



**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI
VBH-YL-2015-0005**

**ÇİĞ SÜTLERDE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* VE
STAFİLOKOKAL ENTEROTOKSİN VARLIĞININ
BELİRLENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Gülçin DUYUK

**DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Devrim BEYAZ**

AYDIN-2015

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI
VBH-YL-2015-0005**

**ÇİĞ SÜTLERDE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* VE
STAFİLOKOKAL ENTEROTOKSİN VARLIĞININ
BELİRLENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Gülçin DUYUK

**DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Devrim BEYAZ**

AYDIN-2015

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Gülçin DUYUK tarafından hazırlanan “**Çiğ Sütlerde *Staphylococcus aureus* ve stafilokokal enterotoksin varlığının belirlenmesi**” başlıklı tez, 04 / 09 / 2015 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı ve Soyadı:

1. Prof. Dr. Ergün Ö. GÖKSOY
2. Prof. Dr. Ali AYDIN
3. Yrd. Doç. Dr. Devrim BEYAZ

Üniversitesi:

- Adnan Menderes Üniversitesi
- İstanbul Üniversitesi
- Adnan Menderes Üniversitesi

İmzası:



Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulununsayılı kararıyla / /tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Hayvansal protein ihtiyacının karşılanmasında temel gıda maddelerinden biri olan süt, insanların sağlıklı beslenmesinde vazgeçilmez bir öneme sahiptir. Süt özellikle kalsiyum, fosfor, riboflavin, vitamin B₁₂ ve yüksek kaliteli protein kaynağıdır. Süt zengin bir besin kaynağı olmasının yanında çeşitli mikroorganizmaların kolayca bulaşabileceği ve hızla üreyip çoğalabileceği çok uygun bir yapıya sahiptir. Sütü kontamine eden en önemli mikroorganizmalardan birisi de *Staphylococcus aureus*'tur.

S. aureus patojen bir bakteri olmasına karşın sağlıklı insanların burun mukozası ve deri florasında bulunur. Gıdaların stafilokoklarla kontamine olmasında en büyük rolü insanlar oynamasına karşın, başta mastitisli hayvanlardan sağlanan sütler olmak üzere kontamine hayvansal gıdalar büyük önem taşımaktadır.

S. aureus, birçok ülkede önemli gıda zehirlenmelerine neden olan bir patojendir. Gıdalara uygulanan ısı işlemine bağlı olarak inaktive olmasına rağmen, özellikle sindirim sistemi üzerine etkili ve ısıya dirençli toksinlerin alimenter yollarla alınması sonucu stafilokokal intoksikasyonlara neden olmaktadır. Bu intoksikasyonlar, hem halk sağlığı sorunlarını hem de ekonomik açıdan önemli kayıpları meydana getirmektedir.

Bu çalışmada Muğla ilinden toplanan sütlerin *S. aureus* ve enterotoksinler bakımından durumunun belirlenmesi ve bulunan miktarlarının ülkemizde yürürlükte olan mevzuatta belirtilen değerlerle karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri tarafından VTF 14018 kodlu proje olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
1.GİRİŞ.....	1
1.1.Süt.....	3
1.1.1.Sütün Üretimi ve Beslenmedeki Önemi	3
1.1.2.Sütün Bileşimi ve Özellikleri	5
1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	8
1.2.1. <i>S. aureus</i> 'un Genel Özellikleri	8
1.2.2. <i>S. aureus</i> 'un Virulans Faktörleri	10
1.2.2.1.Kapsül.....	11
1.2.2.2.Hücre Duvar Yapıları	11
1.2.2.3.Yüzey Proteinleri.....	12
1.2.2.4.Enzimler.	12
1.2.2.5.Slaym Faktörü (Slime Faktör)	13
1.2.2.6.Toksinler.....	14
1.2.2.6.1.Sitolitik Toksinler (Hemolizinler)	14
1.2.2.6.2.Panton-Valentine Lökosidin (PVL).....	15
1.2.2.6.3.Süperantijenler (SAGs)	15
1.2.2.6.3.1.Eksfoliyatif Toksin	16
1.2.2.6.3.2.Toksik Şok Sendromu Toksini-1 (TSST-1)	16
1.2.3. <i>S.aureus</i> 'un Gıdalarda Bulunuşu ve Kontaminasyon Kaynakları	17
1.3.Stafilokokal Enterotoksinler	18

1.3.1. Enterotoksinlerin Biyolojik Etkinliği ve Toksisitesi	20
1.3.2. Enteroroksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler	21
1.3.2.1. Ekstrasellüler Faktörler	21
1.3.2.2. İntrasellüler Faktörler	23
1.3.3. Stafilokokal Enterotoksinlerin Dizi Analizleri	24
1.3.4. Stafilokokal Enterotoksinlerin Teşhisi	26
1.4. <i>S.aureus</i> ve Toksinlerinin Neden Olduğu Gıda Zehirlenmeleri	27
2. GEREÇ VE YÖNTEM	32
2.1. Gereç	32
2.2. Yöntem	32
2.2.1. Çiğ Süt Örneklerinde <i>S.aureus</i> İzolasyonu	32
2.2.1.1. Gram Boyama	32
2.2.1.2. DNaz Testi.	33
2.2.1.3. Katalaz Testi	33
2.2.1.4. Mannitol Fermentasyonu	33
2.2.1.5. Tüp Koagülaz Testi.	33
2.2.1.6. Dry Spot Staphylect Plus Testi	34
2.2.2. ELISA Tekniği ile Toksin Üretiminin Tespiti	34
3. BULGULAR	36
4. TARTIşMA	38
5. SONUÇ	42
ÖZET	43
SUMMARY	44
KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİş	55
TEşEKKÜR	56

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
agr	: Accesorry gene regülatör
a_w	: Su aktivitesi
CF	: Clumping Factor
CRF	: Coagulase-Reacting Factor
EFSA	: European Food Safety Authority
E_h	: Redoks potansiyeli
EIA	: Enzyme Immuno Assay
ELISA	: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
kb	: Kilo baz
kDA	: Kilo Dalton
kob	: Koloni oluşturan birim
log	: Logaritma
μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
ng	: Nanogram
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	: Potansiyel Hidrojen
PVL	: Panton-Valentine Lökosidin

- RIA : Radio Immuno Assay
- RPLA : Reverse Passive Latex Agglutination
- SAGs : Süperantijenler
- Sar : Staphylococcal accesory gen regulator
- SE : Stafilokokal Enterotoksin
- SEI : Stafilokokal Enterotoksin Benzeri
- SPE : Streptokokal Pirojenik Ekzotoksinler
- SSA : Streptokokal Süperantijen A
- SSSS : Staphylococcal Scalded Skin Syndrome
- TGK : Türk Gıda Kodeksi
- TNase : Termonükleaz
- TSST : Toksik Şok Sendrom Toksin
- WHO : Dünya Sağlık Örgütü

