**T.C.**

**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**TULUM PEYNİRLERİNDEN İZOLE EDİLEN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* İZOLATLARINDA KLASİK STAFİLOKOKAL ENTEROTOKSİN ÜRETME YETENEKLERİNİN ELISA YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ**

**EBRU CAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof.Dr. Ergün Ömer GÖKSOY**

**AYDIN–2022**

**KABUL VE ONAY**

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Ebru CAN tarafından hazırlanan "Tulum Peynirlerinden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* İzolatlarında Klasik Stafilokokal Enterotoksin Üretme Yeteneklerinin ELISA Yöntemiyle Belirlenmesi" başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora/Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 12/08/2022

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Üye (T.D): | Prof. Dr. Ergün Ömer  GÖKSOY | Aydın Adnan Menderes Üniversitesi |  |
| Üye: | Prof. Dr. Filiz KÖK | Aydın Adnan Menderes Üniversitesi |  |
| Üye: | Dr. Öğr.Üyesi Murat METLİ | Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi |  |

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün ………tarih ve …… sayılı oturumunda alınan ….. nolu YönetimKurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Süleyman AYPAK

Enstitü Müdürü.

# TEŞEKKÜR

Araştırmanın gerçekleştirilmesinde katkılarından dolayı sayın hocam Prof. Dr. Ergün Ömer GÖKSOY’a, Arş. Gör. Dr. Pelin Koçak KIZANLIK’a

Eğitim sürecim boyunca her zaman yanımda olan Veli Aras ŞENTÜRK’e kalpten teşekkürlerimi sunuyorum.

Ebru Can

**İÇİNDEKİLER**

KABUL VE ONAY i

TEŞEKKÜRii

İÇİNDEKİLERiii

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİv

ŞEKİLLER DİZİNİvi

TABLOLAR DİZİNİvii

ÖZETviii

ABSTRACTix

1. GİRİŞ1

2. GENEL BİLGİLER4

2.1. Peynir4

2.1.1. Peynir’in Tarihçesi4

2.1.2. Süt ve Peynir Üretimi5

2.2. Staphylococcus aureus8

2.2.1. *Staphylococcus aureus’un* Virulens Faktörleri9

2.2.1.1. Kapsül12

2.2.1.2. Hücre Duvarı13

2.2.1.3. Yüzey Proteinleri13

2.2.1.4. Enzimler ve Toksinler14

2.2.1.5. Stafilokokal Enterotoksinler 15

2.2.2. *Staphylococcus aureus’un* Çoğalmasına ve Enterotoksin Oluşumuna Etki Eden Faktörler 17

2.2.3. Enterotoksin Tespit Etme Yöntemleri 18

2.2.4. Peynir Üretiminde Mikroorganizmaların Kontaminasyon Kaynakları18

2.2.5. Peynir Üretiminde Hijyen ve HACCP Uygulamaları21

3. GEREÇ VE YÖNTEM23

3.1. Gereç23

3.1.1. Örneklerin Alınması 23

3.2. Yöntem23

3.2.1. *S.aureus*’un Kültürel Yöntemler ile İzolasyon ve İdentifikasyonu24

3.2.1.1. Baird Parker Agar’da (BPA) Gelişim24

3.2.1.2. ELISA Tekniği ile Toksin Üretiminin Tespiti24

4. BULGULAR27

4.1. *S. aureus*’un Analiz Sonuçları27

5. TARTIŞMA31

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 34

KAYNAKLAR 35

BİLİMSEL ETİK BEYANI 44

ÖZ GEÇMİŞ 45

# SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

**%** : Yüzde

**DNaz** : Deoksiribonükleaz

**ELISA** : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

**g** : Gram

**kb** : Kilobaz

**KNS** : Koagülaz Negatif Staphylococcus

**kob** : Koloni Oluşturan Birim

**KPS** : Koagülaz Pozitif Staphylococcus

**pH** : Potansiyel Hidrojen

**SE** : Stafilokokkal enterotoksin

**TGK** : Türk Gıda Kodeksi

**ŞEKİLLER DİZİNİ**

**Şekil 1.** *S. aureus*’un genel görünümü 12

**Şekil 2.** BPA’da gelişim24

**Şekil 3.** Toksin üretiminin tespitinde ELISA tekniğinin basamakları26

**TABLOLAR DİZİNİ**

**Tablo 1.** *S. aureus*’un biyokimyasal özellikleri 9

**Tablo 2.** *S. aureus*’un virulans faktörleri ve kontrol eden genler 12

**Tablo 3.** *S. aureus* izolatlarında klasik enterotoksinlerin varlığı28

**Tablo 4.** *S. aureus* izolatlarına ait klasik enterotoksinlerin dağılımı 30

**ÖZET**

**TULUM PEYNİRLERİNDEN İZOLE EDİLEN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* İZOLATLARINDA KLASİK STAFİLOKOKAL ENTEROTOKSİN ÜRETME YETENEKLERİNİN ELISA YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ**

**Can, E. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2022.**

**Amaç:** Bu çalışmada daha önce Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi anabilim dalı laboratuvarlarında yapılan peynirler üzerinde *S. aureus* varlığının araştırıldığı çalışmalardan izole edilen saha izolatlarının enterotoksin (A-E) oluşturma yetilerinin ELISA yöntemi kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** *S. aureus* izolatlarının SE oluşturma yetenekleri RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E R4101 (R-Biopharm AG, Germany) ELISA kitleri ile araştırılmıştır. Çalışmada daha öncesinde izole edilip - 18℃’de dondurulan *S. aureus* saha izolatları, Brain Heart Infusion (M210, HIMEDIA) içerisinde çözüldü ve Tryptic Soy Agar’a (M1968, HIMEDIA) pasajlandı. Pasajlanan izolatlar Egg Yolk Tellurite Emulsion (FD046, HIMEDIA) ilave edilmiş Baird Parker Agar’da (M043, HIMEDIA) saflaştırıldı. ELISA testi üretici firmanın test yapım kılavuzunda belirtildiği şekilde tamamlandı.

**Bulgular:** Aydın ilinde farklı mandıralarda üretilen ve satışa sunulan tulum peynirlerinden elde edilen 24 izolattan 8’inin (%33,3) klasik enterotoksinlerden en az birini üretme yeteneğine sahip olduğu ELISA yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir.

**Sonuç:** Çalışma gıdalarda toksin oluşturarak intoksikasyonlara neden olan *S. aureus*’un tulum peynirleri yoluyla halk sağlığı açısından riskler oluşturabileceği gerçeğini ortaya çıkartmıştır.

**Anahtar kelimeler:** ELISA, Enterotoksin, *Staphylococcus aureus*, Tulum peyniri.

**ABSTRACT**

**DETERMINATION OF THE CLASSICAL STPAHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN (A-E) PRODUCTION ABILITIES OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLATES ISOLATED FROM TULUM CHEESE SAMPLES BY USING ELISA TECHNIQUE**

**Can, E. Aydın Adnan Menderes University, Institute of Health Sciences, Department of Food Hygiene and Technology, M.Sc. Thesis, Aydın, 2022.**

**Objective:** The aim of this study is to investigate classical staphylococcal enterotoxin production ability of *S. aureus* field isolates isolated from previous studies conducted at Aydın Adnan Menderes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene and Technology laboartories by using ELISA metod.

**Material and Method:** SE-producing abilities of *S. aureus* isolates were investigated with RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E R4101 (R-Biopharm AG, Germany) ELISA kits. *S. aureus* field isolates, previously isolated and frozen at -18°C, were thawed in Brain Heart Infusion (M210, HIMEDIA) and passaged in Tryptic Soy Agar (M1968, HIMEDIA). Considering the risk of contamination, the passaged isolates were purified on Baird Parker Agar (M043, HIMEDIA) supplemented with Egg Yolk Tellurite Emulsion (FD046, HIMEDIA).

**Results:** It was found that 8 isolates within the 24 isolates examined showed at least one classical enterotoxin production ability.

**Conclusion:** The results of this study revealed that classical enterotoxins of *S. aureus* (A-E) might cause public health risks due to tulum cheese consumption.

**Keywords:** ELISA, Enterotoxin, *Staphylococcus aureus*, Tulum cheese.

# GİRİŞ

İnsanların yaşamları boyunca önemli bir yere sahip olan süt, dengeli ve yeterli beslenmek için vücudumuz için gerekli olan protein, laktoz, yağ ve vitamin ve mineral maddeleri tam ve yeterli oranda içermektedir. Süt vücut fonksiyonlarını düzenleyen, gelişmesini sağlayan, kemik ve diş oluşumunda önemli yeri olan temel bir gıda maddesidir (İnal, 1990; Black ve diğerleri., 2002).

Süt içerdiği laktoz, süt yağı, sitrik asit, mineral maddeler nötral pH’ı ve yüksek su içeriği nedeni ile birçok mikroorganizmanın gelişmesi için ortam oluşturmaktadır. Çiğ süte, bulunduğu çevreden hava, toprak, su ve gübre kaynaklı mikroorganizmalar bulaşmaktadır (Gran vd., 2003; Ünlütürk ve Turantaş, 1999). Sütün kontaminasyonuna en çok neden olan mikroorganizmalardan birisi de *S. aureus*’tur (Arda ve diğerleri., 1982).

En çok tüketilen süt ürünlerinden olan peynir zengin bir mineral, protein, vitamin, yağ ve karbonhidrat kaynağıdır (Sulieman vd., 2012). Ülkemizde üretilen peynir sayısı yaklaşık olarak 130’dan fazla sayıda bulunmaktadır. Bu üretilen peynir çeşitleri olarak kaşar peyniri, beyaz peynir ve tulum peyniri en çok tercih edilen peynirlerdir (Tekinşen ve Uçar, 2007). Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü Süt ve Süt Ürünleri Durum Tahmin Raporu ve Ulusal Süt Konseyi Süt Raporuna göre peynir olarak Türkiye’de en fazla tüketilen çeşit beyaz peynirdir (Anonymous, 2017; Anonymous, 2018).

Zengin besinsel içeriğinin yanısıra peynir çiftlikten sofraya üretim süreci içerisinde *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)*, Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*)*, Escherichia coli* (*E. coli*) ve *Salmonella spp*.gibi çeşitli bakteriler ile kontamine olabilmekte bunun sonucunda da gıda enfeksiyon ve intoksikasyonlarına neden olabilmektedir (Chavez-Martinez ve diğerleri, 2019; Puvaca ve diğerleri, 2020; Ritota ve Manzi, 2020).

*Staphylococcus* spp. insanlar ve çiftlik hayvanları da dahil olmak üzere çeşitli omurgalı hayvanlarda vücudun deri, solunum yolu ve barsak kanalı gibi farklı bölgelerinde bulunabilen ve salgıladıkları extraselüler maddeler ve toksinleri ileenfeksiyonlara neden olabilen önemli bir patojendir. Bir patojen olarak *S. aureus*'un etkinliğinde konağın doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık tepkilerini manipüle eden virülans faktörlerinin çokluğu ve çeşitliliği büyük önem arz etmektedir. *S. aureus* ve enterotoksinlerinin varlığı mikroorganizma kaynaklı, başta sindirim sistemi olmak üzere birçok organda ciddi hastalık semptomlarına neden olan önemli bir halk sağlığı sorunudur (Ören ve diğerleri., 2014; Çakıcı ve diğerleri., 2015).

Bu immün modüle edici virülans faktörlerinin çoğu, salgılanan toksinler, konakçı zimojenlerini aktive eden kofaktörler ve ekzoenzimlerdir (Muthukrishnan ve diğerleri., 2019). Gözenekli yapıdaki toksinler ve süperantijenler gibi salgılanan toksinler yüksek derecede inflamatuardırlar ve sırasıyla sitoliz ve klonal delesyon yoluyla lökosit hücre ölümüne neden olabilmektedirler. Koagülazlar ve stafilokinazlar, konağın pıhtılaşma sistemini bozan kofaktörlerdir. Nükleazlar ve proteazlar dahil olmak üzere ekzoenzimler, kompleman faktörleri, antimikrobiyal peptitler ve lökosit kemotaksisi için önemli olan yüzey reseptörleri gibi çeşitli bağışıklık savunma ve gözetim moleküllerini parçalar ve etkisiz hale getirirler. Salgılanan toksinlerin ve ekzoenzimlerin bazıları, hücre lizizi ve bağlantı proteinlerinin bölünmesi yoluyla endotelyal ve epitelyal bariyerlerin bozulmasına neden olabilmektedirler (Hatzenbuehler ve Pulling, 2011). Her bir virülans faktörünün daha yakından incelenmesi, her birinin önemli fonksiyonel sonuçları olan benzersiz özelliklere sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır. *S. aureus’un* biyofilm oluşumu, toksik üretimi ve bağışıklıktan kaçınma stratejileri gibi özellikleri konakçının antibakteriyel bağışıklık tepkilerini sınırlamaktadır (Thamavongsa ve diğerleri., 2015). Bu nedenle, stafilokok infeksiyonları sıklıkla uzun süreli antibiyotik tedavisi gerektirmektedir (Lew ve Waldvogel, 2004).

Süt ve süt ürünlerinin başlıca patojenleri arasında yer alan stafilokoklar, halk sağlığı problemlerine neden olabilmektedirler. Süt endüstrisi için önemli bir sorun, *S. aureus*'un neden olduğu meme dokusunun bulaşıcı bir hastalığı olan mastitistir ve böylece çiğ sütün *S. aureus* ile kontaminasyonu, enfekte süt hayvanlarından oluşabilmektedir. Bunun dışında peynir üretiminde kullanılan alet-ekipman, personel, yetersiz ısıl işlem uygulamaları, ısıl işlem sonrası kontaminasyon gibi faktörler peynirin *S. aureus* ile kontaminasyonuna, etkenin çoğalmasına ve sonrasında stafilokokkal enterotoksin kaynaklı gıda intoksikasyonlarına neden olabilmektedirler. Stafilokokkal enterotoksinler gıdada, etkenin belli bir seviyeye gelmesini takiben (105kob/g) intoksikasyon oluşturacak düzeye ulaşabilmektedir ve oluşan enterotoksinlerin gıda sektöründe kullanılan rutin ısıl işlem uygulamalarıyla yıkımlanması pek mümkün görülmemektedir (Zhao ve diğerleri, 2020; Tarisse ve diğerleri, 2021). Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliğinde peynir (eritme peyniri hariç) numunelerinde koagülaz pozitif stafilokok limit maksimum 103kob/g olarak gösterilmektedir (Resmi Gazete, 2011).

