** Evaluation of methicillin resistance by cefoxitin disk diffusion and PBP2a latex agglutination test in mecA-positive *Staphylococcus aureus* and comparison of mecA with femA, femB, femX positivities. *Microbiological Research* 2007, 164(4), 400-403.
- Alvarez JA, Buttner PM, Toranzos AG, Dvorsky AE, Toro A, Heikes BT, Mertikas-Pifer EL, Stetzenbach DL.** Use of Solid-Phase PCR for Enhanced Detection of Airborne Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 1994, 1, 374-376.
- Ameh JA, Edgbe-Nwiyi T, Zaria LT.** Prevalence of bovine mastitis in Maiduguri, Borno State, Nigeria. *Veterinarski Arhiv* 1999, 69, (2): 87-95.
- Arda M, Minbay A, Leloğlu N, Aydın N, Akay Ö, Ilgaz A, İzgür, Diker KS.** Özel Mikrobiyoloji. Medisan Yayınevi 2006, Ankara, 5-9.
- Atanassova V, Meindl A, Ring C.** Prevalence of *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham a comparison of classical culturing detection and RFLP- PCR. *Journal of Food Protocols*, 2001, 63, 1144-1153
- Aydın N, Paracıkoğlu J.** Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). İlke Emek Yayıncılık, Ankara, 2006, 12-25.
- Belay N, Rasooly A.** *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin A production in anaerobic environment. *Journal of Food Protocols* 2002, 65, 199-204.
- Bergdoll MS.** *Staphylococcus aureus*. *Journal-Association of Official Analytical Chemists* 1991, 74, 706 710.
- Bilgehan H.** Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları, İzmir, 2004, 31, 507-509.
- Bone FJ, Bogie D, Morgan-Jones SC.** Staphylococcal food poisoning from sheep milk cheese. *Epidemiology and Infection* 1989, 103, 449-458.

- Boynukara B, Gulhan T, Alişarlı M, Gurturk K, Solmaz H.** Classical enterotoxigenic characteristic of *Staphylococcus aureus* strain isolated from bovine subclinical mastitis in Van, Turkey. *International Journal of Food Microbiology* 2008, 125, 209-211.
- Brakstad OG, Maeland JA, Chesneau O.** Comparison of tests designed to identify *Staphylococcus aureus* thermostable nuclease. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 1995, 103(3), 219-24.
- Brett MM.** Kits for detection of food poisoning toxins produced by *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. *Methods in Bioechnology* 2006, 21(1), 91-98.
- Bustin SA, Mueller R.** Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and potential use in clinical diagnosis. *Clinical Science* 2005, 109, 365-379.
- Buzby JC, Roberts T.** Economic costs and trade impacts of microbial foodborne illness. *World Health Statistics Quarterly* 1997, 50, 57-66.
- Carpenter DF, Silverman GJ.** Staphylococcal enterotoxin B and nuclease production under controlled dissolved oxygen conditions. *Applied Microbiology* 1974, 28, 628-637.
- Cengiz AT.** *Staphylococcus aureus*. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Guneş Kitabevi, Ankara, 1999, 339-346.
- Couch JL, Soltis MT, Betley MJ.** Cloning and nucleotide sequence of the type E Staphylococcal enterotoxin gene. *Journal of Bacteriology* 1988, 170, 2954-2960.
- Cremonesi P, Vimercati C, Pisoni G, Castiglioni B, Luzzana M, and Ruffo G.** Identification of enterotoxin genes *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and caprine milk. *Veterinary Research Communications*, 2006, 30, 41-243.
- Çakır P.** Gıda ve insan kaynaklı *Staphylococcus aureus* strainlerinin karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2007.
- Çetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG.** Vancomycin resistant enterococci. *Clinical Microbiology Reviews* 2000, 13, 686-707.
- Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM.** Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews* 2000, 13(1), 16-34.
- Domenech A, Hernandez FJ, Orden JA, Goyache J, Lopez B, Suarez G, Gomez-Lucia E.** Effect of six organic acids on staphylococcal growth and enterotoxin production. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung* 1992, 194, 124-128.
- Downes FP, Ito K.** Compendium methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association, Washington DC, 2001, 72-77.