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 1.1. <i>S.aureus</i> 'un üreme ve toksin oluşturması için genel koşullar	23
Çizelge 1.2. Stafilokokal enterotoksinlerin saptanmasında kullanılan test kitleri	26
Çizelge 1.3. Dünyada SE dağılımı	30
Çizelge 1.4. 2011 yılında Avrupa'daki stafilokokal gıda zehirlenmesi kaynaklı salgınlar	31
Çizelge 3.1. İncelenen çiğ süt örneklerinde <i>S.aureus</i> sayısı	36
Çizelge 3.2. İncelenen çiğ süt örneklerinde stafilokokal enterotoksin analizi sonuçları	37

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. İnek sütünün bileşimi	6
Şekil 1.2. <i>S.aureus</i> 'un mikroskopik ve kanlı agarda görünümü	10
Şekil 2.1. Ridascreen test kitinde bir mikrotiter strip düzeneği	34

1. GİRİŞ

İnsanın tüm yaşamında önemli yeri olan süt, yeterli ve dengeli beslenme için gerekli olan hayvansal kaynaklı protein, yağ, laktoz ile vitamin ve mineral maddeleri tam ve yeterli oranda içerir. Süt beslenme değerinin yüksekliği yanında, vücut fonksiyonlarını düzenleyen, gelişmesini sağlayan, kemik ve diş oluşumunda önemli yeri olan temel bir gıda maddesidir (İnal 1990).

Türk Gıda Kodeksi (TGK), 2000/6 Tebliğ Numaralı, Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği'ne göre çiğ süt "bir veya daha fazla inek, keçi, koyun veya mandanın sağılmasıyla elde edilen, 40 °C 'nin üzerine ısıtılmamış veya eşdeğer etkiye sahip herhangi işlem görmemiş kolostrum dışındaki meme bezi salgısıdır" olarak tanımlanmıştır (Anonim 2000).

Süt nötral pH'sı, içerdiği laktoz, sitrik asit, süt yağı, azot kaynağı, mineral maddeler ve yüksek su içeriği nedeni ile birçok mikroorganizmanın gelişmesi için mükemmel bir besi ortamı oluşturur. Çiğ süte, çevreden genellikle hava, toz, toprak, su ve gübre kaynaklı mikroorganizmalar bulaşabilmektedir (Gran ve ark 2003, Ünlütürk ve Turantaş 1999). Bulaşan mikroorganizmalar mikrobiyal gelişmeyi önleyici muhafaza yöntemleri uygulanmadığı takdirde hızla gelişerek bozulmaya neden olmaktadır (Ünlütürk ve Turantaş 1999). Sütü kontamine eden en önemli mikroorganizmalardan birisi de *Staphylococcus aureus*'tur. Etken çevreden bulaşabileceği gibi mastitisli hayvanlardan sağılmış sütlerden de bulaşabilmektedir (Arda ve ark 1982, Valsangiacomo ve ark 2000).

Stafilokoklar insan ve hayvanlarda birçok enfeksiyonun ve insanlarda oluşabilen stafilokokal intoksikasyonların etkenidir. Stafilokokal enfeksiyonlar, koagulaz pozitif ve koagulaz negatif stafilokoklar tarafından oluşturulabilmektedir. Bununla beraber stafilokokal gıda intoksikasyonunun predominant etkeni *S. aureus*'tur (Oliver ve ark 2005, Kılıç 2007).

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*'un gıdaya bulaşmasındaki en önemli etkenin insan olduğu saptanmıştır (Tükel ve Doğan 2000). Çünkü sağlıklı insanların yaklaşık %30-40'ının burun mukozasında *S. aureus* bakterisinin olduğu

belirlenmiştir (Küplülü ve ark 2002). Bunun yanı sıra birçok evcil hayvanında *S. aureus* kaynağı olduğu bildirilmektedir. Daha çok sıcakkanlı hayvanların burun deliklerinde, derilerinde ve tüylerinde bulunan bu mikroorganizma aynı zamanda önemli bir mastitis etkenidir (Le Loir ve ark 2003). Özellikle subklinik mastitisli ineklerden elde edilen sütlerin, sağlıklı ineklerden elde edilen sütlere karışmış olması, süt ve su ürünleri için en önemli kontaminasyon kaynağıdır (Küplülü ve ark 2002). Bu bakterinin oldukça geniş sıcaklık, pH ve sodyum klorür aralığında gelişebilmesi birçok gıda maddesinde canlı kalmasını kolaylaştırmaktadır (Le Loir ve ark 2003).

Günümüzde barsak rahatsızlıklarına neden olan bakterilerden bazılarının enfeksiyon yolu ile mi, yoksa intoksikasyon şeklinde mi etkili oldukları üzerine tartışmalar halen sürmektedir. Ancak gıdalar üzerinde uygun koşullar yakaladıklarında çoğalan, toksin üreten ve ürettikleri toksinlerin gıda yolu ile vücuda girerek intoksikasyona neden olduğu kesin bilinen iki bakteri türü vardır. Bunlardan biri *Clostridium botulinum*, diğeri ise *S. aureus*'tur (Tunail 2000).

Stafilokokal gıda zehirlenmeleri enterotoksijenik özelliğe sahip stafilokokların gıdalarda 10^6 kob/g veya daha yüksek sayıya ulaşması sırasında sentezlenen bir ekzotoksin olan enterotoksinin alimenter yol ile alımı sonucu oluşmaktadır (Erol ve İşeri 2004).

S. aureus, tarafından oluşturulan besin zehirlenmeleri daha çok kontamine mandıra ürünlerinin tüketimine bağlı olarak şekillenmektedir (Soejima ve ark 2004).

S. aureus 'un besin kaynaklı hastalıkların oluşumunda yaygınlık bakımından *Salmonella* ve *Campylobacter* gıda zehirlenmelerinden sonra üçüncü önemli toplum sağlığı sorunu olduğu düşünülmektedir (Rosec ve ark 1997, Normanno ve ark 2005).

Bu çalışma Muğla ilinden toplanan sütlerin *S. aureus* ve enterotoksinler bakımından durumunun belirlenmesi ve bulunan miktarlarının ülkemizde yürürlükte olan mevzuatta belirtilen değerlerle karşılaştırılması amacıyla gerçekleştirilmiştir.