*S. aureus* gıda intoksikasyonları ile ilgili etkilerini stafilokokkal enterotoksinler (SE) yoluyla gerçekleştirmektedir. Etken tarafından oluşturulan enterotoksinler emetik aktivite gösteren 19 tane SE’den (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SES, SET ve SEY) ve henüz emetik aktiviteleri doğrulanmamış olan 8 tane SE*l*’den (SE*l*J, SE*l*U, SE*l*V, SE*l*W, SE*l*X, SE*l*Z, SE*l*26 ve SE*l*27) oluşmaktadır (Tarisse ve diğerleri, 2021; Lefebvre ve diğerleri, 2022).

# 2. GENEL BİLGİLER

**2.1. Peynir**

**2.1.1. Peynir’in Tarihçesi**

Süt ve süt ürünlerinin tarihçesi binlerce yıla dayanmaktadır. Arkeolojik iskelet kalıntılarının incelenmesinden anlaşıldığı üzere koyun ve keçiler ilk olarak Güneybatı Asya'nın üst Fırat ve Dicle Nehri vadilerinde evcilleştirilmiştir. Arkeozoolojik veriler, MÖ 9 bin yılın ortalarında evcilleştirme başlangıcının göstergesi olarak kabul edilen koyun ve keçilerde ciddi değişikliklerin ortaya çıktığını açıkça göstermektedir. Benzer şekilde, sığırlar da yine arkeozoolojik analizlere dayanarak yapılan analizler bu hayvanların Fırat nehrinin orta kısım havzasında evcilleştirilmiş olduğunu göstermektedir. Ayrıca, modern koyun, keçi ve sığırların mitokondriyal genetik çalışmaları ve neolitik iskelet kalıntılarından çıkarılan mitokondriyal DNA analizleri, bu hayvanların en erken evcilleştirilmesinin Güneybatı Asya'nın ‘Verimli Hilal’ bölgesinde meydana geldiği sonucunu desteklemektedir. Böylece, keçi, koyun ve sığırların evcilleştirilmesi ilk kez, bereketli buğday, arpa, mercimek, bezelye ve nohut gibi temel ürünlerin birkaç yüzyıl önce ilk evcilleştirildiği 'tarım beşiği' olarak adlandırılan üst Bereketli Hilal'in aynı genel bölgesinde meydana gelmiştir. Peynir üretimi başladıktan birkaç bin yıl öncesine kadar, peynirler ve bunların üretimi hakkında açıklayıcı bilgiler, insanlığın ilk medeniyetleri ortaya çıktıkça yazılmaya başlanmıştır. MÖ 4 bin yılın sonlarına ait bilinen en eski proto-yazım örnekleri, Güney Mezopotamya'nın Sümer uygarlığının ilk büyük şehri olan Uruk'tan gelmektedir. Bu ilkel çivi yazısı kil tabletleri, insanlığın ilk yazılı dilinin öncüllerini temsil etmektedir ve Uruk'ta bulunan tabletler arasında, devlet kontrollü sığır, keçi ve koyun sürülerin sütünden üretilen süt ürünleri için esas olarak peynir ve sade yağ için yıllık üretim rakamlarını tablo haline getiren çok sayıda idari kayıt bulunmaktadır. Bu kil kayıtlarına yansıtılan idari uygulamalar kompleksi oldukça ilgi çekici olup, anılan bölgede sütçülük ve süt işlemenin çok sofistike olduğunu göstermektedir. Süt proteininin, peynir ve peynir altı suyunun ayrılması yoluyla depolanması ise önemli teknolojik gelişme olarak kabul edilmektedir. Pıhtılar bugünkü bazı Türk veya Balkan peynirleri gibi tuzlanabilen, güneşte kurutulabilen veya tuzlu suda saklanabilen peynir örnekleridir. Meraların daha zengin olduğu yaz aylarında koyunlar, keçiler ve çok daha sonra inekler dağa çıkarılmış olup sütün rennetleme öncesi bozulma ihtimali azaltılmıştır (Kindstedt, 2012).

**2.1.2. Süt ve Peynir Üretimi**

Peynir üretiminin temel amacı, sütü fermentasyon yoluyla dayanıklı bir ürün haline dönüştürmektir. Peynir üretim prosesinin tarih boyunca geçirdiği evrim sonucunda 1000’den fazla peynir türü ortaya çıkmıştır. Farklı sütlerin kullanımına ek olarak, belirgin şekilde farklı peynir çeşitlerinin geliştirilmesi, peynir yapım sürecinin temel adımlarındaki bazı değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Bu değişiklikler, her bir peynirin ortaya çıktığı bölgenin spesifik coğrafi, iklimsel ve çevresel özelliklerinin sonucudur (Bintsis ve Papademas, 2017).

Besin değeri yüksek olan peynir, çoğunlukla inek, manda, koyun veya keçi sütünden üretilmekte olup Amerika, Asya ve Avrupa'nın sağlıklı beslenmesinde önemli bir gıda maddesidir. Zengin bir protein, peptit, amino asit kaynağı, kısa, orta ve uzun zincirli yağ asitleri, vitaminler ve kalsiyum dahil temel mineralleri sağlamaktadır. Peynirin protein içeriği, peynir çeşidine bağlı olarak yaklaşık %4-40 arasında değişmektedir. Farklı peynir çeşitlerinin protein içeriği, yağ içeriği ile ters orantılı olarak değişim göstermektedir. Bireylerin lezzet ve sağlık ihtiyaçlarını karşılamak için dünyada çok çeşitli peynirler üretilmektedir. Ek olarak, peynir hazırlama teknikleri ve tüketimleri kişiye, ırka, etnik kökene ve sütün türüne göre değişmektedir. Süt türü, laktasyon dönemi, olgunlaşma süreci, kullanılan starter kültürler gibi çok sayıda faktör peynirin besin bileşenlerini değiştirebilmektedir (Foster, 2012). Söz konusu nedenlerden ötürü, peynirlerin üretim zincirinde hammaddeden son ürüne kadar geçen aşamalarda hayvanların refahı ve sağlığı, çiğ süt özellikleri, üretim, ambalajlama, depolama ile nakliye koşulları, belirli hijyen ve sanitasyon kurallarına uyulması ve her aşamada söz konusu uygulamaların standartlaştırılması gerekmektedir (O'Brien ve O'Connor, 2004).

Geleneksel peynir üretiminde, süt ısıl işlemden geçmeden çoğu zaman çiğ sütten üretilmekte veya mayalama sıcaklığının birkaç derece üstüne kadar ısıtılıp hemen soğutulmasıyla “Maya” ilave edilmektedir. Bu tip peynirlerde starter kültür kullanılmamaktadır. Böylece, fermentasyon sırasında çiğ sütün doğal olarak florasında bulunan veya sütü kontamine eden mikroorganizmalar gelişmektedir. Fermentasyon sırasında gelişen flora, peynirlerin değişik ve karakteristik özelliklerini ortaya çıkarmaktadır. Geleneksel peynirlerin özellikleri üreticiye göre değişmekte olup, kullanılan çiğ süte, bulunduğu hava koşullarına, üretim yapılan ortamın mikroflorasına göre değişim göstermektedir (Karabıyıklı ve Erdoğmuş, 2019).

Doğal starter kültürler 20.yüzyılın başlangıcına kadar ayrıca bazı Avrupa ve Güney Amerika ülkelerinde günümüzde Korunmuş Menşe-i Ünvanı (Protected Designation of Origin-PDO) özellikteki peynirlerde kullanılmaktadır. Yabancı menşeili Mozzarella, Emmental, Parmigiano Reggiano vb. gibi peynir çeşitleri ile Türkiyede ise Kars kaşarı bu tip peynirlere örnek olarak verilebilmektedir. Doğal starter kültürler işletmelerde günlük olarak üretilmektedir. Starter kültür üretimi sırasında bir gün öncesinde üretilen peynirlerden alınan peynir altı suyu kullanılmaktadır. Bir miktar peynir altı suyu alınarak uygun inkubasyon koşullarına bırakılmakta olup, içindeki floranın gelişmesi amaçlanmaktadır. Bu yöntem ile elde edilen starter kültürlerde homofermentatif termofilik LAB’lar dominant olup, düşük pH’lı olanlar rana Padano, Parmigiano Reggiano gibi ekstra sert peynirlerin, Arjantin tipi sert peynirlerin, İsviçre tipi peynirlerin, pasta filata tipi İtalyan peynirlerin ve kaşar peynirinin üretiminde kullanılmaktadır. Doğal starter kültür üretiminde başvurulan bir diğer yöntem ise sütten üretilen starter kültürlerdir. Mikrobiyolojik kalitesi yüksek olan süt, 60-65°C’de 10-15 dakika süre ile ısıtılmakta ve 45°C’ye soğutulup, inkubasyona bırakılmakta böylece sütün asitlenmesi amaçlanmaktadır. Fermentasyon %0,4-0,5 laktik asite ulaştığında durdurulmakta ve oluşan ekşi süt peynir üretiminde kullanılmaktadır. Bu üretim tekniğine Mozzarella, Caciocavallo, Asiago, Montasio peynirleri örnek olarak verilebilmektedir (Oğuz ve Andiç, 2019).

Sütün kendi doğal mikroflorası ile üretilen bazı peynirlerde bulunan doğal kültürler arasında *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc* sp., *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis,* *Lb.* *delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Lb.* *helveticus* yer almaktadır. İlk iki organizma çoğu peynir üretiminde kullanılırken, ikincisi peynir türüne bağlı olarak örneğin üretim sırasında yüksek bir sıcaklığa ısıtılan Emmental ve Parmigiano Reggiano ve pizza/mozzarella peyniri gibi peynirlerde kullanılmaktadır. Pek çok artisanal peynirlerinde, özellikle Akdeniz ülkelerinde üretilenlerde, *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Ec. faecalis*, *Ec. faecium*, *Lb. salivarius* ve *Staphylococcus* türleri de bulunmaktadır. Birincil starterler, çoğunlukla peynir üretimininin başlangıcında ortaya çıkan laktozdan laktik asit üretiminde yer almaktadır. Bu nedenle peynir sütüne yüksek sayıda aktif hücre eklenmektedir. Bununla birlikte, birçoğu aynı zamanda uçucu bileşikler, taze peynirin önemli bir lezzet bileşeni olan sitrattan diasetil ve bazı peynirlerin açık dokusuna katkıda bulunan laktoz (heterofermentatif türler) ve sitrattan (homofermentatif ve heterofermentatif türler) CO2 üretmektedir. Proteolitik sistemler, peynirlerin olgunlaşmasında aroma gelişiminde de rol oynamaktadır. Ayrıca bozulma ve patojenik mikroorganizmalarla rekabet ederek ve antimikrobiyal bileşikler üreterek pH ve Eh'yi düşürerek peynirin mikrobiyal güvenliğine de katkıda bulunmaktadır. Birincil starterler genellikle mezofilik veya termofilik olarak sınıflandırılmaktadır (Parente ve Cogan, 2004).

Endüstriyel peynir üretimi ile halk sağlığı açısından güvenli ve standart kalitede peynir üretimi elde etmek amacı ile starter kültürler kullanılmaktadır. Peynir üretimi sırasında laktozdan laktik asit üretmek ve olgunlaşma sırasında biyokimyasal değişiklikler şekillendirmek amacıyla belirli Laktik Asit Bakteri türleri (LAB) kullanılmakta olup, peynirin karakteristik lezzetini geliştirmeye yardımcı olmaktadırlar. Starter kültür olarak adlandırılan LAB’lar, peynire verilmek istenen tat, aroma, lezzet gibi karakteristikler göz önünde bulundurarak dikkatlice seçilmektedir (Parente ve Cogan, 2004).

Peynir yapımında diğer bir takım farklı mikroorganizmalar da kullanılmaktadır (Örneğin *Propionibacterium freudenreichii*, *Brevibacterium linens*, *Debaryomyces hansenii*, *G. candidum*, *P. roqueforti* ve *P. camemberti*). Bu organizmaların asit üretiminde hiçbir işlevi yoktur ve “ikincil kültürler” olarak adlandırılmaktadır. Başlıca rolleri, peynirde organoleptik ve biyokimyasal değişiklikler üretmektir. Bunlar arasında, Emmental peynirinde *P. freudenreichii* tarafından CO2 üretimi, Blue peynirdeki mavi damarlar *P. roqueforti*'nin gelişmesi veya olgunlaşma sırasında Camembert peyniri üzerinde gelişen kadife benzeri *P. camemberti* tabakası yer almaktadır. İkincil mikroflora hem taksonomik hem de işlevsel açıdan daha çeşitlidir: Starter laktik olmayan asit bakteriler, propiyonibakteriler, coryneformlar, stafilokoklar, mayalar ve küfler peynirlerin organoleptik özelliklerine katkıda bulunabilmektedir. Bu mikroorganizmalar olgunlaşma sırasında rol oynadıkları için, başlangıçta yüksek sayılarına ihtiyaç duyulmamakta olup, birçok peynir çeşidinde süt ve peynir ortamından kaynaklanan doğal kontaminasyona güvenilmektedir. Bununla birlikte, sütün hijyeninde iyileşme ve olgunlaşmanın standardizasyonu ve hızlanması ihtiyacı, daha yumuşak aromalı peynirlerle sonuçlanmaktadır. Böylelikle, peynirin duyusal özelliklerini veya sağlık yararlarını iyileştirmek için birçok ikincil starter veya yardımcı maddenin kullanılmasını sağlamaktadır (Parente ve Cogan, 2004).

## 2.2. *Staphylococcus aureus*

Stafilokokların tanımlanması ilk kez 1878 yılında Robert Koch tarafından tanımlanmıştır. 1880 yılında ise Pasteur stafilokokları sıvı besiyerinde üretmiştir. 1881 yılında ise İskoçyalı cerrah olan Alexander Ogston, insan apsesinden elde ettiği bakterinin şekli üzüme benzediği için *Staphylococcus* olarak adlandırmıştır (Grekçe üzüm salkımı=*staphyle*). 3 yıl sonra ise 1884’te Alman Anton Rosenbach kültürde farklı renklerde koloni yapan iki stafilokok türünü ayırmıştır. Renginden dolayı beyaz olan koloniler *Staphylococcus albus*, sarı-portakal renginde olan koloniler ise *S. aureus* adlarını vermiştir. Bu ayrım yakın zamana kadar devam etmiştir. Daha sonra ise; stafilokoklar, yapılan çalışmalarla birlikte birçok alt gruba ayrılmışlardır. Çalışmalarda *S. aureus*’un tercih edilmesinin sebebi infeksiyon etkeni olarak izole edilmesidir. Geri kalan alt gruplar ise genel bir adlandırmayla koagülaz negatif stafilakok (KNS) olarak isimlendirilmiştir. *Staphylococcus* Gram pozitif bir bakteri olup hiç bir çevresel parametrelere ve özel beslenmeye gereksinim duymamakta, 7°C ve 48,5°C arasında optimum olarak ise 30°C-37°C’de üremektedir. pH optimum olarak 7-7,5 ve %15’den fazla tuz konsantrasyonu olan ortamda üreme yeteneğine sahip bir bakteridir (Bhatia ve Zahoor ,2007; Normanno vd., 2005). Bu özelliklerinden dolayı yaygın olarak hayvan ve insanlarda bulunmaktadır. Tüm dünyada gıda kaynaklı hastalıklara neden olan bakterilerin üçüncü sırasında yer almaktadır ve fırsatçı bir patojen olan *S. aureus* insanlarda asemptomatik olarak taşınmaktadır (Normanno ve diğerleri., 2005).