- Edel V.** Polymerase Chain Reaction in Mycology: an Overview. CAB1 Publishing, Wallingford, 1998, 1-20.
- Erol İ.** Besin Hijyeni ve Mikrobiyolojisi, Ders Notu. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Ankara, 2003, 4-11.
- Erol İ, Mutluer B, Vatansever L.** A tipi enterotoksin oluşturan *Staphylococcus aureus*'un çiğ köftede üreme ve toksin oluşturma yeteneğinin belirlenmesi. *Gıda* 1996, 18, 315-318.
- Erol İ, Usca A.** Donmuş piliç karkaslarında izole edilen koagulaz pozitif stafilokokların enterotoksin oluşturma yeteneklerinin SET-RPLA testi ile belirlenmesi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 1996, 43, 443-448.
- Erol İ, İşeri Ö.** Staphylococcal enterotoksinler. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2004, 51, 239-245.
- Erol İ.** *Staphylococcus aureus*. Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi, Ankara, 2007, 12-17.
- Evenson ML, Hinds MW, Bernstein RS, Bergdol MS.** Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *International Journal of Food Microbiology* 1988, 7, 311.
- Fujikawa H, Morozumi S.** Modeling *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in milk. *Food Microbiology* 2006, 23, 260-267.
- Fung DYC.** Rapid methods and automation in microbiology: 25 years of development and predictions. *Bulletin of Technical University of Istanbul* 2006, 54(4), 45-55.
- Garcia P, Madera C, Martinez B, Rodriguez A, Suarez JE.** Prevalance of bacteriophages infecting *Staphylococcus aureus* in dairy samples and their potential as biocontrol agents. *Journal of Dairy Science* 2009, 92(7), 3019-3026.
- Gilmour A, Harvey J.** Staphylococci in milk and milk products. *Journal of Applied Bacteriology* 1990, 1, 147-166.
- Gonzalez-Fandos E, Otero A, Sierra M, Garcia-Lopez ML, Prieto M.** Effect of three commercial starters on growth of *Staphylococcus aureus* and enterotoxins (A-D) and thermonuclease production in broth. *International Journal of Food Microbiology* 1994, 24, 321-327.
- Grisold AJ, Leitner E, Mühlbauer G, Marth E, Kessler HH.** Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous confirmation by automated nucleic acid extraction and real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2002, 40, 2392-2397.

- Gönülalan Z, Ertaş N.** Kayseri İlinde Satılan Çiğ Sütlerde *Staphylococcus aureus* ve Enterotoksinlerinin Varlığı Üzerine Araştırmalar. *Sağlık Bilimleri Dergisi* 2010, 24(1), 11-15.
- Gudding R.** Differentiation of staphylococci on the basis of nuclease properties. *Journal of Clinical Microbiology* 1983, 18: 1098-1101.
- Gülbandılar A.** Kütahya yöresinde çeşitli kaynaklardan elde edilen *Staphylococcus aureus* izolatlarının karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2006.
- Gündoğan N, Ataol Ö.** Et örneklerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* ve Koagülaz Negatif *Stafilokok*'ların biyofilm üretimi ve DNAaz aktivitelerinin belirlenmesi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 2012, 69(3): 135-42.
- Günel T, Aydın K.** Real-Time PCR and Applications Area. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 2009, 2(2), 43-45.
- Haines WC, Harmon LG.** Effect of variations in conditions of incubation upon inhibition of *Staphylococcus aureus* by *Pediococcus cerevisiae* and *Streptococcus lactis*. *Applied Microbiology* 1973, 25, 169-172.
- Hamit KM, Ömer ME.** *Staphylococcus aureus* Ekzotoksinleri. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi* 2008, 19, 69-74.
- Harvey J, Patterson JT, Gibbs PA.** Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from poultry: Raw poultry carcasses as a potential food-poisoning hazard. *Journal of Applied Bacteriology* 1982, 52, 251-258.
- Holt JG, Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME.** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins Co., Baltimore, 2005, 1000-1080.
- Houf K, Tutenel A, Zutter DZ, Hoof VJ, Vandamme P.** Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection and identification of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter skirrowii*. *FEMS Microbiology Letters* 2000, 193, 89-94.
- Hovde CD, Hackett SP, Bohach GA.** Nucleotide sequence of the Staphylococcal enterotoxin C3 gene: sequence comparison of all three type C Staphylococcal enterotoxins. *Molecular Genetics and Genomics* 1990, 220, 329-333.
- Jay JM.** Staphylococcal gastroenteritis. Modern Food Microbiology. Springer Publications, New York, 1996, 429-450.