1.1 Süt

1.1.1. Sütün Üretimi ve Beslenmedeki Önemi

Süt ve mamulleri, dengeli beslenmede önemli yeri olan gıda maddelerimizdendir. Bir gıdanın besin değeri, vücudun normal fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için gereksinim duyduğu besin öğeleri içeriği ile ölçülmektedir. Süt, bileşiminde 85 dolayında farklı besin öğesi bulundurmaktadır. Doğanın yavruya ilk armağanı olan süt, canlının istek ve gereksinimlerini karşılayabilecek bütün besin maddelerini; yani tam değerli proteinleri, lipidleri, şekerleri, mineral maddeleri, vitaminleri ve yaşam için gerekli birçok besin elementini yeterli ve dengeli biçimde içeren tek gıdadır. Süt, aynı zamanda beslenme değerinin yüksekliği yanında vücut fonksiyonlarını düzenleyen, gelişmesini sağlayan, kemik ve diş oluşumunda önemli rolü olan temel bir gıda maddesidir (Üçüncü 2005).

Süt teknolojisinde ise çiğ süt denildiği zaman, hayvanının memesinden muntazam aralıklarla ve tam olarak sağılan, sonra soğutulan, içerisinden herhangi bir bileşeni alınmayan veya içerisine herhangi bir madde ilave edilmeyen, işlenmek üzere süt fabrikalarına kabul edilen ve önceden herhangi bir işlem uygulanmamış anlaşılmaktadır (Kalkan ve Halkman 2006).

Tüketilen süt çeşidi toplumların kültürlerine göre değişiklik göstermektedir. Ancak ülkemizde süt denildiğinde akla ilk olarak inek sütü gelmesine karşın tüketilmekte olan sütler inek, koyun, keçi ve manda sütü olmak üzere 4 çeşittir (Besler ve Ünal 2006). Dünyada üretilen sütün % 83.09'unun inek, % 12.79'unun manda, % 1.40'inin koyun, % 2.40'inin keçi ve % 1.38'inin deve sütü olduğu hesaplanmıştır. Türkiye'de üretilen sütün % 91.73'ü inek sütü, % 0.26'sı manda sütü, % 6'sı koyun sütü ve % 2.01'i keçi sütüdür (Örmeci Kart ve Demircan 2014).

Süt, bileşimindeki maddeler yönünden insanlar için çok yararlı olduğu kadar mikroorganizmaların faaliyeti bakımından da çok iyi bir gelişme ortamıdır. Bu nedenle çiğ sütlere havadan, yemden, ahırdan, su gibi benzeri ortamlardan ve depolanması sırasında bulaşan çeşitli mikroorganizmalar hızlı bir şekilde çoğalmakta ve sütün çeşitli niteliklerinde istenmeyen değişikliklere sebep olmaktadır (Köşker ve Tunail 1985). Bundan dolayı süt, sağımın hemen ardından derhal soğutularak, çok hızlı bir şekilde işleneceği yerlere nakledilmeli ve süt işletmelerinde ya içme sütüne ya da diğer süt ürünlerine işlenmelidir.

Çünkü süttten elverişli bir şekilde yararlanmak, ancak süttün özellikle "içme süttü", diğere bir deyişle pastörize sütt veya steril sütt olarak, ya da hijyenik koşullarda, tekniğıne uygun olarak sütt ürünlerine işlenerek tüketilmesi ile mümkündür (Tekinşen 1996).

İnsan yaşamının her evresinde gerekli olan sütt, C vitamini ve demir dışında makro ve mikro besin öğeleri için iyi bir kaynaktır. Özellikle çocukluk, gebelik-emzicilik ve yaşlılık dönemlerinde kemik sağılığı açısından çok önemlidir. Sütt ve sütt ürünlerine özellikle kalsiyum ve fosfor başta olmak üzere bazı önemli mineraller, protein ve riboflavin gibi bazı B grubu vitaminlerin kaynağı olarak bakıldığında halk sağılığı açısından önemli bir besin grubu olduğı anlaşılmaktadır. Sütt proteinlerinin vücutta bilinen büyüme ve gelişmeye katkısı ile doku farklılaşmalarındaki etkinliğinin yanı sıra; kalsiyum emilimi ve immün fonksiyonlar üzerine olumlu etkilerinin olduğı, kan basıncını ve kanser riskini azalttığı, vücut ağırlığının kontrolünde etkin olduğı, diş çürüklerine karşı koruyucu olduğı bilinmektedir (Miller ve ark 2000, Black ve ark 2002).

Bileşimindeki maddeler ve özellikleri nedeniyle sütt sadece temel besin maddesi olarak değil, aynı zamanda koruyucu (antikor) bir gıda olarak da kabul edilmektedir. Özellikle sütt proteini, mineral maddeler ve vitaminler sütte bu özelliğı kazandırır. Çünkü sütt proteini, amfoter özelliğı sonucu tamponlayıcı ve zehirli ağır gazları ve diğere sağılığa zararlı maddeleri bağlama özelliğı gösterir. Bu nedenle zehirlenmelere karşı korunmak üzere panzehir (antidot) olarak sürekli sütt, yoğurt verilir. Sütteki vitaminler ve özellikle kalsiyum ve fosfor gibi mineraller ise, bazı hastalıkların oluşumunu önlemektedir. Sonuç olarak sütt sadece besleyici bir gıda değil, aynı zamanda organizmayı zehirli maddelerden ve hastalıklardan koruyucu bir gıdadır (Maijala 2000, Üçüncü 2008).

Günlük olarak tüketilmesi önerilen ortalama sütt miktarı bebekler için 700 g, çocuklar için 400 g, gençler için 350 g, yetişkinler için 250 g, hamile ve bebek emziren kadınlar için 500 g ve yaşlılar için 350 g olarak tavsiye edilmektedir (Ayar ve Demirulus 2000).

Türkiye'nin sütt üretim miktarı 1990-94 yılları ortalamasında 10.22 milyon ton; 1995-99 yılları ortalamasında 10.29 milyon ton; 2000-04 yılları ortalamasında 9.79 milyon ton; 2005-09 yılları ortalamasında 12.03 milyon ton ve 2010 yılında ise 13.60 milyon tondur. Türkiye'nin sütt üretim miktarı son 20 yılda genel olarak artış eğilimi göstermektedir. Hayvan varlığında görülen azalışa rağmen üretim miktarında meydana gelen artış hayvanların verim artışlarından kaynaklandığı söylenebilir. Verim artışının sağılanmasında yerli hayvan yerine

kültür ırkı hayvanların kullanılmaya başlanması ve teknolojik gelişmelerin üreticiler tarafından uygulanması etkili olmuştur. Dünyanın süt üretim miktarı 1990-94 yılları ortalamasına göre yaklaşık 532,63 milyon tondur. Bu rakam 2010 yılında % 35.77'lik artışla 723,14 milyon tona yükselmiştir. Türkiye'nin süt üretiminin dünya içerisindeki payı 2010 yılında % 1.88 olarak bulunmuştur (Örmeci Kart ve Demircan 2014).