1974 yılına kadar *Staphylococcu*s’lar koagülaz üretme durumuna göre *S. aureus, S. saprophyticus* ve S*. epidermidis* diye içinde sınıflandırılırken daha sonraki dönemlerde ise araştırmalar sonucunda *S. xylosus, S. warneri S. capitis, S. cohnii,S. equorum, S. intermedius, S. sciuri, S. hycus, S. haemolyticus, S. pseudintermedius,S. simulans, S. carnosus, S. lugdunensis, S. caprae, S. gallinarum, S. hominis, S. delphini, S. felis, S. caseolyticus, S. auricularis, S. lentus, S. saccarolyticus, S. arlettae, S. kloosii, S. chromogenes ve S. schleiferi, S. lutrae, S. agnetis* gibi yenitürler eklenmiştir. Moleküler filogenetik araştırmaların da katkısı ile kabul edilen taksonomiye göre *Bacilli* sınıfının *Bacillales* takımı içerisinde *Paenibacilaceae, Planococcaceae Listeriaceae,* gibi familyalarla beraber bulunan *Staphylococcaceae* familyası içinde *Staphylococcus* cinsi içinde sınıflandırılmaktadır. Günümüzde ise toplam 47 tür ve 23 alt tür bulunmaktadır. Bunlardan 9 tanesi koagülaz pozitif staphylococcus (KPS), 38 tanesi ise koagülaz negatif staphylococcus (KNS)’tur (Becker ve diğerleri., 2014).

**2.2.1. *Staphylococcus aureus’un* Virulens Faktörleri**

Süt ürünleri aracılığı ile insanlarda gıda kaynaklı intoksikasyonlara neden olabilme potansiyeline sahip olan suşlar enterotoksijenik *S. aureus* ‘lardır (Kümmel vd., 2016). *S. aureus* bu cins içerisinde antibiyotik direnci ve virülensi en fazla olanıdır. Gıda kaynaklı intoksikasyonlara ve infeksiyon sebep olma bakımından da en riskli türdür. Birçok çevresel koşulla birlikte yüksek tuz konsantrasyonu ve çeşitli dezenfektan maddelere dayanıklıdır. Bu özellikleri bakımından kolayca bulaşabilmekte ve infeksiyona neden olabilmektedir (Loir vd., 2003; Bremer ve diğerleri., 2004).

*S. aureus*’un bazı önemli biyokimyasal özellikleri Tablo 1.’de özetlenmiştir (Mikrobiyoloji.org , 2021).

**Tablo 1.** *S. aureus*’un biyokimyasal özellikleri (Mikrobiyoloji.org, 2021)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Reaksiyon** | ***S.aureus*** | ***S.epidermidis*** | ***S.intermedius*** | ***S.saprophyticus*** |
| Katalaz | + | + | + | + |
| Koagülaz | + | - | + | - |
| MannitolAerobik | + | - | + | d |
| ProteinA | + | - | d | ? |
| Tellüritreaksiyonu | + | - | - | ? |
| Dnase | + | - | ? | - |
| d: değişken ; ? bilgi yok | | | | |

*S. aureus*; Gram pozitif, hareketli olmayan, spor oluşturmayan, katalaz pozitif, oksidaz negatif, fakültatif anaerobik bakteridir. *S. aureus* proteinlerden, teikoik asitten ve kalın bir tabakadan oluşan hücre duvarına sahiptir. Dış kısmında kapsül adı verilen peptidoglikan bulunan polisakkarit tabaka vardır. Bakteri çapı yaklaşık 0,5-1,5μm’dir. Tek başına, çiftler halinde veya düzensiz kümeler halinde bulunurlar. Besiyerinde; koloniler iyi tanımlanmış, sarı, pürüzsüz, opak ve dışbükeydir. Çapı yaklaşık 1-3mm’dir ve kanlı agarda hemolitiktirler. *S. aureus* 15oC ve 45oC sıcaklıkları arasında, 4,2-9,5 pH aralığında ve %15 sodyum klorür konsantrasyonunda çoğalmaktadır. Gün ışığında oda sıcaklığında yaklaşık 24-48 saat inkübasyon sonucunda pigment üretimi artmaktadır. *S. aureus* kapsüllendiğinde mukoid, yapışkan koloniler olarak görünmektedir. *S. aureus* altın pigmentasyonu, koagülaz testi, mannitol fermantasyon testi ve deoksiribonükleaz testine pozitif reaksiyonları ile diğer stafilokok türlerinden farklılaşmıştır (Todar, 2012).

*S. aureus’un* bir diğer özelliği ise koagulaz pozitif olmasıdır. Koagulaz testi plazmayı pıhtılaştırma yeteneğini gösterir. Koagülaz testi iki farklı yöntemle tespit edilebilmektedir. İlk yöntem serbest koagülazın araştırıldığı tüp testi, ikinci yöntem ise bağlı koagülazın araştırıldığı lam testidir. Birçok *S. aureus* türü bağlı (clumping factor) ve serbest olmak üzere iki farklı enzime sahiptir.

*S. aureus* dışında *S. delphini, S. intermedius, S. lugdunensis, S. hyicus, S. lutrae*ve *S. schleiferi*’de koagulaz pozitif özellik gösteren diğer türlerdir (Yılmaz, 2019; Samanta ve Bandyopadhyay, 2020).

Antimikrobiyal ajanların uzun süreli kullanımı, sadece hayvan sağlığı için değil, insan sağlığı içinde ciddi bir endişe kaynağı olan antimikrobiyal dirençli bakteri suşlarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Stafilokok türlerinde antimikrobiyal direnç için genlerin varlığıda büyük endişe kaynağıdır. Çünkü direnç genleri stafilokok türleri arasında yanal transfer yoluyla aktarılabilir (Walther ve Perreten, 2007).

İnsanlarda *S. aureus* ön burun deliklerinde doğal olarak bulunabilmektedir. Mikrop çoğu kişinin derisinde, deri bezlerinde ve mukoza zarlarında sıklıkla bulunmaktadır. Sağlıklı insanların yaklaşık %20’sinin burun deliklerinde kalıcı olarak *S. aureus* tarafından kolonize olmuştur ve %70’e kadarı ise en azından taşıyıcıdır (Kluytmans ve diğerleri., 1997).

*S.aureus*’un çoklu ortamlarda, farklı cansız konakçılarda veya matrislerde başarılı kolonizasyonu, bu mikroorganizmanın kullandığı çok sayıda virülans faktörü nedeniyle mümkündür (Balasubramanian , 2017). *S. aureus* koagulaz, stafilokinoz ve β-laktamaz dahil olmak üzere bu mikroorganizmanın virülansını destekleyen çok sayıda enzim üretmektedir (Dominique ve Olaf, 2016). Patojenitede önemli bir rolü olan virülans faktörleri arasında protein A gibi adezinler, yüzey proteinleri ve özellikle toksinler Stafilokokkal enterotoksinler (SE) ve β-Hemolizin (Hlb) bulunur (Kong vd., 2016).

*S. aureus* hayatta kalmak ve farklı çevresel nişlere uyum sağlamak için *S. aureus* virülans faktörü üretimini hem geçici hem de konak yeri şeklinde kontrol etmek için karmaşık bir düzenleyici ağ geliştirmiştir (Novick, 2003). Düzenleyici mekanizmalar ve virülans faktörleri, normal büyüme için gerekli olmadıklarından aksesuar genler olarak bilinirler. Bu yardımcı faktörler, konakçıda baskınlık oluşturmak ve *S. aureus*’un patojenitesine katkıda bulunmak için kullanılır. Bu faktörler hücre yüzeyi bileşenlerini ve doğrudan hücre dışı ortama salınan proteinleri içerir. Bu yardımcı genetik elementler doğrudan kromozon üzerinde fajlar, plazmitler ve patojenite adalarını içeren mobil elementleri üzerinde kodlanmış bulunmaktadırlar (Jenul ve Horswill, 2021).

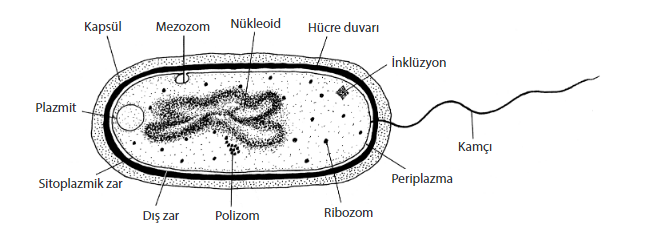
Stafilokokal patojenite adaları, süper antijenler olarak adlanlarılan pirojenik toksinleri kodlayabilen başka bir mobil genetik elementtir. Stafilokokal patojenite adalarında kodlanan süperantijen genleri arasında toksik şok toksini (*tsst*), enterotoksin B (*seb*) ve enterotoksin benzeri protein Q (*selq*) bulunur. Nötrofiller vücuda giren stafilokokları yok etmektedirler. Bundan dolayı Stafilokokların virulens faktörleri etkenin kendisini fagasitozdan kurtarma veya hücre içi ölümlerden koruma şeklinde etkili olmaktadır. Hayvan ve insanlar için önemli bir patojen tür olan *S. aureus* aynı zamanda virulensi en yüksek olan Stafilokok türüdür (Ilgaz vd., 2012). *S. aureus*’un virulens faktörleri; enzimler, yapısal bileşenler ve toksinler olmak üzere üç ana başlık altında toplanmaktadırlar (Peacock, 2006). *S. aureus’* un bazı virulans faktörleri ve bunları kontrol eden genler Tablo 2.’de belirtilmiştir.

**Tablo 2.** *S. aureus*’un virulans faktörleri ve kontrol eden genler (Pragman, 2004; Iwatsuki, 2006).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Gen** | **Ürün** | **Fonksiyon** |
| spa | Protein-A | Antifagositoz |
| KapsülerPolisakkaritler | | |
| cap5 | Polisakkaritkapsültip5 | Anti-fagositoz |
| cap8 | Polisakkaritkapsültip8 | Anti-fagositoz |
| Sitotoksinler | | |
| hla,hlb,hld,hlg | Alfa,Beta,Gama,Deltahemozin | Hemolizin,sitotoksin |
| Süperantijenler | | |
| tst | Toksik şok sendrom toksin-1 | Toksikşoksendromu(TŞS) |
| sea | EnterotoksinA | Besinzehirlenmesi,TŞS |
| seb | EnterotoksinB | Besinzehirlenmesi,TŞS |
| sec | EnterotoksinC | Besinzehirlenmesi,TŞS |
| sed | EnterotoksinD | Besinzehirlenmesi,TŞS |
| Enzimler | | |
| coa | Koagülaz | Fibrinojeni fibrin çevirme |

**2.2.1.1. Kapsül**

Stafilokokların hücre duvarının en dış tabakası polisakkarit bir kapsül ile örtülebilmektedir. *S. aureus*’da 11 kapsüler serotip tanımlanmaktadır. Enfeksiyonların çoğu serotip 5 ve 7 ile ilişkilidir. Serotip 1 ve 2 çok kalın bir kapsüle sahiptir ve mukoid görünümlü koloniler oluşturmaktadır. Kapsül, bakteriyi fagositozdan korumakta ve kateter gibi yabancı cisimlere yapışmasını sağlamaktadır (Şekil 1) (Tünger 2004).



**Şekil 1.** *S. aureus*’un genel görünümü.

**2.2.1.2. Hücre Duvarı**

Hücre duvarı Protein-A *(Spa*) ve Peptidoglikan-Teikoik asit kompleksi temel elemanlarını taşır. Peptidoglikan, hücre duvarının esas yapısını oluşturur, mikroorganizmaya şeklini verir ve dayanıklılığını sağlar. Lökosit göçünü sağlayıp, fagositozu önler. Yapısının temel taşı glikan zincirleridir ve 1,4-β glikozid bağlarıyla bağlanan N-asetil glukozamin ve N-asetil muramik asit birimlerinin sıralanmaları ile oluşan disakkarit glikan zincirlerinden oluşmaktadır. Peptidoglikan zincirleri birbirlerine oligoglisin köprüleri ile bağlanmıştır (Lowy, 1998). Stafilokokların DNA’larındaki G+C oranlar %32,8- 32,9 mol, mikrokoklarda ise bu oran %66-75 mol’dür. Stafilokokların; furazolidon ve lizostafine duyarlı olmaları, 0,04 Ü basitrasine dirençli, fakültatifanaerob olmaları ve mikrodaz-negatif olmaları ile; aerob, 0,04 Ü basitrasine duyarlı, furazolidon ve lizostafine karşı dirençli ve mikrodaz-pozitif olan mikrokoklardan kolay birşekilde ayırtedilebilirler (Koneman, 2006; Forbes ve diğerleri., 2007).

**2.2.1.3. Yüzey Proteinleri**

*S. aureus’*un DNA’sında bulunan kromozom uzunluğu 2810-2880 kb olarak saptanmıştır. *S. aureus* un kromozomal DNA’sı genomik adalar ve genetik altyapı olmak üzere iki kategoride incelenmektedir (Chongtrakool ve diğerleri., 2006; Kılıç, 2008). Mikrobiyal infeksiyonların oluşmasında önemli bir virulens faktörlerden biri bakteriyel kapsüler polisakkaritlerdir. Polisakkarit yapıda bulunan mikrokapsüller *S. aureus* klinik izolatlarının %90’ından fazlasında bulunmaktadırlar. Bu mikrokapsülün fagositozdan koruma ve konak hücrelerine ve yabancı cisimlere aderensini sağlama gibi önemli görevleri vardır. Günümüze kadar tanımlanan 11 kapsüler serotipin içinde özellikle tip 5 ve tip 8 insan infeksiyonlarının %75’inden sorumludur (Franklin, 1998; Fong ve Kolia, 2003; Moreillon vd., 2005). Bununla birlikte, metisiline direnci ile tip 5’in; tip 8’in ise toksik şok sendrom toksini üretimi ile ilgili oldukları gösterilmiştir (Koneman ve diğerleri., 1997).