- Joffe R, Baranovics E.** Bovine mastitis as the primary contamination source of milk and milk products with *S. aureus* enterotoxins. *Veterinarija ir Zootechnika* 2006, 36(58), 21-26.
- Jorgensen HJ, Mork T, Hogasen HR, Rorvik LM.** Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk Norway. *Journal of Applied Microbiology* 2005, 99, 158-166.
- Karataş M.** Moleküler Biyoloji. Nobel Akademik Yayıncılık, İstanbul, 2012, 288-290.
- Kımk Ö, Gönç S, Akalın AS.** Çiğ sütte patojen mikroorganizmalar. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, İzmir, 1998, 23-30.
- Kısa Ö, Albay A, Erol İ, Sırıken B, Esin N, Gün H, Yurtyeri A.** Kremalı pastalardan izole edilen *Koagulaz Pozitif Stafilokokların* enterotoksin oluşturma özelliklerinin VIDAS yöntemiyle belirlenmesi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 1996, 43, 405-411.
- Klein D.** Quantification using real-time PCR technology: Applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine* 2002, 8, 257-260.
- Koneman EW, Winn WC, Allen SD, Janda WM, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL.** Medical Bacteriology: Taxonomy, Morphology, Physiology, and Virulence; Staphylococci and Related Gram- Positive Cocci. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, 2006, 167-207, 624-662.
- Kotilainen L, Rajalahti R, Ragasa C, Pehu E.** Health enhancing foods: Opportunities for strengthening the sector in developing countries. *Agriculture and Rural Development Discussion* 2006, 30.
- Küplülü Ö, Sarımehtemtoğlu B, Kaymaz Ş.** Pastörize Sütlerde Elisa Tekniği İle Staphylococcal Enterotoksin Varlığının Belirlenmesi. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science* 2002, 26, 631-637.
- Lamprell H, Villard L, Chamba JF, Beuvier E, Borges E, Maurin F, Mazerolles G, Noel Y, Kodjo A.** Identification and biotyping of coagulase positive staphylococci (CPS) in ripened French raw milk cheeses and their in vitro ability to produce enterotoxins. *Revue de Medecine Veterinaire* 2004, 155(2), 92-96.
- Le Loir Y, Baron F, Gautier M.** *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research* 2003, 2(1), 63-76.
- Leonard FC, Markey BK.** Meticillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Animals: A review. *Veterinary Journal* 2008, 175, 27-36.