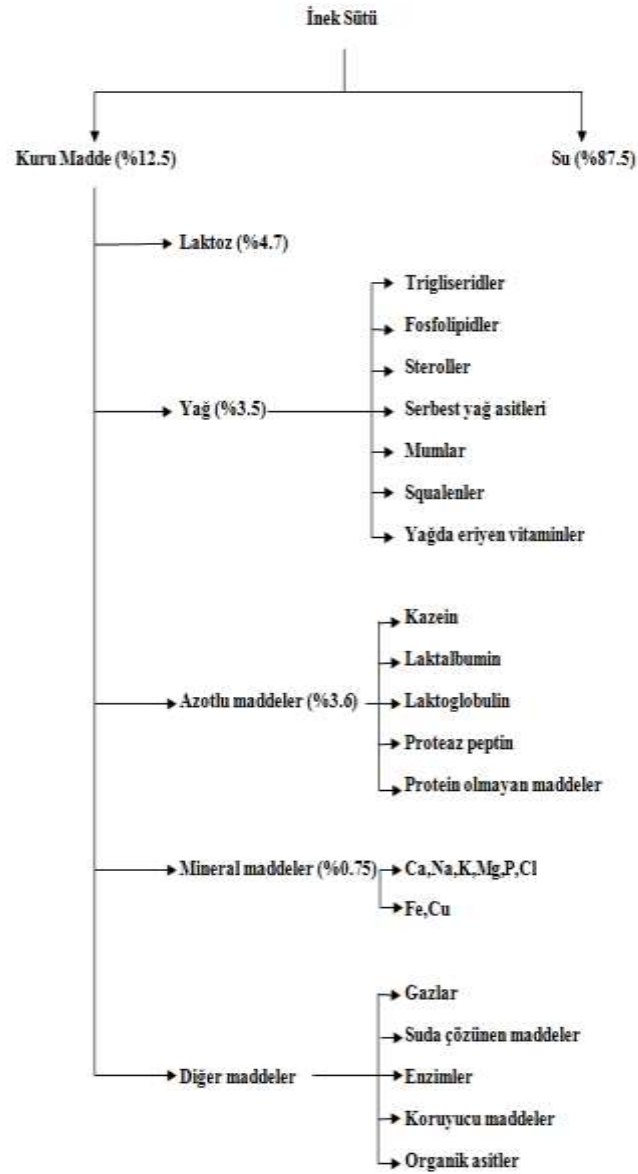
Dünya kişi başı yıllık süt tüketiminin ortalaması incelendiğinde 1990-94 döneminde 75.52 kg, 1995-99 döneminde 77.56 kg, 2000-04 döneminde 79.84 kg, 2005-08 döneminde 85.25 kg ve 2009 yılında 87.30 kg olarak bulunmuştur. Dünya nüfusunun yaklaşık 7,1 milyar olduğu 2012 yılında, kişi başına ortalama süt tüketimi 109,1 kg süt eşdeğeridir. Türkiye'nin ise yıllar itibariyle kişi başı süt tüketim miktarları incelendiğinde 1990-94 döneminde 148,18 kg olan süt tüketiminin, 2009 yılında 143 kg'a düştüğü görülmektedir. Türkiye'nin en düşük süt tüketimi 2000-04 döneminde kişi başı yıllık 122,30 kg ile gerçekleşmiştir (Örmeci Kart ve Demircan 2014, Süt konseyi 2013).

Süt tüketiminde, tüketilen süt miktarı kadar önemli bir diğer faktörde, tüketilen sütün niteliğidir. Çünkü sütün bileşiminde insanlar için faydalı besin maddelerinin bulunması yanında, ayrıca insanlara zararlı mikroorganizmalarında gelişeceği bir ortam söz konusudur. Bu nedenle süt üretildikten sonra ya içme sütüne ya da süt ürünlerine işlenerek tüketicilere arz edilmesi gerekmektedir. Türkiye'de üretilen sütün % 40'ı herhangi bir işleme tabi tutulmadan çiğ süt olarak tüketiciye ulaşırken, % 50'si mandıralarda, % 10'u ise modern işletmelerde işlenmektedir. Gelişmiş ülkelerde ise üretilen sütün % 0,5-0,6'sı işlem görmeden tüketiciye ulaşırken, % 99,5'i modern işletmelerde işlenmektedir (Gönç ve ark 1993, Tan ve Ertürk 2002).

1.1.2. Sütün Bileşimi ve Özellikleri

Meme dokusunda sentezlenen laktoz, sütün temel karbonhidratıdır. Doğada yüksek oranda, yalnız sütte bulunur. Bu yüzden laktoz süt şekeri olarak da adlandırılmaktadır. Katkısız inek sütü ortalama % 4,7 laktoz içermektedir. Sütü meydana getiren su dışındaki bileşenlerin arasında miktar olarak en fazlası, yani % 37,3'ü süt şekeri'dir. Diğer bir ifade ile yağ dışında kalan kurumaddenin % 54'ünü laktoz oluşturmaktadır. Laktozun miktarı sütün donma ve kaynama noktalarını, özgül ağırlığını ve ozmotik basıncını etkilemektedir. Normal

koşullarda, doğal olarak laktozun miktarı çok az değiştiğinden, sütün donma ve kaynama noktaları sabittir. Laktoz gerek sütün ve gerekse süt ürünlerinin aromasında, yapısında ve niteliğinde geniş ölçüde etkisi olan bir maddedir. Laktoz taze süte tatlımsı bir aroma verir. Bunlara ilaveten beslenme fizyolojisi açısından da önemli bir süt bileşenidir. Kalsiyum emilimini düzenler, yağ metabolizmasında etkilidir ve geliştirdiği asitlikle bağırsak mikroflorasını olumlu yönde dengeler yani patojenlerin inhibisyonuna, yararlı mikroorganizmaların sayısının artmasına neden olur. Laktozun bileşiminde yer alan galaktoz beyin dokusundaki glikolipitlerin kaynağını teşkil ettiğinden beyin gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Walters ve Jenness 1984, Metin 2001).



Şekil 1.1. İnek sütünün bileşimi (Üçüncü 2005).

Sütün yapısına giren en önemli maddelerden birisi süt yağı veya çoğu kez denildiği gibi süt lipidleridir. Sütte ortalama % 3,2 oranında yer alan süt lipidleri, süt ve ürünlerinin fiziksel niteliklerinde, aromalarında ve besin değerlerinde önemli olan maddelerdir. Süt, diğer hayvansal yağlara göre en düşük kolesterol oranına sahip bir yağdır. Süt yağı, sütün görünüm, tat, lezzet ve dayanıklılığını etkilemektedir. Ayrıca elzem yağ asitleri, yağda eriyen vitaminler ve enerji için kaynak oluşturmaktadır (Yetişmeyen 1997, Üçüncü 2008).