**2.2.1.4. Enzimler ve Toksinler**

**Enzimler**

Stafilokokal enzimler aşağıda ele alınmıştır:

**Katalaz**: Stafilokokların tamamı tarafından salgılanan enzim, toksik hidrojen peroksidi, toksik olmayan su (H2O) ve O2’ye parçalar. Bakteriyi parçalı çekirdeklerin etkisinden koruduğundan dolayı virülans faktör olarak sayılmaktadır (Berkiten, 2005).

**Lipaz**:Koagülaz negatif stafilokokların (KNS) %30’u ve *S. aureus* suşlarının tamamı lipaz enzimi üretmektedir (Kutlu, 2006).Lipaz enzimi vücuttaki yağlı bölgelerde *S. aureus’*un kolonize olmasını sağlamaktadır (Berkiten, 2005).

*S. aureus’*un farklı lipaz enzimleri bulunmaktadır. Gliserol Ester Hidrolazın bakterinin beslenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. *S. aureus* iki farklı fosfolipaz C oluşturmaktadır. Birincisi PI-PLC (phosphatidylinositol-specific phospholipase), diğeri ise; hemolizine karsılık gelen, hemolitik sfingomiyelinazdır. *S. aureus* suşlarının yaklaşık %80’i tarafından meydana getirilen FAME (Fatty Acid-Modifiying Enzyme), bakterisidal etkisi olan lipitleri inaktive hale getirmektedir (Arvidson, 2000).

**Hyalüronidaz**: Hyalüronik asit omurgalıların hücreler arası boşluklarında yer alan lineer bir polisakkarittir (Novick, 2000). Bağ dokusunun yapısında bulunan hyalüronik asidin depolimerizasyonunu yapmakta ve stafilokokların böylece doku içerisinde yayılmasını kolaylaştırmaktadır. Yayılma faktörü olarak tanımlanan bu enzim antijenik özelliğe sahiptir. Özgül antikorlar ile nötralize olabilmektedir (Çalık, 1998; Novick, 2000).

**Koagulaz Üretimi**:*S. aureus*’un klinik izolatları protrombine bağlanan polipeptit olan ve onu aktive eden böylece fibrinojeni fibrine dönüştüren ve plazma veya kanın pıhtılaşmasını teşfik eden bir polipeptit olan koagülaz (*coa*) salgılar. Koagulaz üretimi konak dokularda apse oluşumuna ve bakteriyel kalıcılığa sebep olmaktadır. Bu nedenle *S. aureus* tarafından koagulaz üretimi, etkenin patojenitesi ile ilişkilendirilmiş ve ayrıca birçok çalışan tarafından organizmanın fenotipik tanımlaması için önemli bir ölçüt olarak kullanılmıştır (Bhati, 2019). Dünya çapında *S. aureus*’un tanınması için kullanılan en önemli identifikasyon testlerden biri koagulaz üretimi testidir. Bu proteinin infeksiyonlardaki rolü tam olarak anlaşılmasa da insan ve hayvanlardan izole edilen *S. aureus* izolatlarının tanımlanmasında *coa* gen varlığının tespiti önem arz etmektedir (Da Silva ve Da Silva, 2005).

**Penisilinaz (β-laktamaz)**:*S. aureus*’ta penisilin direnci 1944 yılında ilk kez bildirilmiştir. Bu dirençten sorumlu olan enzim ise β-laktamaz olan penisilinaz enzimidir.β-laktamaz enzimi *bla* tarafından kodlanmaktadır. Bu gen genellikle bir plazmid üzerinde taşınmaktadır. Penisilinaz enzimi, penisilini ve diğer penisilinaza duyarlı bileşikleri inaktif penisiloik aside parçalamaktadır (Appelbaum, 2006).

**Deoksiribonükleaz (DNaz)**:*S. aureus*, DNaz ortamında nükleik asidi hidrolize edebilen DNaz enzimini üretme yeteneğine sahiptir. Kolonilerin çevresinde renksiz bir bölge görülmektedir (Pumipuntu ve diğerleri., 2017).

Etkenin en önemli virulens faktörlerinden olan toksinler ise aşağıda ele alınmıştır:

*S. aureus* beş farklı sitolitik ya da hücre zarı parçalayıcı toksin (alfa, beta, delta, gama toksin ve Panton-Valentine lökosidini [PVL]), çok sayıda enterotoksin (A- E, G-X), iki eksfolyatif toksin (A ve B) ve toksik şok sendromu toksini-1 (TSST-1) gibi birçok toksin oluşturmaktadır (Muray vd., 2005). *S. aureus* gıda intoksikasyonları ile ilgili etkilerini stafilokokkal enterotoksinler (SE) yoluyla gerçekleştirmektedir. Etken tarafından oluşturulan enterotoksinler emetik aktivite gösteren 19 tane SE’den (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SES, SET ve SEY) ve henüz emetik aktiviteleri doğrulanmamış olan 8 tane SEl’den (SElJ, SElU, SElV, SElW, SElX, SElZ, SEl26 ve SEl27) oluşmaktadır (Tarisse ve diğerleri, 2021; Lefebvre ve diğerleri, 2022). Bunlardan SEA, SEB, SEC, SED, SEE klasik enterotoksinler olarak adlandırılmaktadırlar (Koçak Kızanlık, 2019).

**2.2.1.5. Stafilokokal Enterotoksinler**

Enterotoksinler besin kaynaklı intoksikasyonlara yol açmaktadırlar. 100°C’de 30 dakika sıcaklığa, gastrik asit tarafından hidrolize ve jejunal enzimlere dirençlidirler. Bu toksinlerin tam olarak nasıl etkilediği tam olarak. Enterotoksinler süperantijenlerdir ve T hücrelerini, aracı olarak antijen sunan hücreleri aracı olarak kullanmadan uyararak çok miktarda sitokin salınımına yol açarlar. *S. aureus* türlerinin %30- 50’si enterotoksin üretmektedir. Çok sayıda enterotoksin tanımlanmış olup, Enterotoksin-C ve -D kontamine süt ürünlerinde bulunmaktadır. Enterotoksin-A besin zehirlenmesi ile en sık ilişkilendirilmiş olanıdır. Enterotoksin-B ise stafilokokkal psödomembranöz enterokolite neden olmaktadır. Diğer enterotoksinlerin prevalansı veya klinik önemi ile ilgili olarak daha az veri bulunmaktadır (Murray ve diğerleri., 2016).

*Staphylococcus* spp. üyeleri, tek başına, çiftler halinde veya düzensiz kümeler halinde oluşan Gram pozitif, katalaz pozitif ve hareketsiz koklardır. *Staphylococcus* adı, sırasıyla üzüm ve kok anlamına gelen Yunanca “stafil” ve “kokkos” sözcüklerinden türemiştir ve mikroskop altında Gram pozitif boyanan görünümlerini tanımlamaktadır. Stafilokoklar genellikle koagülaz üretimi veya bir koagülaz geninin varlığı temelinde koagülaz pozitif stafilokoklar (KPS) ve koagülaz negatif stafilokoklara (KNS) ayrılır. KPS arasında *S. aureus, S. intermedius*, *S. delphini*, *S. hyicus* ve *S. schleiferi* bulunmaktadır (Yücel ve Anıl, 2011).

*S. aureus*, fakültatif, optimum gelişme sıcaklığı 37°C (6 ila 48°C aralığında) değişim göstermektedir. Bazı koşullar altında *S. aureus*'un <10°C 'de gelişebileceği ve geleneksel buzdolabı soğutmanın her zaman gıdaların güvenliğini sağlamayabileceği bildirilmiştir. Üst gelişme limiti, NaCl ve monosodyum glutamat ilavesiyle >44°C’ye kadar uzatılabilmektedir. Tolere edilen kesin pH aralıkları birkaç faktöre bağlı olsa da, optimum gelişme pH'sı 7,0 ila 7,5 (4,2 ila 9,3 aralığı) arasında yer almaktadır. Büyüme, %0,1 asetik asit (pH 5,1) varlığında veya %5 NaCl ile 4,8 pH'ta inhibe edilmekte olup, asit toleransı potasyum sorbat, gliserol, sukroz ve NaCl varlığında önemli ölçüde azalmaktadır. *S. aureus*, yaygın olarak karşılaşılan diğer mezofilik bakterilere göre daha düşük su aktivitesinde (aw) gelişebilmektedir. NaCl, sükroz veya gliserol nemlendiriciler varlığında 0,83 kadar düşük bir aw'de gelişebildiği bildirilmişse de, genel olarak minimum olarak 0,86 kabul edilmektedir (Seo ve Bohach, 2010).

Stafilokoklar havada, tozda, kanalizasyonda, suda, sütte ve birçok gıdada ve gıda ekipmanında, çevresel yüzeylerde, insanlarda ve hayvanlarda her yerde bulunmaktadır. İnsanlar ve hayvanlar birincil kaynaklardır. *S. aureus* genel popülasyonun en az %20- 30'u burun deliklerinde etkin bir şekilde taşınmaktadır. Etkenin kolonize olduğu gıda çalışanları stafilokokların yayılmasının ana kaynak olsa da, etken ekipman ve çevresel yüzeyler de bulunabilmektedir (Baran ve diğerleri., 2017).

Hazırlama sırasında önemli ölçüde işlem basamakları içeren ve takibinde pişirilmeden veya yeterli ısıtma yapılmadan oda sıcaklığında bırakılan yiyeceklerde etkenin güçlü bir şekilde üremesi söz konusudur. Yüksek protein içerikli gıda ürünleri, *S. aureus* için özellikle iyi büyüme substratlarıdır. Çiğ ve işlenmiş et, kümes hayvanları, muhallebi veya krema dolgulu hamur işleri gibi unlu mamuller, kremalı turtalar ve çikolatalı ekler, mayonez gibi sos içinde bulunan kabuklu deniz ürünleri, yumurta, ton balığı, tavuk, patates ve makarna salataları, sandviç dolgular, süt, süt ürünleri, dondurma ve yumuşak peynirler, *S. aureus* ile kolayca kontamine olup gelişmesine uygun ortam sağlamaktadır (Kaya ve diğerleri., 2015).

*S. aureus*, mide bulantısı, kusma ve ishal ile karakterize tipik bir gıda zehirlenmesine neden olan ve bakteri yükü 105 kob/g ya da ml'ı aştığında üretilen bir veya daha fazla önceden oluşturulmuş enterotoksin ile kontamine yiyeceklerin tüketimiyle bağlantılı mikroorganizmadır (Mekonnen, 2018).2073/2005 sayılı AB mevzuatında çiğ sütten üretilen peynirlerde koagülaz pozitif stafilokok için alt ve üst sınırlar belirlenmiştir. Stafilokok sayısının en yüksek olması beklenen üretim süreci sırasında bu proses hijyen kriterlerin geçerli olduğu aşama olarak belirlenmiştir.

**2.2.2. *Staphylococcus aureus’un* Çoğalmasına ve Enterotoksin Oluşumuna Etki Eden Faktörler**

*S. aureus* enterotoksinleri ısıya karşı çok dirençlidirler. Tibana vd., (1987) tarafından yapılan çalışmalarda SEA ve SEB toksinlerinin 100oC 90 dakika yada 120oC 30 dakika ısıl işlemle SEC toksininin de 100oC’de 180 dakika yada 120oC’de 60 dakika tamamen inaktif olduğu belirlenmiştir.

Diğer bir çalışmada burunlarında *S. aureus* kolonizasyonu bulunan sağlıklı 50 kişi ile, klinik enfeksiyon belirtileri bulunan 50 kişi ve stafilokokal gıda zehirlenmesi ile ilişkili 20 kişiden elde edilen *S. aureus* izolatları stafilokokal protein A (*spa)* tiplendirme yöntemleri karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda belli birkaç *spa* tipinin tüm gruplarda yaygın olduğu görülmüştür. Bu sebepten dolayı *S. aureus* ile kolonize veya enfekte olan gıda çalışanlarının stafilokokal gıda zehirlenmesinin kaynağı olabilecekleri düşünülmektedir (Wattinger vd., 2012). İspanya’da yapılan bir çalışmada gıdalar ve gıda ile uğraşan çalışanlardan alınan 64 adet *S. aureus* suşunun ekzotoksin gen içeriği ve antibiyotik direnç durumu incelenmiş, *spa* tiplendirmesi yapılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda; gıda zincirindeki dirençli ve hastalık yapıcı faktörleri taşıyan *S. aureus* suşlarının varlığının tüketiciler için potansiyel bir sağlık tehlikesi olabileceği öngörülmüştür (Argudin vd., 2010).

**2.2.3. Enterotoksin Tespit Etme Yöntemleri**

*S. aureus* analizi için kullanılan çok sayıda selektif besiyeri geliştirilmiştir olsa da gıdalarda *S. aureus* sayımında kullanılan standart yöntem Baird-Parker Agar besiyeri üzerine inokulasyon yapılmasıdır. Bu bakterinin yüksek tuz konsantrasyonuna dayanıklı olması, lityum klorür ve tellurite direnç göstermesi refakatçi florayı baskılamak için kullanılırken, telluriti telluriyuma indirgeyerek siyahlasma yapması ayırt edici bir özellik olarak görülmektedir (Özkan ve diğerleri.,1999; Acco ve diğerleri., 2003; Erol ve İşeri, 2004;EI-Jakee ve diğerleri., 2013).

Gıda zehirlenmesine neden olan *S. aureus*’untoksinlerinin belirlenmesi için güvenilir, hızlı, basit ve hassas analitik bir metot kullanmak gerekmektedir. Ticari test kitleri 0.5 ng/g’dan daha düşük konsantrasyonlardaki enterotoksinlerin değerlerinin belirlenmesi için yeterince hassas değildir. Bu nedenle enterotoksin konsantrasyonunu belirlemede örnek materyalin enterotoksin konsantrasyonu çok önemlidir (Acco ve diğerleri., 2003; Tütüncü, 2005; Gülbandılar ve diğerleri., 2012). Farklı metotlar farklı toksinlere karşı değişik sensivite ve spesifite göstermektedir (Hacıbektaşoğlu ve diğerleri., 1993; Gülbandılar, 2009; Doğan ve diğerleri., 2018).