- Lotter LP, Leistner L.** Minimal water activity for enterotoxin A production and growth of *Staphylococcus aureus*. *Applied Environmental Microbiology* 1978, 36, 377-380.
- Mitterer G, Huber M.** Microarray-based identification of bacteria in clinical samples by solid-phase PCR amplification of 23S ribosomal DNA sequences. *Journal of Clinical Microbiology* 2004, 42(3), 1048-1057.
- Moldenhauer J, Yvon P.** Environmental monitoring using Scan RDI Polym“air” in, *Environmental Monitoring: A Comprehensive Handbook*. Springer, USA, 2005, 249-260.
- Morandi S, Brasca M, Lodi R, Cremonesi P, Castiglioni B.** Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. *Veterinary Microbiology* 2007, 124, 66-72.
- Mossel DAA, Van Netten P.** *Staphylococcus aureus* and related staphylococci in foods: Ecology, proliferation, toxinogenesis, control and monitoring. *Journal of Applied Bacteriology* 1990, 1990, 123-145.
- Munson SH, Tremaine MT, Betley MJ, Welch RA.** Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity* 1998, 66, 3337-3348.
- Muratoğlu K.** Gıdalardan izole edilen *Stapylococcus aureus* suşlarının toksijenik özellikleri ve antibiyotiklere duyarlılıkları üzerine bir araştırma. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2010.
- Mutluer B, Erol İ, Kaymaz Ş, Akgün S.** Enterotoksijenik *Staphylococcus aureus* suşlarının beyaz peynirde üretim ve olgunlaşma sırasındaki üreme ve enterotoksin oluşturma yetenekleri. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 1993, 40, 413-426.
- Nagaraja GM, Nagaraju J.** Genome fingerprinting of the silkworm, *Bombyx mori*, using random arbitrary primers. *Electrophoresis* 2013, 16, 1633-1638.
- Nakazawa Y, Hosono A.** *Functions of Fermented Milk*. Elsevier, New York, 1992, 245.
- Balaban N, Avraham R.** Review of Stappylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology* 2000, 61, 1-10.
- Nohutçu Y.** Çiğ Süt ve peynir örneklerinden *Staphylococcus*’ların izolasyonu ve antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2005.

- Normanno G, Firinu A, Virgilio S, Mula G, Dambrosio A, Poggiu A, Decastelli L, Mioni R, Scuota S, Bolzoni G, Di Giannatale E, Salinetti A.P, La Salandra G, Bartoli M, Zuccon F, Pirino T, Sias S, Parisi A, Quaglia MC, Celano GV.** Coagulase-positive *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *Journal of Food microbiology* 2005, 98, 73-79.
- Normanno G, Salandra L, Dambrosio A, Quagila N, Corrente M.** Occurrence, characterization and antimicrobial resistant of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 2007, 115, 290-96.
- Nassarra GIA.** Sütlerde bulunan metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'un PCR yöntemiyle ile tespit edilmesi ve SCCmec tiplendirilmesi. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2011.
- Notermans S, Tips P, Heuvelman CJ.** Einfluss der Milieu-Bedingungen auf das Wachstum von *Staphylococcus aureus* und die Enterotoxinbildung. *Fleischwirtsch* 1984, 64, 1490-1496.
- Osek J.** Development of a multiplex PCR approach for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains and their major virulence factor genes. *Journal of Applied Microbiology* 2003, 95, 1217–1225.
- Patrick CCP.** Coagulase negative Staphylococci: pathogens with increasing clinical significance. *The Journal of Pediatrics* 1990, 116, 497-507.
- Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC.** Veterinary Microbiology and Microbial Disease. Blackwell Science, Oxford, 2004, 72-83.
- Quinn PJ, Leonard FC, Abbott Y, Rossney A.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from a veterinary surgeon and five dogs in one practice. *Veterinary Record* 2006, 158(5), 155-159.
- Perandin F, Manca N, Calderaro A, Piccolo G, Galati L, Ricci L, Medici CM, Arcangeletti CM, Snounou G, Dettori G, Chezzi C.** Development of a Real-Time PCR Assay for Detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for Routine Clinical Diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology* 2004, 42, 1214–1219.
- Rall VLM, Vieira FP, Rall R, Vieitis RL, Fernandes A, Candeias JMG, Cardoso KFG, Araujo JP.** PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. *Veterinary Microbiology* 2008, 132, 408-413.