Yüksek kaliteli protein içeren inek sütünün ortalama % 3,0–3,5'i proteindir. İnek sütü proteini; kazein, serum proteinleri temel olmak üzere, enzimler ve az miktarda azot içeren protein olmayan bileşiklerden oluşan heterojen bir karışımdır. Toplam proteinin yaklaşık % 80'i kazein (% 8'i inorganik maddeler, % 92'si proteindir), % 20'si ise serum proteininden oluşmaktadır. Süt proteinleri kolaylıkla sindirilebildiğinden, bütün esansiyel amino asitleri içerdiğinden, biyolojik değeri yüksek ve üstün kaliteli olduğundan beslenme fizyolojisi açısından çok önemlidirler. Bu fizyolojik önemlerinin yanı sıra teknolojik yönden de oldukça öneme sahiptirler. Süt ürünlerinin ana maddesi (örneğin peynir) veya bileşimlerinin (yoğurt, süt tozu vb.) en önemli maddesi durumundadır (Fox ve McWeeney 2003).

İnsan için elzem vitaminlerin neredeyse hepsi sütte bulunmaktadır. A, D, E ve K vitaminleri süt yağı ile ilişkili olarak yer almaktadır. Süt, suda eriyen vitaminleri de içermektedir. Emilimi artıran folat bağlayıcı proteinler ve serum proteini içermesinden dolayı folat açısından iyi bir kaynak kabul edilmektedir (Walstra ve Jenness 1984, Metin 2001, Fox ve McWeeney 2003).

Süt kalsiyum, fosfor, magnezyum, potasyum, çinko gibi mineraller için iyi bir kaynaktır. Ancak demir içeriği ve demir biyoyararlılığı düşük olan süt, çocukluk döneminde demir gereksinimine önemli bir katkı sağlayamamaktadır. Sütün mineral içeriği hayvanın fizyolojik durumu, laktasyon durumu, çevresel faktörler ve genetik faktörler, süte uygulanan bazı işlemler gibi birçok durumdan etkilenmektedir (Yetişmeyen 1997, Miller ve ark 2000, Baysal 2004).

Yeni sağılmış sağlıklı inek sütünün pH değeri 6,6-6,8 arasındadır. Yeni sağılan sütün pH değeri 6,8'in üzerinde ise mastitis hastalığından veya nötralize edici madde ilavesinden, 6,5'ten küçük ise aşırı asitlik gelişimi yani mikrobiyal faaliyetten şüphelenmek gerekmektedir (Tekinşen ve Nizamlıoğlu 2001, Üçüncü 2008).

Sütün yoğunluğu bileşiminde bulunan maddelere bağlı olduğundan değişkenlik göstermektedir. İnek sütünün yoğunluğu 20 °C’de 1,028-1,037 g/ml arasında değişir. Yoğunluğu 0,93 g/ml olan süt yağının miktarı arttıkça sütün yoğunluğu azalmakta, yağ miktarı azaldıkça da artmaktadır. Sütün protein, laktoz ve mineral madde içeriğinin artması ile de yoğunluk artmaktadır (Yetişmeyen 1997).

1.2. *Staphylococcus aureus*

1.2.1. *S. aureus*’un Genel Özellikleri

Alman bilim adamı Recklinghausen 1871 yılında piyemiden ölen hastaların böbreklerinde ilk olarak kokları gözlemlemiştir. Ardından 1880’de Louis Pasteur ve İskoçyalı cerrah Alexander Ogston, insanda piyojenik apselere sebep olan bazı kümelenmiş kokları bildirmişlerdir. Bu konuda çalışmalarını sürdüren Ogston kokları, zincir yapısında olanlar için streptokok ve grup ya da kümeler halinde olanları için de stafilokok diyerek ikiye ayırmıştır. Üremeleri sırasında birbirlerinden ayrılmayarak, üzüm salkımına benzeyen, düzensiz kümeler oluşturduklarından eski Yunanca’da üzüm salkımı anlamına gelen staphyle tabirinden türetilmiştir. *Staphylococcus*, 1884 yılında Rosenbach tarafından Ogston’un verdiği isme uygun olarak, *Micrococcaceae* familyası içerisinde ayrı bir soy olarak tanımlamıştır. Daha sonra stafilokoklar bakteri aleminin *Firmicutes* şubesinde, *Bacilli* sınıfından *Bacillales* takımının *Staphylococcaceae* familyası içerisinde yer alan bir soy olarak tanımlanmıştır (Schleifer ve Bell 2009).

Staphylococcus cinsi içerisinde 35 tür ve 17 alt tür saptanmış, 21 tür insanlarda enfeksiyon etkeni olarak tanımlanmıştır. Normalde insan, diğer memeliler ve kuşların cilt ve müköz membranlarında bulunurlar. İnsanlarda enfeksiyon etkeni olarak en sık izole edilen türler *S. aureus* (en virüent ve en iyi bilinen tür), *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus saprophyticus* ve *Staphylococcus schleiferi*’dir (Bilgehan 2000, Koneman ve ark 2006, Forbes ve ark 2007).

S. aureus, *Staphylococcaceae* familyasında yer alan gram pozitif bakterilerdir. Etken sporsuz, kapsülsüz ve hareketsizdir. Bakteri, sıvı ve katı besiyerlerinde aerobik veya fakültatif anaerobik koşullar altında kolaylıkla üreyebilir. Sıvı besiyerinde homojen bir bulanıklık ve tüpün dibinde zamanla sarılaşılan bir tortu oluşturur. Kanlı agarda hemoliz meydana getirir

(Ünlütürk ve Turantaş 1999, Arda ve ark 1982). *S. aureus*, tuza dayanıklı bir bakteridir ve % 12-15 tuz konsantrasyonuna kadar gelişme gösterebilir (Ünlütürk ve Turantaş 1999).

Stafilokoklar geniş bir sıcaklık aralığında (6,5 °C – 45 °C) üreyebilen bakterilerdir, ancak en uygun üreme sıcaklıkları 30–37 °C'dir. pH 7–7,5 civarında daha iyi ürerler. Stafilokoklar birçok besiyerinde üreyebilir. % 5'lik koyun kanlı agarda, 18-24 saatlik inkübasyonu takiben tipik olarak yuvarlak, düzgün kenarlı, kabarık, mat, 1-4 mm çapında, S (Smooth) tipi koloniler oluştururlar. *S. aureus* kolonilerinin çoğunda sarı pigment ve beta hemoliz görülürken, *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus*'un bazı kökenleri de sarı veya turuncu pigment ve hemoliz oluşturabilir (Bilgehan 2000, Murray ve ark 2005, Erol 2007, Forbes ve ark 2007).