**2.2.4. Peynir Üretiminde Mikroorganizmaların Kontaminasyon Kaynakları**

Peynir üretimi, yüzyıllar önce çiğ sütü uzun zamanlı dayanıklı hale getirmek ve kullanmak amacıyla fermantasyon yoluyla korumanın bir metodu olarak gelişmiştir. Laktobasil, streptokok ve laktokok gibi sütte doğal olarak bulunan faydalı floranın seçilmesi veya bunların starter kültürleri olarak doğrudan süte eklenmesi, ürünleri korumakta ve ortamda patojen bakteriler bulunduğunda rekabete izin vermektedir. Peynir üretiminde çiğ süt kullanıldığında, çiğ sütten gelen bazı patojen bakteriler peynir yapımı sürecinde de hayatta kalmaları nedeniyle peynirler patojenlerle kontamine olabilmektedir. Alternatif olarak, işleme tesisindeki sanitasyon ve diğer önlemler yeniden kontaminasyonu önlemek için yeterli değilse bakteriyel patojenler, işleme sonrası peyniri kontamine edebilmektedir. Laktobasil, streptokok ve laktokok gibi sütteki faydalı doğal floranın seçilmesi veya bunların starter kültürler olarak doğrudan eklenmesi, süt ürünlerini korumakla birlikte, patojen mikroorganizmalar ile rekabet oluşturmaktadır (Donelly, 2004).

Sütün ortalama pH değeri 6,6 ve aw değeri yaklaşık olarak 1,0 olduğundan, mikroorganizmaların gelişimi için uygun bir ortam oluşturmaktadır. Hastalığı olmayan sağlıklı bir hayvandan elde edilen sütler, temiz ve mikroorganizma içermemektedir. Sütte bulunan mikroorganizmalar: meme içi, meme ucu dışı ve yakın çevresi ve süt sağma ve süt işleme ekipmanı gibi kaynaklardan bulaşabilmektedir. Meme ucunun dışına bulaşan bakteriler meme başı deliğini ve oradan da memenin iç kısmını işgal edebilmektedir. Sağlıklı bir inekten aseptik olarak alınan süt normalde düşük sayıda, tipik olarak 102-103 kob/ml’den az organizma içermekte iken ve bazı çeyreklerden alınan süt steril nitelikte olabilmektedir. Memenin mikroflorası başlıca S*treptococcus*, *Staphylococcus* ve *Micrococcus* ile Laktik Asit Bakterileri, *Corynebacterium*, *E. coli* ve diğer mikroorganizmalardan oluşmaktadır. Ancak çiğ sütün mikroorganizmalar ile kontaminasyonu hayvanın vücudundan, beslendiği yemden, hava ve sudan, sağımda kullanılan ekipmandan ve muhafaza koşullarından kaynaklanabilmektedir. Hastalık ve benzeri durumlar ve sağım sırasında hijyene dikkat edilmediğinde, çiğ sütün genel mikroflorası değişmektedir. Süt endüstrisindeki ekonomik kaybın önemli bir nedeni olan meme dokusunun iltihaplı bir hastalığı olan mastitis nedeniyle sayılar sıklıkla daha yüksektir. Hastalığın erken akut aşamasında, mastitli sütteki bakteri sayısı 102 kob/ml aşabilmekte olup makroskopik değişiklikler genellikle sütte görülebilmektedir (Özer ve diğerleri, 2017).

Mastitisli hayvanlardan elde edilen sütler, yüksek sayıda mikroorganizma ve somatik hücre içermektedir. Mastitise neden olan mikroorganizmalar arasında *S. aureus*, *Str. agalactiae*, *Str. dysgalactiae*, *Str. uberis*, *E. coli*, *Actinomyces pyogenes*, koliform bakteriler, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, Koagulaz Negatif Stafilokoklar, *L. monocytogenes*, *C. bovis*, *Nocardia* spp. ve *Mycoplasma bovis* yer almaktadır. Halk sağlığı açısından risk oluşturan mikrooganizmalar *M. bovis*, *B. abortus*, *B. melitensis*, *Salmonella*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli, C. jejuni*, ve *Coxiella burnetii* hastalıklı hayvanlardan süte geçmektedirler. Sütün çevre faktörlerinden gelen kontaminasyonda LAB, koliform bakteriler, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus, Bacillus* ve *Clostridium*’lar yer almaktadır (Erol, 2007).

Enfekte olan inekler, memeye antibiyotik enjekte edilerek tedavi edilmektedir. Bu ineklerden elde edilen süt, tedaviyi takiben birkaç gün boyunca satıştan uzak tutulmalıdır çünkü antibiyotik kalıntıları, duyarsız tüketicilerde sorunlara neden olabilmekte ve fermente sütlerde başlangıç kültürü aktivitesini engelleyebilmektedir. İyi sağım hijyeni ile mastiti kontrol etme girişimleri, sağımdan sonra dezenfektan emzik daldırma kullanımı ve laktasyon sonunda antibiyotik infüzyonu streptokok ve stafilokok enfeksiyonlarını azaltmaya yardımcı olmakta ancak *E. coli* mastitini önlemede çok az bir başarı elde edebilmektedir. Memenin dışı ve yakın çevresi, ineğin genel çevresinden gelen organizmalarla kontamine olabilmektedir. Bu durum, ineklerin açık otlakta otlamasına izin verildiği yaz aylarında daha az sorun olmakta, iç mekanda ve ıslak koşullarda barındırıldıklarında en yoğun biçimde meydana gelmektedir. Ağır kontamine meme uçlarının süte 105 kob/ml kadar bir mikrobiyel yükle katkıda bulunduğu bildirilmektedir. Yatak ve gübre kaynaklı kontaminasyon *E. coli*, *Campylobacter* ve *Salmonella* gibi insan patojenlerinin kaynağı olabilmekte ve *Bacillus* türleri topraktan geçebilmektedir. *C. butyricum* ve *C. tyrobutyricum* gibi Clostridia türleri ineklere verilen silajdan süte taşınabilmekte ve büyümeleri bazı peynirlerde geç şişme olarak bilinen soruna neden olabilmektedir (Yerlikaya, 2018). Meme başlıkları, borular, süt tutucular ve saklama tankları gibi süt işleme ekipmanları, çiğ sütte bulunan mikroorganizmaların ana kaynağıdır. Sütün genel kalitesi düştükçe bu kaynaktan elde edilen mikrofloranın oranı artmaktadır. Süt besleyici bir ortam olduğundan ekipmanın yetersiz temizlenmesi dırımunda, sıklıkla ıslak bırakılan yüzeylerdeki süt artıkları ve süt yığınlarını kontamine olmakta, mikrobiyal gelişme için bir odak işlevigörnektedir. Temizlik ısrarla ihmal edilirse, süt taşı olarak bilinen hidrofobik, mineral bakımından zengin tortu, özellikle ısıtılmış yüzeylerde birikebilmektedir. Bu, organizmaları dezenfektanlardan koruyacak ve *Micrococci* ve enterokok gibi daha yavaş büyüyen organizmaların gelişmesine izin verecektir. Bunların çoğu termodürik olup pastörizasyonla öldürülmeyebilmektedir (Akan ve diğerleri, 2014).

Hammade olarak çiğ sütün kalitesi tüm peynir türlerinin üretiminde büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda, çiğ sütten üretilen peynirlerde bazı standartlara uyulması gerekmektedir. Düşük bakteri sayısı ve düşük somatik hücre sayısı, süt kalitesinin temel göstergeleri olup sayıları arttıkça, süt ve peynirin patojenlerle kontaminasyon riski yükselmektedir.

Ürün güvenliğini sağlamak amacıyla sütteki bakteri ve somatik hücre sayımlarının izlenmesi ve kontrol edilmesi bir Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) programının planı olmalıdır. Genel olarak, çiğ süt bakterileri ve somatik hücre sayıları yüksek olduğunda, peynir kalitesi üzerinde tüketici kabulünü ve peynir verimini düşürebilecek başka olumsuz etkiler olacaktır. Geleneksel peynir üretiminde, sağımdan peynir yapımına kadar geçen süre çok kısadır ve bazı durumlarda süt soğutulmadan çiftlikte hemen peynir haline getirilmektedir. Süt toplanmasından peynir yapımının başlamasına kadar geçen sürenin en aza indirilmesi, çiğ sütte istenmeyen bakterilerin çoğalması fırsatını azaltmaktadır. Aksine, süt soğutulduğunda ve nakil sırasında uzun süre tutulduğunda, patojen gelişimi, özellikle de psikrotrofik patojenlerin büyümesi fırsatı artmaktadır (Sağlam ve Şeker, 2016).

Peynirde mikrobiyal patojenlerin çoğalması iç ve dış faktörler tarafından belirlenmektedir. Önemli iç faktörler arasında nem içeriği, pH ve asitlik, besin içeriği, redoks potansiyeli, antimikrobiyal bileşiklerin varlığı, doğal olarak bulunan veya gıda koruyucuları olarak eklenenler, örneğin rekabetçi mikrofloranın varlığı yer almaktadır. Tüm bu faktörler, bakteriyel patojenlerin peynirlerde gelişme, kalıcılık veya azalma potansiyelini belirlemektedir. Dışsal parametreler, paketleme/paketleme atmosferi türü, saklama ve bekletme koşullarının süresi ve sıcaklığı, işlem adımları, ürün geçmişi ve geleneksel kullanım gibi faktörleri içermektedir. Bu faktörlerin etkileşimi, peynirdeki mikrobiyal çoğalma potansiyelini belirlemektedir. Peynir güvenliğinde patojen *S. enterica*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* ve enteropatojenik *E.coli* bakterileri sağlık açısından risk olarak değerlendirilmektedir. Starter bakteriler kullanılırsa düşük rekabet kuvvet özelliği nedeni ile *S. aureus* az riskli patojen olarak kabul edilmektedir. Diğer taraftan, starter bakteriler kullanılmadığı zaman yüksek sayıda *S. aureus* bakterileri toksin oluşturma yeteneğindedir. Patojenik bakteriler açısından peynirin güvenliğine katkıda bulunan faktörler arasında süt kalitesi, starter kültürü veya peynir yapımı sırasında doğal laktik asit bakteriyel gelişmesi, pH, tuz, yaşlanma koşullarının kontrolü ve olgunlaşma sırasında peynirde meydana gelen kimyasal değişiklikler yer almaktadır (Donelly, 2004).

**2.2.5. Peynir Üretiminde Hijyen ve HACCP Uygulamaları**

HACCP üretim sisteminde tehlike analizinin yapılması, kritik kontrol noktalarının tespit edilmesi, kritik limitlerin belirlenmesi, kritik kontrol noktalarının kontrolünü takip edebilmek için bir izleme sisteminin kurulması, bir kritik kontrol noktasında kritik limitlerin üzerine çıkıldığı zaman yapılması gereken düzeltici faaliyetlerin belirlenmesi, HACCP sisteminin etkinliğinin tespiti için bir doğrulama prosedürünün oluşturulması ve bu adımların uygulanmasında kullanılan tüm işlem ve kayıtlara ilişkin dokümantasyon oluşturulmasından oluşan 7 temel ilkeye dayanmaktadır (Singh ve diğerleri, 2018). Sistemde oluşabilecek tehlikelerin (fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik) belirlenmesi ve bunların detaylı analizlerinin yapılması, HACCP sistemini yerleştirmek için gerekli ön gereksinim programlarının uygulanması (İyi üretim uygulamaları, standart sanitasyon operasyonel uygulamaları gibi) çok büyük önem arz etmektedir.

Çoğu süt ürününde en önemli tehlikelerden bir tanesi mikrobiyolojik tehlikelerdir. Peynir fabrikalarında gıda güvenliğini tehlikeye uğratabilecek temel unsurlarından bir tanesi, çiğ sütte ki mikrobiyel-patojen kontaminasyon düzeyidir. Ayrıca üretim aşamalarında kontaminasyon ve çoğalmaya neden olan kaynakların başında gıda ile teması olan kişilerin hijyen koşullarına dikkat etmemesi, peynire temas eden yüzeylerin temiz olmaması ve kullanılan ekipmanların temizlik durumları gelmektedir. Ayrıca üretimde gerek ısıtmada gerek soğutmada kullanılacak olan sıcaklık-zaman parametrelerinin patojenlerin yıkımlanmasını sağlaması ve çoğalmalarına imkan vermemesi gerekmektedir. Peynir üretimi için oluşturulan tehlike analizinin amacı, çeşitli hammaddelerde ve işleme adımlarında oluşabilecek tehlikeyi belirlemek ve aynı zamanda meydana gelebilecek tehlikeler için kontrol çözümleri önermektir.

Çalışmanın amacı tulum peynirlerinden izole edilen *S. aureus* saha izolatlarının klasik stafilokokkal enterotoksin (SEA-SEE) oluşturma yeteneklerinin ELISA yöntemi kullanılarak araştırılması ve kontaminasyonların oluşturabileceği halk sağlığı risklerinin değerlendirilmesidir.

**3. GEREÇ VE YÖNTEM**

## 3.1. Gereç

Bu çalışmada, Aydın ilinde farklı mandıralarda üretilen ve satışa sunulan tulum peynirlerinden elde edilen *S. aureus* izolatlarının klasik SE’leri (A-E) üretme yeteneği araştırılmıştır. Bu amaçla Adnan Menderes Üniversitesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim dalı mikrobiyoloji laboratuvarına soğuk zincir altında getirilerek konvansiyonel olarak tespiti TSE 6582 ISO 6888-1 (2001) standardı çerçevesinde gerçekleştirilmiş ve hem serolojik hem de moleküler olarak doğrulanan ve klasik enterotoksin genleri araştırılan *S. aureus* izolatlarının SE (A-E) oluşturma yetenekleri RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E R4101 (R-Biopharm AG, Germany) ELISA kitleri kullanılarak tespit edildi. Bu kit katı ve sıvı gıdalarda ve ayrıca bakteriyel kültürlerde SEA-SEE’nin varlığını belirleyebilmektedir.

**3.1.1. Örneklerin Alınması**

Anabilim Dalı’mız bünyesinde 2019-2021 yılları arasında sürdürülmüş olan ve anabilim dalı envanterinde yer alan 150 adet tulum peyniri örneğinden elde edilen ve stoklanan 24 adet *S. aureus* izolatı materyal olarak kullanılmıştır.