- Sağlam F.** Türk Gıda Kodeksi. AB Ofset, Ankara, 1999, 399.
- Sancak YC, Alişarlı M, Akkaya L.** Otlu Peynirlerde Enterotoksijenik *Staphylococcus aureus* Suşları ve Enterotoksin Varlığı Üzerine Bir Araştırma. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Dergisi* 2006, 9(1), 218-225.
- Santagati S, Garnier M, Carlo P.** Quantitation of low abundance mRNAs in glial cells using different polymerase chain reaction (PCR)-based methods. *Research Protocols* 1997, 2, 217.
- Schlegelova J, Babak V, Holasova M, Dendis M.** The biofilm-positive *Staphylococcus epidermidis* isolates in raw materials, foodstuffs and on contact surfaces in processing plants. *Folia Microbiologica* 2008, 53(6), 500-504.
- Schliever PM, Bohach GA, Ohlendorf DH.** Molecular structure of Staphylococcus and Streptococcus superantigens. *Journal of Clinical Immunology* 1995, 15, 4-10.
- Sevindik E, Abacı TZ.** Nested PCR and Applications Area. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 2013, 6(2), 22-26.
- Sheldrake RF, Hoare RJT, Hutchinson JE.** Post-milking iodine teat skin disinfectants. I. Bactericidal efficacy. *Journal of Dairy Research* 1980, 47,19-26.
- Speight SE, Hallis BA, Bennett AM.** Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of airborne microorganisms used in biotechnology. *Journal of Aerosol Science* 1997, 28, 483-492.
- Soejima T, Nagao E, Yano Y, Yamagata H, Kag H, Shinagawa K.** Risk evaluation for staphylococcal food poisoning in processed milk produced with skim milk powder. *International Journal of Food Microbiology* 2007, 115, 29-34.
- Sokari T.** Distribution of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat foods in eastern Nigeria. *International Journal of Food Microbiology* 1991, 12, 275-280.
- Su YC, Wong ACL.** Current perspectives on detection of Staphylococcal enterotoxins. *Journal of Food Protection* 1997, 60(2), 195-202.
- Sutherland J, Varnam A.** Enterotoxin-producing Staphylococcus, Shigella, Yersinia, Vibrio, Aeromonas and Plesiomonas. Foodborne Pathogens. CRC Press, Washington DC, 2002, 384-415.
- Todd ECD.** Preliminary estimates of costs of foodborne disease in the United States. *Journal of Food Protection* 1989, 52, 595-601.
- Tompkin RB, Ambrosino JM, Stozek SK.** Effect of pH, sodium chloride and sodium nitrate on enterotoxin A production. *Applied Microbiology* 1973, 26, 833-837.

- Toranzos AG, Alvarez JA.** Solid-phase polymerase chain reaction: applications for direct detection of enteric pathogens in waters. *Canadian Journal of Microbiology* 1992, 38(5), 365-369.
- Umoh VT, Adesiyun AA, Gomwalk NE.** Antibigram of staphylococcal strain isolated from milk and milk products. *Journal of Veterinary Medicine* 1990, 37, 701-706.
- Ünlütürk A, Turantaş F.** Gıda güvenliği, mikrobiyolojik kriterler ve hızlı mikrobiyolojik yöntemler. Gıda Mikrobiyolojisi. Mengi Tan Basımevi, İzmir, 1999, 16-21.
- Virgin JE, Van Slyke TM, Lombard JE, Zadoks RN.** Short communication: Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* detection in US bulk tank milk. *Journal of Dairy Science* 2009, 92(10), 4988-4991.
- Waldvogel FA.** *Staphylococcus aureus*. Principles and Practice of Infectious Diseases. Churchill Livingstone, New York, 2000, 2069-2092.
- Wieneke AA, Roberts D, Gilbert RT.** Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969-1990. *Epidemiology and Infection* 1993, 110, 519-531.
- Yılmaz S, Gönülalan Z.** Kayseri bölgesinde tüketime sunulan çiğ sütlerde *Staphylococcus aureus* ve enterotoksin varlığının araştırılması. *Sağlık Bilimleri Dergisi* 2010, 19(1), 26-33.
- Zhang S, Iandolo JJ, Stewart GC.** The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). *FEMS Microbiol Letters* 1998, 168, 227-233.

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : GÜNDAY, Halis
Uyruk : T.C
Doğum yeri ve tarihi : Aydın/ 05.01.1989
Telefon : 05467261100
E-mail : halisgunday@gmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Ön lisans	Afyon Kocatepe Üniversitesi	2007
Lisans	Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği	2015

İŞ DENEYİMİ

2009-2010	Umurlu Gıda	Üretim Şefi
2015 - Halen	Kalkan Organik Tarım Ürünleri	Kalite Güvence Müdürü

AKADEMİK YAYINLAR

1. MAKALELER

xxx

2. PROJELER

xxx

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

xxx

B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler

xxx