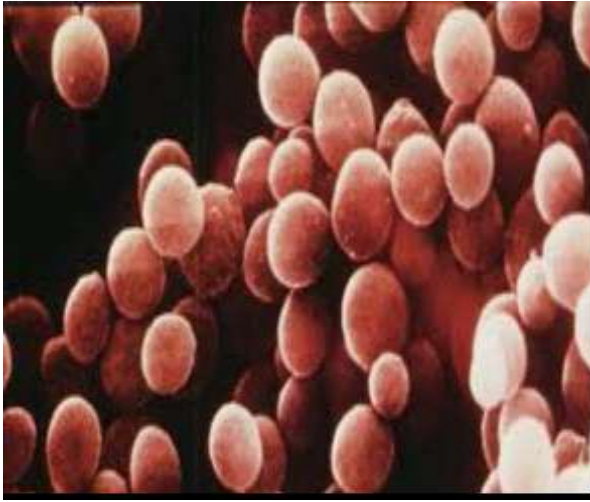
S. aureus, koagulaz, termonükleaz ve hemolizin özelliğine sahiptir. Hemolizin oluşturma özelliği *S. epidermidis* suşların da gözlenebilir. *S. aureus*'un, *S. epidermidis*'ten ayırımında kullanılan önemli bir karakteristik özelliği ise ısıya dirençli nükleaz enzimine (termonükleaz; TNase) sahip olmasıdır. Koagulaz, patojen *S. aureus* suşlarının ayırımında kullanılan önemli bir özellik olmakla birlikte, patojenitede kesin belirleyici faktör değildir. Çünkü koagulaz ve termonükleaz negatif bazı *S. aureus* suşlarında enterotoksin oluşturabilmektedir. *S. aureus* dışında koagulaz pozitif *S. intermedius* ve koagulaz değişken *S. hyicus* türleri de toksin oluşturmaktadır (Erol 2007). Koagulaz üretenler; *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. aureus* subsp. *anaerobius*, *S. delphini* ve *S. schleiferi* subsp. *coagulans*'tır. Gıdalar için önemli olan grup koagulaz pozitif olan ve stafilokokal gıda zehirlenmelerine neden olan enterotoksijenik stafilokokların yer aldığı gruptur (Tunail 2000).

S. aureus lesitinaz pozitif ve telluriti telluriuma indirgeme özelliğine de sahiptir. Tipik *S. aureus* suşları yumurta sarısı ve tellurit içeren katı besiyerinde (Baird-Parker Agar; BPA) üreme sırasında telluriti indirgeyerek gri-siyah parlak koloniler ile lesitinaz aktivitesi sonucu oluşan kolonilerin etrafında şeffaf bir zon oluşturmaktadır. *S. intermedius* ise telluriti indirgeyemediğinden beyaz koloniler oluşturmaktadır (Adams ve Moss 2008).

S. aureus gelişmesi için optimum su aktivitesi değeri >0,99dur. Gelişebildiği su aktivitesi aralığı diğer gıda kaynaklı patojenlere kıyasla oldukça geniştir. Gelişebileceği minimum su aktivitesi değeri genelde 0,86 olmakla birlikte bu değer bazı suşlar için 0,83'e kadar düştüğü bilinmektedir. Su aktivitesi anerobik koşullarda minimum biraz daha yüksek olup 0,90 civarındadır (Ünlütürk ve Turantaş 1999).

Stafilokoklar, sporsuz bakteriler içinde çevre şartlarına ve dezenfektanlara en çok dayanan, kültürlerde 4 °C’de 2-3 ay, -20 °C’de 3-6 ay dayanma süresine sahip mikroorganizmalardır. 60 °C’deki sıcaklığa 30 dakika dayanabilirler. Antibiyotiklere karşı çok çabuk direnç oluştururlar. Ürettiği penisilinaz etkisiyle penisilin etkisini ortadan kaldırırlar (Ekici ve ark 2008).

Stafilokoklar düşük oranda Guanin ve Sitozin (G+C) içerir. G+C içeriği % 30-39 mol arasındadır. Bununla beraber *Micrococcus* cinsi üyeleri % 68-74 mol oranı arasında G+C içerirler. Stafilokokal hücre duvarı yapısı tipik Gram pozitif mikroorganizma yapısında olup kalındır (30-60 nm). *S. aureus*’un hücre duvarı kalınlığı 120 nm’nin üzerinde olabilir. Hücre duvarı peptidoglikan, teikoik asit ve proteinlerden oluşmuştur. Bu komponentlerden proteinler ökoryatik hücrelere bağlanma ve adezyon için önemli fibrinonektin, fibrinojen, laminin ve kollagen içerirler. Adezyon proteinlerinin bağlanması ile dokulara bakteriyel tutunma mekanizması gerçekleşmiş olur. Antijenik proteinlerden en iyi çalışılmış olanı Protein A’dır ve *S. aureus* suşlarının % 90-98’inde mevcuttur (Aktaş 2006).



Şekil 1.2. *S. aureus*’un mikroskopik ve kanlı agarda görünümü (Aktaş 2014).

1.2.2. *S. aureus*’un Virulens Faktörleri

S. aureus virulansı en yüksek olan stafilokok türüdür. Ancak infeksiyon olup olmaması mikroorganizmanın virulansı ile konak savunma sisteminin oluşturacakları dengeye bağlıdır.

Stafilokokların virulansında rol oynayan faktörler hücre duvar yapıları, kapsül, yüzey proteinleri, toksinleri ve enzimleridir (Akan 2006).

S. aureus suşları, etkenin konakçı hücrelerinde kolonize olmasına katkıda bulunabilen hemolizinler, nükleazlar, proteazlar, lipazlar, hiyaluronidaz ve kolajenaz'ı da içeren enzimler ve sitotoksinleri üretebilirler. Bu komponentlerin ana görevi, lokal konakçı dokularını mikroorganizmanın üreyebilmesi için uygun hale getirmektir. Bazı suşlar ilave olarak Toksik Şok Sendrom Toksini (TSST) ve enterotoksinleri içeren bir veya daha fazla ekzoprotein üretebilirler (Dinges ve ark 2000).

1.2.2.1.Kapsül

Stafilokokların hücre duvarının en dış tabakası polisakkarit bir kapsül ile örtülebilmektedir. *S. aureus*'da 11 kapsüller serotip tanımlanmaktadır. İnfeksiyonların çoğu serotip 5 ve 7 ile ilişkilidir. Serotip 1 ve 2 çok kalın bir kapsüle sahiptir ve mukoid görünümlü koloniler oluşturur. Kapsül, bakteriyi fagositozdan korur ve kateterler gibi yabancı cisimlere yapışmasını sağlar (Tünger 2004).