**3.2. Yöntem**

Çalışmada daha öncesinde izole edilip -18℃’de dondurulan *S. aureus* saha izolatları, Brain Heart Infusion (M210, HIMEDIA) içerisinde çözündürüldü ve Tryptic Soy Agar’da (M1968, HIMEDIA) pasajlandı. Kontaminasyon riski göz önünde bululundurularak pasajlanan izolatlar Egg Yolk Tellurite Emulsion (FD046, HIMEDIA) ilave edilmiş Baird Parker Agar’da (M043, HIMEDIA) saflaştırıldı.

**3.2.1. *S.aureus’un* Kültürel Yöntemler ile İzolasyon ve İdentifikasyonu**

**3.2.1.1. Baird Parker Agar’da (BPA) Gelişim**

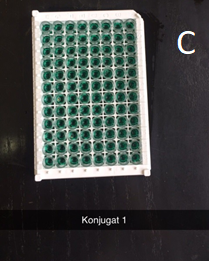
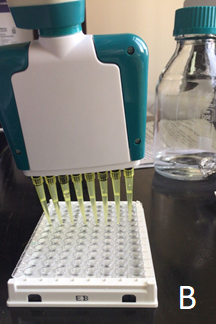
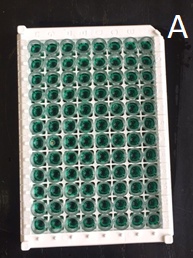
Besiyeri önceden hazırlanıp soğutulmuştur ve steril pipet ile numuneler petrilere ekim yapılmıştır. Petriler ters döndürülerek 37°C’ de etüvde 48 saat inkübe edilmiştir. Petriler 37°C’de 48 saat etüvde inkübe edildikten sonra oluşan koloniler Şekil 2’de gösterilmiştir.

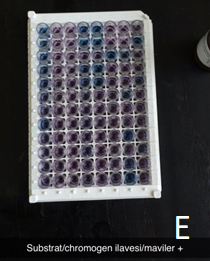
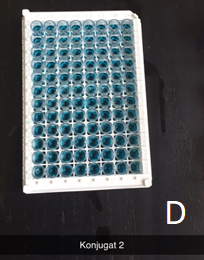
##### C:\Users\dell\Desktop\Yeni klasör (6)\IMG-20220722-WA0034.jpg

**Şekil 2.** BPA’da gelişim.

**3.2.1.2. ELISA Tekniği ileToksin Üretiminin Tespiti**

Her bir ELISA kiti 12 strip içermekte, striplerdeki ilk 5 kuyucukta (A-E) stafilokokkal enterotoksinlere karşı özel antikorlar, geri kalan kuyucukların 2 tanesi non-immunize hayvan antikorları içeren negatif kontrol (F-G), son kuyucuk ise (H) pozitif kontrol bulunmaktadır (Şekil 3). ELISA Testi firmanın kullanma kılavuzunda belirtildiği şekilde uygulanmıştır. Bu amaçla saflaştırılan izolatlardan alınan koloniler brain heart infusion (BHI)’a aktarılarak 37℃’de 24 saat inkubasyonu takiben 5 dk 10°C’de en az 3500 rpm olacak şekilde santrifüje edildi. Takibinde steril filtreler kullanılarak supernatant filtre edilip, asılı ya da presipite hücre kalmamasına özen gösterilmiştir. Test tablasında (Microplate) kullanılacak her bir kuyucuk için 100 µl filtrat kullanıldı. Mikroplatein A-G kuyucuklarına ve pozitif kontrol H kuyucuğuna 100 µl örnek ilave edilmiştir (A). Elle hafif sallanılan mikroplatein üzeri kapatılıp 35-37°C’de 1 saat inkübe edildi. Kuyucuklarda ki sıvılar lavaboya dökülerek test tablaları yüz üstü gelecek şekilde temiz filtre havluların üzerine 3 kez hafif vurularak içerisindeki sıvılar uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuk 300 µl yıkama sıvısıyla yıkanıp (B); Takibinde kuyucuklar tekrar boşaltılarak, yıkama işlemleri 4 defa daha tekrarlandı. Her bir kuyucuğa 100 µl konjugat I ilave edilerek mikroplate yavaş yavaş elle çalkalandı (C). Takibinde mikroplatein üstü kapatılarak 35 - 37 °C’de 1 saat inkübe edildi. Kuyucuklarda ki sıvılar lavaboya dökülerek mikroplateler yüz üstü gelecek şekilde temiz filtre havluların üzerine 3 kez hafif vurularak içerisinde ki sıvılar uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuk 300 µl yıkama sıvısıyla yıkanıp; Takibinde kuyucuklar tekrar boşaltılarak, yıkama işlemleri 4 defa daha tekrarlandı. Her bir kuyucuğa 100 µl konjugat II ilave edilerek plate yavaş yavaş elle çalkalanıp (D) ; Takibinde mikroplate üstü kapatılarak 35 - 37 °C’de 30 dk inkübe edildi. Kuyucuklarda ki sıvılar lavaboya dökülerek tablalar yüz üstü gelecek şekilde temiz filtre havluların üzerine 3 kez hafif vurularak içerisinde ki sıvılar uzaklaştırdı. Her bir kuyucuk 300 µl yıkama sıvısıyla yıkandı. Takibinde kuyucuklar tekrar boşaltılarak, yıkama işlemleri 4 defa daha tekrarlandı. Her bir kuyucuğa 100 µl of substrate/chromogen ilave edilip elle plate hafifçe çalkalanıp, üzeri kapatılarak 35-37 °C’de 15 dk inkübe edildi. Durdurma (stop) solüsyonundan 100 µl her bir kuyucuğa ilave edilerek mikroplate elle yumuşak bir şekilde çalkalandı (E), 450/620 ± 10 nm absorbans değerinde ELISA cihazı okuyucusunda (ELISA Reader MINDRAY MR-96A) de durdurma solüsyonunun ilavesinden sonra 30 dk içerisinde okutuldu ve elde edilen sonuçlar değerlendirildi.





**Şekil 3.** Toksin üretiminin tespitinde ELISA tekniğinin basamakları.

# 4. BULGULAR

## 4.1. *S. aureus*’un Analiz Sonuçları

Aydın ilinde farklı mandıralarda üretilen ve satışa sunulan tulum peynirlerinden elde edilen 24 izolattan 8’inin (%33,3) ELISA yöntemi kullanılarak klasik enterotoksinlerden en az birini üretme yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 3’te izolatlara ait ELISA yöntemiyle 450 nm dalga boyunda belirlenen klasik enteroksinlerin varlığı belirtilmiştir. Yapılan analizler doğrultusunda 8 enterotoksijenik izolattan sırasıyla %62,5’inin SEE, %50’sinin SED, %37,5’inin SEB ve %25’inin SEA ve SEC enteroroksinlerini üretebildiği gözlemlenmiştir. *S. aureus* izolatlarına ait klasik enterotoksinlerin dağılımı Tablo 4’te gösterilmiştir.

**Tablo 3.** *S. aureus* izolatlarında klasik enterotoksinlerin varlığı.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | ***S. aureus* izolatları (n:12)** | | | | | | | | | | | |
|  | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **7** | **8** | **9** | **10** | **11** | **12** |
| **SEA** | 0,0457 | 0,0443 | 0,0454 | 0,0461 | **0,1994** | 0,0452 | 0,0475 | 0,0476 | 0,0476 | 0,0556 | 0,0488 | 0,0478 |
| **SEB** | 0,0470 | 0,0420 | 0,0414 | 0,0466 | 0,0467 | 0,0423 | 0,0511 | 0,0477 | **0,4474** | 0,0478 | 0,1047 | 0,0501 |
| **SEC** | 0,0486 | 0,0439 | 0,0438 | 0,0506 | 0,0481 | 0,0443 | 0,0480 | 0,0614 | 0,0482 | 0,0473 | 0,0480 | **0,4612** |
| **SED** | **0,8503** | 0,0428 | 0,0425 | **0,7417** | **0,5117** | 0,0424 | 0,0486 | 0,0481 | 0,0470 | 0,0473 | 0,0541 | 0,0472 |
| **SEE** | **0,4229** | 0,0424 | 0,0447 | **0,2665** | **0,2140** | 0,0418 | 0,0519 | 0,0600 | **0,3575** | 0,0665 | 0,0537 | 0,0621 |
| **F (negatif kontrol)** | 0,0468 | 0,0461 | 0,0426 | 0,0453 | 0,0496 | 0,0418 | 0,0474 | 0,0471 | 0,0605 | 0,0481 | 0,0479 | 0,0466 |
| **G (negatif kontrol)** | 0,0477 | 0,0437 | 0,0424 | 0,0458 | 0,0490 | 0,0428 | 0,0488 | 0,0506 | 0,0490 | 0,0568 | 0,0527 | 0,0501 |
| **H (pozitif cont)** | 0,2753 | 0,2862 | 0,3183 | 0,3256 | 0,2478 | 0,2441 | 0,2930 | 0,2096 | 0,2751 | 0,2934 | 0,2767 | 0,2648 |
| **Eşik değer** | 0,1973 | 0,1949 | 0,1925 | 0,1956 | 0,1993 | 0,1923 | 0,1981 | 0,1989 | 0,2048 | 0,2025 | 0,2003 | 0,1984 |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

28

**Tablo 3.** *S. aureus* izolatlarında klasik enterotoksinlerin varlığı (devamı).

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | ***S. aureus* izolatları (n:12)** | | | | | | | | | | | | |
|  | **13** | **14** | **15** | **16** | **17** | **18** | **19** | **20** | **21** | **22** | **23** | **24** |
| **SEA** | 0,0421 | **0,6466** | 0,0520 | 0,0412 | 0,0414 | 0,0508 | 0,0475 | 0,0476 | 0,0423 | 0,0556 | 0,0488 | 0,0422 |
| **SEB** | 0,0422 | 0,0479 | **0,2708** | 0,0416 | 0,0410 | **0,2341** | 0,0511 | 0,0477 | 0,0426 | 0,0478 | 0,1047 | 0,0424 |
| **SEC** | 0,0424 | 0,0498 | **0,5969** | 0,0448 | 0,0412 | 0,0502 | 0,0480 | 0,0614 | 0,0415 | 0,0473 | 0,0480 | 0,0422 |
| **SED** | 0,0495 | **2,3136** | 0,0623 | 0,0424 | 0,0433 | 0,0476 | 0,0486 | 0,0481 | 0,0419 | 0,0473 | 0,0541 | 0,0425 |
| **SEE** | 0,0438 | **2,0562** | 0,0521 | 0,0418 | 0,0436 | 0,0488 | 0,0519 | 0,0600 | 0,0418 | 0,0665 | 0,0537 | 0,0425 |
| **F (negatif kontrol)** | 0,0425 | 0,0509 | 0,0476 | 0,0403 | 0,0438 | 0,0482 | 0,0474 | 0,0471 | 0,0505 | 0,0481 | 0,0479 | 0,0414 |
| **G (negatif kontrol)** | 0,0427 | 0,0491 | 0,0476 | 0,0410 | 0,0426 | 0,0486 | 0,0488 | 0,0506 | 0,0432 | 0,0568 | 0,0527 | 0,0439 |
| **H (pozitif kontrol)** | 0,2446 | 0,2736 | 0,4067 | 0,3422 | 0,2440 | 0,2219 | 0,2077 | 0,2512 | 0,2620 | 0,2606 | 0,2845 | 0,3427 |
| **Eşik değer** | 0,1973 | 0,2000 | 0,1976 | 0,1907 | 0,1932 | 0,1984 | 0,1981 | 0,1989 | 0,1969 | 0,2025 | 0,2003 | 0,1927 |

29

**Tablo 4.** *S. aureus* izolatlarına ait klasik enterotoksinlerin dağılımı.

|  |  |
| --- | --- |
| **İzolat No** | **Klasik Enterotoksin** |
| **1** | SED, SEE |
| **4** | SED, SEE |
| **5** | SEA, SED, SEE |
| **9** | SEB, SEE |
| **12** | SEC |
| **14** | SEA, SED, SEE |
| **15** | SEB, SEC |
| **18** | SEB |

# 5. TARTIŞMA

Ülkemizde üretilen sütlerin %40’ı peynir olarak işlenmektedir. Bu peynirlerin %60’ını beyaz peynir oluştururken, %17’sini kaşar peyniri, %12’sini tulum peyniri ve %11’ini ise yöresel peynirler oluşturmaktadır (Aytaç, 2018). Peynir, Türkiye’de en yoğun olarak tüketilen süt ürünlerinden birisidir. Yıllar itibariyle üretimine paralel olarak tüketiminde de artış olan ve en yüksek pazar payına sahip peynir çeşidi beyaz peynirdir. 2018 yılı kişi başına düşen yıllık peynir tüketim miktarının 18,4 kg olduğu tahmin edilmektedir (USK, 2018). Yaygın bir şekilde üretilen ve tüketilen peynir çeşitleri, sütün elde edilmesinden itibaren tüketime kadar tüm aşamalarda hijyenik kurallara uyulmadığı takdirde halk sağlığı için tehlike unsuru haline dönüşebilmektedir (Aytaç, 2018).

Stafilokokal gıda zehirlenmeleri, *S. aureus* tarafından sentezlenen ve sindirim sistemi üzerine etkili olan enterotoksinlerin gıdalarla birlikte vücuda alınması sonucu ortaya çıkan gıda kaynaklı zehirlenmelerden birisidir. *S. aureus*’un da dahil olduğu pek çok stafilokok türü, insanların üst solunum yolları ve derilerinde doğal olarak bulunmaktadır. Gıda zehirlenmelerine neden olan *S. aureus* kontaminasyonunda en önemli etkenlerden birisinin insan olduğu saptanmıştır (Küplülü ve diğerleri, 2002). Sıcakkanlı hayvanların ise burun deliklerinde, derilerinde ve tüylerinde bulunan *S. aureus* aynı zamanda önemli bir mastitis etkenidir (Küçükçetin ve Milci, 2008). Özellikle mastitisli ineklerden elde edilen sütlerin, sağlıklı ineklerden elde edilen sütlere karışmış olması, süt ve süt ürünleri için en önemli kontaminasyon kaynağı olarak kabul edilmektedir (Küplülü ve diğerleri, 2002). *S. aureus*’un oldukça geniş sıcaklık, pH ve sodyum klorür aralığında gelişebilmesi birçok gıda maddesinde canlı kalmasını kolaylaştırmaktadır. Bu gibi özellikleri ile *S. aureus*, peynir gibi süt ürünlerinin işlenmesi sırasında çoğalmaya uygun bir ortam bulabilmektedir (Küçükçetin ve Milci, 2008). Peynirlerden kaynaklanan stafilokokal gıda zehirlenmeleri tüm dünyada yaygın olarak karşılaşılan önemli bir sorundur. Peynir yapılacak olan çiğ süte *S. aureus* meme derisinden, hayvanın vücut yüzeyinden, sağım yapan kişinin ellerinden, sağım ekipmanından ve çevresel kaynaklardan (hava, su, yem) bulaşabilmektedir (Erol 2007, Morandi ve diğerleri 2009).

*S. aureus*’un neden olduğu gıda zehirlenmelerinin süt ürünleri içerisinden çoğunlukla peynirden kaynaklandığı belirtilmektedir (Erol ve İşeri, 2004). Herhangi bir sebep ile *S. aureus* kontaminasyonu şekillenmesini takiben uygun muhafaza koşullarının (< 7°C) sağlanmaması etkenin gelişerek toksin sentezlemesine neden olmakta ve enterotoksin oluşumu sonrasında uygulanan pişirme, pastörizasyon gibi işlemler toksin eliminasyonunda yetersiz kalarak stafilokokal gıda intoksikasyonuna neden olmaktadır (Erol, 2007).

İncelenen 52 adet Urfa peynir örneğinin Baird Parker Agar'a yapılan ekimleri sonucu toplam 48 adet örnekte (%92) şüpheli *Staphylococcus aureus* kolonileri yönüyle üreme olduğu belirlenmiştir. Örneklerde ortalama *S. aureus* yükünün 4,48 log kob/g olduğu görülmüştür (Binöl ve Özmen, 2016).

Muğla Halk Pazarında satışa sunulan ev yapımı peynirlerden elde edilen 26 adet peynir örneğinde *Staphylococcus aureus* 1.3x104 kob/g olarak tespit edilmiştir (Uğur, 2001).

İstanbul ve Şanlıurfa’daki halk pazarı ve marketlerde satışa sunulan Urfa peyniri örneklerinden izole edilen toplam 52 adet Urfa peyniri örneğinin 48’inde (%92) ortalama 4.48±1.76 logkob/g düzeyinde *S. aureus* tespit edilmiş ve örneklerin sadece %25’inin Türk Gıda Kodeksi’ne uygun olduğu belirlenmiştir. Elde edilen 64 izolatın 22’sinin (%34.4) koagülaz pozitif, 31’inin (%48.4) DNaz pozitif olduğu, 20’sinin (%31.25) ise metisiline karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda analiz edilen Urfa peyniri örneklerinde enterotoksin üretme potansiyeli yüksek ve metisiline dirençli *S. aureus* izolatlarının bulunduğu, bu nedenle bu peynirlerin tüketiminin halk sağlığı için riskli olabileceği görülmüştür (Bingöl ve Özmen, 2017).

Bastam ve diğerleri (2021) aralarında 30 adet peynir örneğinin de bulunduğu toplam 100 süt ve süt ürününü incelemişler ve bu 100 örnekten 10 tanesinin, 30 adet peynir örneğinden de 3 tanesinin *S. aureus* ile kontamine durumda olduğunu bulmuşlardır. Araştırmacılar etken ile peynirlerin kontaminasyonunun, üretimde kullanılan sütlerin yetersiz düzeyde pastörize edilmesinden ya da süte pastörizasyon uygulanmadan işlenilmesinden kaynaklanmış olabileceği belirtilmiştir.

Etiyopya’da aralarında 28 adet peynir örneğinin de bulunduğu toplam 486 adet süt ve süt ürününü incelenmiştir. Bu ürünlerden 52 tane örneğin (%10,69), 28 adet peynir örneğinden de 4 tanesinin (%14,29) *S. aureus* ile kontamine olduğu tespit edilmiştir. Etkenin peynirlere üretim süreci ile yakın temasta olan kişilerden ya da yüzeylerden bulaşmış olabileceği değerlendirilmiştir (Gebremedhin ve diğerleri, 2022).

André ve ark. (2008) Brezilya’da bir peynir üretim tesisinde yapmış oldukları çalışmada tesiste çalışanların ellerinden 73 *S. aureus* izolatı (%75) elde ederken, bu oran çiğ süt örneklerinden izole edilenler için % 66,7 ve Minas Frescal peynirinden izole edilenlerde %70,8 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar peynir üretiminde çiğ sütün *S. aureus* kontaminasyonu açısından çok önemli olduğunu göstermiştir.

İzmir ilinde satışa sunulan peynirlerin stafilokokal enterotoksin içeriğinin araştırıldığı bir çalışmada, çeşitli firma ve mandıralara ait beyaz, kaşar, tulum ve Van otlu peynirleri incelenmiştir. Yapılan analizler sonucunda örneklerde en çok tespit edilen enterotoksin tipinin %58.8 oranıyla SEA olduğu, bunu sırasıyla SEB (%41.2), SEC (% 11.8) ve SED (%5.9)’nin izlediği tespit edilmiştir (Demirel ve Karapınar, 2004).

Tasçı ve diğerleri (2011) inceledikleri 50 peynir örneğinden 3 tanesinin stafilokokkal enterotoksinler (SEB, SEC ve SEC) ile kontamine olduğunu ELISA yöntemiyle tespit etmişlerdir. Bostan vd (2006) ise inceledikleri 50 beyaz ve 50 tulum peyniri örneğinde ELISA yöntemiyle SE aramışlar, ancak hiçbir örnekte SE bulamamışlardır.

Andretta ve diğerleri (2019) serro peynirinde PCR ve ELISA kullandıkları çalışmada klasik satfilokokkal enterotoksinlere (SEA, SEB, SEC, SED, and SEE) ve bu toksinleri enkode eden genlere rastlamamışlardır. Araştırmacılar süt ürünleri üretim teknolojilerinde etkin süt sağım uygulamaları ve işletme hijyen koşullarıyla kontaminasyon riskinin düşürülebileceğini belirtmişlerdir.

Enterotoksinlerin saptanmasında immünolojik metotlar (ELISA) yüksek spesifitesi, etkinliği ve kompleks alet-ekipmana ihtiyaç duyulmaması açısından önemli bir metot olarak tanımlanmaktadır (Le Loir and Hennekinne, 2014). Ancak olası non-spesifik etkileşimlerin yanlış pozitif sonuçlar verebileceği de belirtilmektedir (Verzony-Rozand ve diğerleri, 2004). ELISA yönteminin SEA tespitinde sadece süt ürünlerinde değil aynı zamanda soslarda ve karaciğer mousse’da da etkin bir şekilde kullanılabileceği Clarisse ve diğerleri. (2013) tarafından belirtilmiştir. Benzer şekilde yaptıkları çalışmada Valihrach ve diğerleri (2014) ELISA yöntemini sütte SEC aranmasında etkin bir şekilde kullanmışlardır. Ertaş ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada ELISA tekniğini koyun peynirlerinde ve sütlü tatlılarda klasik enterotoksin seviyelerinin belirlenmesinde kullanmışlar ve izole ettikleri 80 izolatın 12 tanesinin SE üretebilme kapasitesine sahip olduğunu, bu izolatların ürettikleri stafilokokkal enterotosinler bazında dağılımını ise 7 (%1.6) SEA, 2 (%0.46) SEB, 1 (%0.23) SEC, and 2 (%0.46) SED olarak bulmışlardır. SE’lerin ürünlerde ki dağılımı ise peynirde 7 (%2.3) ve sütlü tatlılarda 5 (%3.8) olarak belirlenmiştir.

# 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Gıda güvenliği, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde halk sağlığını ilgilendiren önemli konulardan birisidir. Gıda kaynaklı hastalıkların dünya çapında düzeyini tahmin etmek güç olmakla birlikte, kontamine gıda ve su tüketimi sonucu çok sayıda gıda kaynaklı enfeksiyon ve intoksikasyonlar şekillenmektedir.

Sütlerin pastörize edilmeden ya da hatalı pastörizasyondan sonra peynire işlenmesi ya da mastitisli sütlerin kullanılması, uygun olmayan üretim koşulları ile üretim yapan personelin hijyenik durumunun yetersiz olması, pastörizasyon sonrası sütte görülen kontaminasyonlar ile ürünün işlenmesi ve depolanması sırasındaki uygun olmayan sıcaklık dereceleri peynirlerde stafilokokal enterotoksinlerin oluşmasına neden olan en önemli faktörlerdir.

Başta meme sağlığı olmak üzere sağım hijyenine gereken önemin verilmesinin, subklinik mastitisli ve/veya mastitis şüpheli sütlerin normal sütlere karıştırılmasının önlenmesinin, sağımda kullanılan araç ve gereçler ile sağımdan sonra kullanılan saklama ve taşıma kaplarının temizliğine dikkat edilmesinin, tedarik zincirinde gerekli önlemlerin alınmasının, çalışan personelin hijyenine ve eğitimine gerekli önemin verilmesinin sütte *S. aureus* üremesi ve enterotoksin oluşturma riskini en aza indirebileceği sonucuna varılmıştır.

# KAYNAKLAR

Acco, M., Ferreira, F.S., Henriques, J.A.P., Tondo, E.C. (2003) Identification of Multiple Strains of Staphylococcus aureus Colonizing Nasal Mucosa of Food Handlers. ; 20: 489-493.

Akan E., Yerlikaya O., Kınık Ö. (2014) Psikrotrof Bakterilerin Çiğ Süt ve Süt Ürünleri Kalitesine Etkisi, Akademik Gıda; 12(4): 68-78.

André, M. C. D. P. B., M. R. H. Campos, L. J. Borges, A. Kipnis, F. C. Pimenta, and A. B. Serafini. (2008). Comparison of Staphylococcus aureus isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following SmaI digestion. 19:200–207.

Andretta, M., T. T. Almeida, L. R. Ferreira, A. F. Carvalho, R. S. Yamatogi, and L. A. Nero. (2019). Microbial safety status of Serro artisanal cheese produced in Brazil. *Journal of Dairy Sci*ence 102:10790–10798

Appelbaum, PC. (2006) MRSA –the tip of the iceberg,Clin Mikrobiol Infect;12(Supp 2):3-10.

Arda, M., Minbay, A., Aydın, N. (1982) Özel Mikrobiyoloji. Ankara . Ankara Üniversitesi Basımevi; 96-106.

Argudin M.A., Mendoza M.C., Rodicio M.R. (2010) Food Poisoning And Staphylococcus aureus Enterotoxins. Toxins,; 2: 1751-1773.

Baran A., Erdoğan A. ,Turgut T., Adıgüzel M., C. (2017) A Review on the Presence of Staphylococcus aureus in Cheese, *Tütrkiye Doğa ve Fen Dergisi*; 6 (2): 100-103.

Bastam, M.M., Jalili, M., Pakzad, I., Maleki, A., Ghafourian, S. (2021). Pathogenic bacteria in cheese, raw and pasteurised milk. *Veterinary Medicine and Science*, 7(6), 2445-2449. doi:10.1002/vms3.604

Becker, K., Heilmann, C., Peters, G. (2014) Coagulase negative Staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*.;27(4):870-926.

Berkiten, R. (2005) Staphylococcus. Tıbbi Mikrobiyoloji-2- Ed: Bozkaya, E. Nobel TıpKitabevleri, , s: 3-11.

Bhati, T. (2019) Clonal Association of Staphylococcus aureus isolates from milk of cattle with clinical mastitis, udder surfaces and milkers based on some virulence and antibiotic resistance genes, department of veterinary microbiology and biotechnology, College of Veterinary and Animal Science.Rajasthan Univercity Doctor of philosophy,; 26p,Bikaner.

Bintsis T., Papademas P. (2017) *An Overview of the Cheesemaking Process: Cheese Quality and Characteristics*. Department of Agricultural Sciences, Biotechnology and Food Science, Cyprus University of Technology, Limassol, Cyprus.

Black, R.E., Williams, S.M., Jones, L.E., Goulding, A. , (2002) Children Who Avoid Drinking Cow Milk Have Low Dietary Calcium Intakes and Poor Bone Health. *The American Journal of Clinical Nutrition* ; 76(3), 675-680.

Bremer, PJ., Fletcher, GC., Osborne, C. (2004) Editors. Staphylococcus aureus. Christchurch, New Zealand, New Zealand Institute for Crop and Food Research Limited; 29(8):640-653.

Carrascosa, C., Millán, R., Saavedra, P., Jaber, J.R., António Raposo, A., Sanjuán E. (2016) Identification of the risk factors associated with cheese production to implement the hazard analysis and critical control points (HACCP) system on cheese farms. *American Dairy Science Association*; 99: 2606–2610. doi:10.3168/jds.2015-10301

Çakıcı, N., Demirel-Zorba, N.N., Akçalı, A. (2015) Gıda Endüstrisi Çalışanları ve Stafilokokal Gıda Zehirlenmeleri. *Türk Hijyen Ve Deneysel Biyoloji Dergisi*; 72(4): 81 – 94.

Çalık, Z. (1998). *Koagülaz olumlu ve olumsuz stafilokok suşlarında metisilindirenci ve çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıkları.* Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Da Silva,E.R., Da Silva,N. (2005) Coagulase gene typing of Staphylococcus aureus isolated from cows with mastitis in southeastern Brazil. Can J Vet Res.; 69(4),260.

Demirel, N. N. , Karapınar, M. (2004) "Incidence Of Staphylococcus Aureus And Its Enterotoxins In Various Cheeses Sold At Retail Markets Of Izmir City". *Akademik Gıda* 2 : 27-30

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

Dominique, M., Olaf S. (2016) Staphylococcus aureus vaccines: Deviating from the carol. *Journal of Experimental Medicine*.; 213 (9): 1645–1653.

Donelly C.W. (2004) Growth and Survival of Microbial Pathogens in Cheese. Cheese: Chemistry, *Physics and Microbiology*; 1: 541-559.

EI-Jakee J, Marouf SA, Ata NS, Abdel-Rahman EH, Abd El-Moez SI, Samy AA, El- Sayed WE. (2013) Rapid Method for Detection of Staphylococcus aureus Enterotoxins in Food. *Global Veterinaria*; 11: 335-341.

Erol İ, İşeri Ö. (2004) Stafilokokal Enterotoksinler *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*; 51: 239-245.

Erol İ. (2007) *Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi*. Pozitif Maatbacılık, Ankara.

Forbes, B.A., Sahm, D.F., Weıssfeld, A.S. (2007) Laboratory Methods and Strategies For Antimicrobial Susceptibility Testing: Bailey and Scott s Diagnostic Microbiology. 12th Ed. USA: Mosby; 187-214.