1.2.2.2.Hücre Duvar Yapıları

Stafilokokların hücre duvarı; protein A, peptidoglikan ve teikoik asit kompleksinden oluşmuştur. Fagositoza karşı bakterinin direncini artırır. Protein A, immunolojik ve teşhis yönünden önem taşır. Hücre duvarının önemli bir kısmını da peptidoglikan maddesi teşkil eder. Hücre duvarındaki polisakkarit kompleksi olan peptidoglikan tabakası ve sitoplazmik membranla bağlantıları bulunan teikoik asit yer almaktadır. Bu polisakkarit, stafilokok türlerine göre ayrı özellik gösterir (Akan 2006).

S. aureus'un hücre duvarının esas bileşeni, hücre duvarı ağırlığının yaklaşık % 50'sini oluşturan peptidoglikan (murein, mukopeptid, glikopeptid) tabakasıdır. Peptidoglikanın yapısında *N*-asetil-glikozamin ve *N*-asetil-muramik asit bulunmaktadır. Kalınlığı bakteri türüne göre değişiklik gösterebilmekle birlikte, yaklaşık, 10–12 nm civarındadır. Bu yapı bakteriye karakteristik şeklini verdiği gibi, hücreye esneklik ve sağlamlık da kazandırır (Bannerman ve ark 2003, Murray ve ark 2005, Koneman ve ark 2006).

Teikoik asit hücre duvarı kuru ağırlığını % 30-50'sini oluşturan diğer bir önemli komponentidir. Teikoik asit, fibronektine spesifik olarak bağlanarak stafilokokların mukozal

yüzeyle yapışmasına aracılık eder. Teikoik asitler eksik immunojen olmasına rağmen peptidoglikana bağlandığında spesifik bir antikor cevabını uyarır. Bu antikor cevabının izlenmesi sistemik stafilokok infeksiyonlarının saptanmasında kullanılmaktadır. Fakat bu diğer tanısal testlerden daha az duyarlıdır ve bugün kullanılmamaktadır (Muray ve ark 2005).

1.2.2.3.Yüzey Proteinleri

Çoğu *S. aureus*'un yüzeyi peptidoglikan tabakasına ya da stoplazmik membrana bağlanan protein-A ile kaplanmıştır. İmmunglobulin (Ig) G1, Ig G2 ve Ig G4'ün Fc reseptörlerine bağlanır. Bu da organizmanın antikor aracılı immun klirensini etkili bir şekilde önler. Kompleman aktivasyonu ve immunkompleks oluşumuna yol açar. Protein-A antifagositik, kemotaktik ve mitojenik etkiler de gösterir. Koagulaz ve nükleaz aktiviteleri ile büyük oranda korelasyon gösterir ve virulans faktörüdür (Cottagnoud 2002). Ayrıca Protein-A'nın saptanması, *S. aureus* için spesifik bir identifikasyon testi olarak da kullanılabilir (Muray ve ark 2005).

1.2.2.4.Enzimler

Katalaz, tüm stafilokoklar bu enzime sahiptir. Hemoprotein yapısındadır. Süperoksit dismutaz ve indirgenmiş flavoproteinlerin oksitlenmesi sırasında bakteri hücresi içerisinde açığa çıkan toksik hidrojen peroksiti su ve oksijene katalize eder (Cauwelier ve ark 2004). Tüm stafilokok türleri toksik hidrojen peroksidi, toksik olmayan oksijen ve suya ayırıştırır katalaz enzimi üretir. Bakteriler, bu enzim sayesinde fagositlerin içindeki toksik oksijen radikalleri tarafından fagositoza karşı direnç kazanır (Tünger 2004).

Koagulaz; ekstraselüler bir proenzimdir. *Coagulase-Reacting Factor* (CRF) ile birleşerek aktif duruma geçer plazmayı pıhtılaştırır. *S. aureus* için standart belirleyici olan koagulazla, patojen olan/olmayan stafilokok ayrımı yapılır. Koagulaz pozitif stafilokokların üzerinde oluşan kalın fibrin tabakasının, mikroorganizmayı fagositoza karşı koruyarak, patojenliğe katkı yaptığı ileri sürülmektedir. Patojen stafilokoklar genellikle, bağlı (clumping factor: CF) kümeleştirici faktör, serbest (stafilokinaz) koagulazlarına sahiptir. Serbest koagulaz ve CF immunolojik olarak birbirinden farklı olduğu gibi, etki mekanizmaları da birbirinden farklıdır. Bu antijenlerin farklı enzimatik mekanizma ile plazmayı pıhtılaştırdıkları belirlenmiştir. Koagulaz filtrelerden geçebilen, sıcaklığa dirençli bir enzimdir. Serbest koagulaz protein yapısındadır ve proteolitik enzimlerle, kolaylıkla, inaktive edilir. Antijenik

olarak farklı dört tipi vardır. Bu enzim fibrinojenin fibrine dönüşmesi ile plazmanın pıhtılaşmasına neden olan ve normal olarak plazmada bulunan koagülazı etkileyen faktörü (CRF) aktive etmektedir. CF ise stafilokokların hücre yüzeyinde meydana gelir ve serbest bırakılmaz. Fibrinojenin fibrine dönüşümü ile hücre yüzeyinde fibrin presipitasyonu meydana gelir ve bunun sonucu olarak stafilokoklar aglütinasyon ve kümeleşmeye uğrar. Bu enzimin patojenitedeki rolü, fagositozu önlemek üzere, bakterinin üzerine fibrin örtmesinden ileri gelmektedir. Her iki koagülaz da insan serumunu pıhtılaştırabilir (Cengiz 1999).

Hyalüronidaz; *S. aureus*'ların % 90'dan fazlası tarafından üretilen bir enzimdir. Bağ dokunun asellüler matriksinde bulunan asidik mukopolisakkaritler olan hyalüronik asiti hidrolize eder. *S. aureus*'un dokulara yayılımını kolaylaştırır (Cauwelier ve ark 2004).

Fibrinolizin; stafilokinaz olarak da adlandırılmaktadır. *S. aureus* suşlarının neredeyse tamamı tarafından üretilmekte ve fibrin pıhtısını çözmektedir(Cauwelier ve ark 2004).

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

Nükleazlar; diğer bazı türler de bu enzimi üretiyor olmasına rağmen, termostabil nükleaz enzimi *S. aureus* için önemli bir markerdir. Bu enzimin infeksiyon patogenezindeki fonksiyonu bilinmemektedir (Chambers 1997).

Beta laktamaz, penisilin grubu antibiyotiklerdeki β -laktam halkasının hidroksil grubunu parçalayarak etkisiz hale getirmektedir. Bu enzim indüklenebilir karakterde üretilbildiği gibi bazı suşlar devamlı biçimde üretebilmektedir ve stafilokokların bu grup antibiyotiklere dirençli hale gelmelerini sağlamaktadır. Ayrıca, aşırı miktarda beta-laktamaz üretimi borderline metisilin dirençliliğine neden olabilmektedir (Chambers 1997).