Foster R. D. (2012) Nutritional Benefits in Cheese. Nova Science Publishers. 269- 289

Franklin, DL. (1998) Staphylococcus aureus infections. *New England Journal of Medicine*; 339:520-3.

Gebremedhin, E.Z., Ararso, A.B., Borana, B.M., Kelbesa, K.A., Tadese, N.D., Marami, L.M., Sarba, E.J. (2022). Isolation and Identification of Staphylococcus aureus from Milk and Milk Products, Associated Factors for Contamination, and Their Antibiogram in Holeta, Central Ethiopia. *Veterinary Medicine International*, 2022, 1-13. doi:10.1155/2022/6544705

Gran, HM., Wetlesen, A., Mutukumira, AN., Rukure, G., Narvhus, CA. (2003) Occurrence ofpathogenicbacteria in raw milk, cultured pasteurized milk and naturally soured milkproduced at smallscaledairies in Zimbabwe. *Food Control*; 14: 539-544.

Gülbandılar, A. (2009) Kütahya Yöresinde Burun Mukozasındaki Staphylococcus aureus Taşıyıcılığının ve Antibiyotik Duyarlılığının Araştırılması. *Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*; 4(18): 1032 – 3055.

Gülbandılar, A., Beyhan, E.D., Kısa, H.İ. (2012) Kütahya İl Sağlık Müdürlüğü Bünyesinde Çalışanlarda Nazal Staphylococcus aureus Taşıyıcılığı ve Metisilin Direncinin Araştırılması. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*; 69(3): 155-162.

Hacıbektaşoğlu, A., Eyigün, C.P., Özsoy, M.F. (1993) Gıda Elleyicileri’nde Burun ve Boğaz Portörlüğü*. Mikrobiyoloji Bülteni*; 27: 62-70.

Hanaa, F., Salama Amal, A., El-Asuoty, M.S. (2021) The Effect of Haccp System on Various Microbiological Hazards in Cheese Factories. *Assiut Veterinary Medical Journal*.; 67(171): 158-161.

Hatzenbuehler, J., Pulling, T. J. (2011) Diagnosis and Management of Osteomyelitis. Am. Fam. Physician;84:1027-33.

Ilga, A., Ak, S., Özgür, Y., İkiz, S. (2012) Veteriner Hekimlik Mikrobiyolojisi, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul,; 35-42.

Iwatsukı, K., Yamasakı, O., Morızane, S., Oono, T. (2006) Staphylococcal Cutaneous Infections: Invasion, Evasion and Aggression*. Journal of Dermatological Science*; 42: 203-214.

İnal, T. (1990) Süt ve Süt Ürünleri Hijyen ve Teknolojisi. İstanbul Final ofset A.Ş.; 34-59

[Kamil Bostan,](https://search.trdizin.gov.tr/yazar/detay/697961/kamil-bostan) Ömer Çetin , [Serkan Kemal Büyükünal,](https://search.trdizin.gov.tr/yazar/detay/204734/serkan-kemal-buyukunal) Özer [Ergün.](https://search.trdizin.gov.tr/yazar/detay/513562/edgun-ozer) [(](https://search.trdizin.gov.tr/kurum/detay/Mzc4NjE1/-/istanbul-universitesi)2006)

Karabiyikli Ş., Erdoğmuş S. (2019) Peynir Üretiminde Mikroorganizmaların Rolü Ve Önemli Mikroorganizma Grupları. *Journal of New Results in Engineering and Natural Science*;1:35-45.

Kaya H.Ç, Onmaz N. E., Gönülalan Z., Al S. (2015) Kayseri İlinde Tüketime Sunulan Tavuk Etlerinde Staphylococcus aureus ve Enterotoksin Varlığının Araştırılması, *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Derg*isi; 12(2) 93-98.

Kılıç, A. (2008) Metisiline Dirençli Staphylococcus aureus un Moleküler Epidemiyolojisi. 5. Ulusal Moleküler ve Tansal Mikrobiyoloji Kongresi. 24, Ankara. Kongre Kitabı PNL6; 85-90.

Kindstedt P. (2012) Cheese and culture: A History of Cheese and its Place in Western Civilization, Vermont, Chelsea Green Publishing.

Koçak Kızanlık, P. (2019) *Çeşitli kaynaklardan izole edilen staphylococcus aureus'un bazı virulens özelliklerinin belirlenmesi*. Doktora tezi, Aydın Adnan MenderesÜniversitesi, Aydın.

Koneman, EW., Allen, SD., Janda, WM., Schreckenberger, PC., Winn, WC. (1997 )Gram-positive cocci: Part–1: Staphylococci and related organisms. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Fifth Edition. New York: The Lippincott; p. 539–76.

Kong, C., Neoh, H.-M., Nathan,S. (2016) Targeting Staphylococcus aureus toxins: a potential form of anti-virulence therapy. Toxins; vol. 8, no. 3, p. E72,

Kutlu, S.B. (2006) *Çeşitli klinik materyallerden izole edilen Staphylococcus aureus suşlarında metisilin direnci ve e-test ile vankomisin mic değerlerinin araştırılması.* Uzmanlık Tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi.

Kümmel, J., Stessl, B., Gonano, M., Walcher, G., Bereuter, O., Fricker, M., Grunert, T., Wagner, M., Ehling-Schulz, M. (2016) Staphylococcus aureus Entrance into the Dairy Chain: Tracking S. aureus from Dairy Cow to Cheese. Frontiers in Microbiology; 7, 1603.

Le Loir, Y., and J.-A. Hennekinne. (2014). Staphylococcus. Detection of staphylococcal enterotoxins. , Encyclopedia of Food Microbiology. 2nd ed. Elsevier.

Lew, D.P., Waldvogel, F. A. (2004) Osteomyelitis.Lancet; 364, 369–379. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16727-5

Loir, LY., Baron, F., Gautier, M., (2003) Staphylococcus aureus and food poisoning. Genetics and Molecular Research.;2(1):63-76.

Mikrobiyoloji.org (2021) *Staphylococcus* Hakkında Genel Bilgiler , http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFFAAF6AA849816B2EF5F0C38A962B939A9

Moreillon P., Que, Y.,Glauser, MP. (2005) Staphylococcus aureus (IncludingStaphylococcal Toxic Shock). Mandell, Douglas and Bennett’s Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th Ed.; Volume 2, Elsevier Inc p. 2321-2352.

Muray, PR., Rosentha,l KS., Pfaller, PA. (2005) Medical Microbiology; 4th ed. Philadelphia, Elsevier;203-12;221-36.

Muthukrishnan, G., Masters, E. A., Daiss, J. L., Schwarz, E. M. (2019) Mechanisms of Immune Evasion and Bone Tissue Colonization That Make Staphylococcus aureus the Primary Pathogen in Osteomyelitis. Curr. Osteoporos. Rep.; 17, 395–404. doi: 10.1007/s11914-019-00548-4

Normanno, G., Fırunı, A., Vırgılıo, S., Mula, G., Dambrosıo, A.,Poggıu, A., Decastelli, L., Miorn, R., Scuota, S., Bolzoni, G., Dıgıannatale, E., Salinetti, A.P., La Salandra, G., Bartoli, M.,Zuccon, F., Prgno, T., Sias, S., Parısı, A., Quaclia, N.C., Celano ,G.V. (2005) Coagulase positive Staphylococci and Staphylococcus aureus in foodproducts marketed in Italy. *International Journal of Food Microbiology*; 98: 73-79.

Novick, R.P. (2000) Pathogenicity factors and their regulation. Gram- positive pathogens. ASM Press, Washington, DC; 392-407

Novick, RP. (2003) Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence.+Mol Microbiol.; 48:1429–1449 <http://dx.doi.org/> 10.1046 / j.1365-2958.2003.03526.x.

O'Brien N.M., O'Connor T.P., (2004) Nutritional Aspects of Cheese, Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology; 3 (1).

Oğuz Ş., Andiç Ş. (2019) Peynir Üretiminde Kullanilan Starter Kültürler, GIDA; 44 (6): 1174-1196.

Ören, M.M., Evciman, A., Duman, A., Önal, A.E., Özyıldırım, B., Öngen, B., Boral, Ö. (2014) Bir Tıp Fakültesi Hastanesinde Gıda Çalışanlarının Periyodik Sağlık Taramalarının Değerlendirilmesi. *İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi;* 77(4).

Özer, E., Ünal, G., Kesenkaş, H., Akalın, A.S. (2017) Somatik Hücreler ve Endojen Enzimlerinin Süt Teknolojisindeki Önemi. GIDA; 42 (6): 763-772.

Özkan, S., Aycan, S., Sultan, N., Maral, I. (1999) Gölbaşı’nda Gıda Sektöründe Çalışanların Periyodik Esnaf Muayenelerinin ve Burun – Boğaz Taşıyıcılıklarının Değerlendirilmesi. Türk. Hij. Den. Biol. Derg; 56(1): 13 – 17.

Parente E., Cogan T.M. (2004) Starter Cultures: General Aspects, Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology; 3 (1): 123-147.

Peacock, S. (2006) Staphylococcus aureus. In: Principles and Practice of Clinical Bacteriology. Ltd., England,; pp. 73-98.

Pumipuntu, N., Kulpeanprasit, S., Santajit, S., Tunyong, W., Kong-ngoen, T., Hinthong, W., Indrawattana, N. (2017) Screening method for Staphylococcus aureus identification in subclinical bovine mastitis from dairy farms, *Veterinary World,* 2017; 10(7):721-726. doi: 10.14202/vetworld.2017.721-726

Sağlam D, Şeker E. (2016) Gıda Kaynaklı Bakteriyel Patojenler. *Kocatepe Veterinary Journal*; 9(2): 105-113.

Samanta, I., Bandyopadhyay, S. (2020) Staphylococcus, In: Antimicrobial Resistance in Agriculture Perspective, Policy and Mitigation. Samanta, I.Bandyopadhyay, S. (eds), Academic Press,; 195-215, United Kingdom.

Seo K.S., Bohach G.A. (2010) Staphylococcal Food Poisining, Pathogens and Toxins in Foods: Challenges and Interventions, Edited by: Juneja, Vijay K., Sofos, John Nikolao; 119-130

Singh, D., Kumar A., Singh, A. (2018) Haccp in Clean Food Productıon: An Overview. *International Journal of Research* – Granthaalayah,; 6(12): 128-130.

Sulieman, A.M.E., Ali, R.A.M., Razig, K.A.A. (2012) Production and Effect of Storage in the Chemical Composition of Mozzarella Cheese*. International Journal of Food Science and Nutrition Engineering*,; 2(3), 21-26.

Taşcı Fulya, Fatma Sahin Dokuyucu and Dilek , (2011) Ozturk Detection of Staphylococcus species and staphylococcal enterotoxins by ELISA in ice cream and cheese consumed in Burdur Province*. African Journal of Agricultural Research* Vol. 6(4), pp. 937-942,

Tekinşen,K.K.,Uçar,G. (2007) Konya Yöresinde Üretilen Mahalli Tulum Peynirleri. Akademik Gıda,; 4(6), 33-37.

Todar, K. (2012) Staphylococcus aureus and Staphylococcal Disease. In: Todar K, editor. Todar's Onine Textbook of Bacteriology. Madison, Wisconsin,.

Türk Gıda Kodeksi (2011) Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği Tarım ve Köyişleri Bakanlığı 29/12/2011 tarihli ve 28157 sayılı (3.Mükerrer) Resmi Gazete, Ankara

Tütüncü, D. (2005) *Akne Vulgaris Tedavisinin Burun Mukozası Stafilokok Kolonizasyonu Üzerine Etkileri*. T.C. Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim Ve Araştırna Hastanesi, Deri Ve Zührevi Hastalıklar Kliniği, İstanbul, , 48s. (Uzmanlık Tezi).

Ünlütürk, A., Turantaş, F. , (1999) Gıda güvenligi, mikrobiyolojik kriterler ve hızlı mikrobiyolojik yöntemler. In: Gıda Mikrobiyolojisi. İzmir Mengi Tan Basımevi.

Vernozy-Rozand, C., Mazuy-Cruchaudet, C., Bavai, C., & Richard, Y. (2004). Comparison of three immunological methods for detecting staphylococcal enterotoxins from food. Letters in Applied Microbiology, 39, 490–494.

Walther B., Schmid A., Sieber R., Wehrmuller K. (2008) Cheese in Nutrition and Health, *Daily Journal*; 88(4): 389–405.

Walther,C., Perreten,V. (2007) Letter to the Editor:Methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis in organic milk production*. Journal of Dairy Science*,; 90(12):5351

Wattinger, L., Stephan, RF., Layer, F. S. (2012) Comparison of Staphylococcus aureus isolates associated with food intoxication with isolates from human nasal carriers and human infections, *Europe Journal of Clinical Microbiological Infecttious Diseases*,; 31: 455–64.

Yerlikaya, O. (2018) Ege ve Marmara Bölgesi’nde Üretilen ve Tüketime Sunulan Beyaz Peynirlerin Bazı Mikrobiyolojik Özelliklerinin İncelenmesi Üzerine bir Araştırma. *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg*; 55 (4):499-505.

Yılmaz, M. (2019) *Sığır mastitislerinden izole edilen Staphylococcus aureus suşlarında metisilin, vankomisin direnci ve panton-valentine lökosidin varlığının araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar,.

Yücel N., Anıl Y. (2011) Çiğ Süt ve Peynir Örneklerinden Staphylococcus aureus ve Koagülaz Negatif Stafilokokların İdentifikasyonu ve Antibiyotik Duyarlılığı, *Turk Hijyen Derneği Biyoloji Dergisi*:; 68 (2): 73 – 78.

**T.C.**

**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİLİMSEL ETİK BEYANI**

‘‘Tulum Peynirlerinden İzole Edilen Staphylococcus Aureus İzolatlarında Klasik Stafilokokal Enterotoksin Üretme Yeteneklerinin ELISA Yöntemiyle Belirlenmesi’’ başlıklı yüksek tezimdeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Ebru CAN

23 / 07 / 2022

# ÖZ GEÇMİŞ

Soyadı, Adı : CAN, Ebru

Doğum Yeri ve Tarihi : Diyarbakır , 10.03.1995

Yabancı Dil : İngilizce

Telefon : 05345461966

E-mail : ebruucn11@gmail.com

**EĞİTİM**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Derece** | **Kurum** | **Mezuniyet Tarihi** |
| Lisans | Aydın Adnan Menderes Üniversitesi | 2018 |
| Yüksek Lisans | Aydın Adnan Menderes Üniversitesi | 2022 |