1.2.2.5.Slaym Faktörü (Slime Factor)

Slaym maddesi, amorf kapsül yapısında glikokaliks materyalidir ve % 40'ı karbonhidrat % 27'si ise proteinden oluşmaktadır. Slaym karakterinden dolayı stafilokoklar tıbbi aletlere tutunup kolonize olabilmektedir. Çok güçlü antijenik yapıda olup yüksek titrede antikor

oluşumuna yol açar. Slaym pozitif stafilokok suşları daha virülettir, fagositoza daha dirençlidirler ve antibiyotiklerin bakteri içine difüzyonunu inhibe ettiklerinden daha fazla oranda antibakteriyellere direnç göstermektedirler (Cengiz 1999).

1.2.2.6.Toksinler

1.2.2.6.1.Sitolitik Toksinler(Hemolizinler)

Alfa (α) hemolizin, bakteriyel kromozom ve plazmidlerin her ikisi tarafından da kodlanabilen, insan ve hayvanlarda hastalık oluşturan *S. aureus*'un çoğu suşları tarafından üretilen 33 kD'luk bir polipeptittir. Bu toksin damar düz kas hücrelerini bozar ve eritrosit, lökosit, hepatosit ve trombositlere zarar vermektedir. Alfa hemolizinin stafilokokal hastalıklarda doku hasarında önemli bir mediyatör olduğuna inanılmaktadır (Muray ve ark 2005). *S. aureus* insan suşlarının ana hemolizindir. Hemolitik, dermonekrotik, lizozom parçalayıcı ve doku kültürlerinde sitolitik etkileri vardır. Tavşan eritrositleri için hemolitik aktivitesi en fazladır, insan eritrositlerine fazla bir etkisi yoktur. İnsan makrofajları ve trombositleri üzerine litik etkisi vardır, monositlere etkisizdir. Dolaşım, kas ve böbrek korteksi dokuları toksine karşı duyarlıdır, bu dokularda tahribat yapmaktadır (Cengiz 1999).

Beta (β) hemolizin, koyun eritrositlerini lizi eder ancak tavşan eritrositleri için hemolitik değildir (Dinges ve ark 2000). İnsan ve hayvanlarda hastalık oluşturabilen *S. aureus*'un bir çok suşu tarafından üretilen, 35 kD'lik ısıya duyarlı bir proteindir. Bu enzim sfingomiyelin ve lizofosfatidilkolin için spesifiteye sahiptir ve eritrosit, fibroblast, lökosit ve makrofajları da içeren çoğu hücre için toksiktir. Beta toksinin insan hastalıklarındaki rolü henüz tam olarak açıklanamamıştır. Ancak alfa toksinle birlikte Stafilokok hastalıklarının karakteristik abse formasyonu ve doku yıkımından sorumlu olabileceğine inanılmaktadır (Muray ve ark 2005).

Gama (γ) hemolizin, insan, tavşan ve koyun alyuvarları duyarlı iken, at ve kuş alyuvarları dirençlidir. Gama hemolizini hemen hemen tüm *S. aureus* suşları sentezlemektedir (Dinges ve ark 2000).

Delta (δ) hemolizinin memelilerin eritrositleri ve diğer hücreleri üzerine lize edici etkisine ilave olarak dermonekrotik etkisi de saptanmıştır. İmmünolojik olarak alfa ve beta toksinden ayrılmaktadır. Litik spektrumu oldukça geniş ve insan, tavşan, koyun ile maymun

alyuvarlarını lizi etmektedir. Mol ağırlığı 103 kDa olup, eritrosit, lökosit, makrofaj, lenfosit ve trombositleri hasara uğratan bir proteindir. Alfa ve beta toksin koagulaz pozitif ve insanda hastalık yapan stafilokok suşlarında predominant olarak bulunur. Koagulaz pozitif stafilokokların % 95'inde bunlardan biri veya diğeri bulunurken, % 82'sinde her ikisi de birlikte bulunabilmektedir (Cengiz 1999, Dinges ve ark 2000).

1.2.2.6.2. Panton-Valentine Lökositin (PVL)

Tüm *S. aureus* suşlarının sadece % 2'si PVL sentezleyebilmektedirler. Ancak şiddetli dermonekrotik lezyonlardan izole edilen suşların % 90'ında bu toksine rastlanılmaktadır. PVL sitotosik etkiye sahip olmasına rağmen, diğerk toksinlerin aksine non hemolitikdir. Ayrıca PVL sadece insan ve tavşan polimorf nükleer lökosit ve makrofajları üzerine sitolitik etki gösterirken, diğerk hücre tiplerine etki etmemektedir (Dinges ve ark 2000).

1.2.2.6.3. Süperantijenler (SAGs)

SAGs belirli T hücre antijen reseptörlerinin beta zincirinin değışken bölgesine (V β) direkt olarak bağlanır ve bu reseptörleri, antijen sunucu hücrelerdeki MHC (major histokompatibilite kompleks) sınıf II molekülleri ile köprü oluşturarak, non-spesifik olarak birleştirmektedir. Sonuç olarak antijenin, antijen sunucu hücreler tarafından işlenmesi ve sunulması gerekmeksizin, uygun V β gen ürününü taşıyan tüm T hücreleri aktive olmaktadır. Normal şartlarda bir antijen makrofaj yüzeyinde MHC II ile kompleks oluşturmuş halde eksprese edildiğinde, sadece kendisi için özgül T hücrelerini uyarırken, SAGs, çok az miktarda bile özgül olmayan T hücrelerine bağlanarak aşırı miktarda sitokin salınımına neden olmaktadır. *S. aureus* tarafından sentezlenen piyojenik toksinler, başta SEA ve SEB olmak üzere stafilokoksik enterotoksinler, TSST-1, ET-A, ET-B ve ET-D süperantijen olarak fonksiyon göstermekte ve gıda zehirlenmelerine, TSS ve SSSS hastalıklarına yol açmaktadırlar (Plano 2004, Iwatsuki ve ark 2006, Koneman ve ark 2006).

Süperantijenler, *S. aureus* tarafından diğerk ekzoproteinler gibi geç logaritmik fazda en yüksek düzeyde sentezlenmektedir. Bu toksinleri kodlayan genler plazmidler, bakteriyofajlar ya da heterolog genetik elementler aracılığı ile taşınmaktadır. Bunların ekspresyonu ise *agr* (accessory gene regulator), *sar* (staphylococcal accessory gene regulator) ve represyon sistemi olmak üzere en az üç regülatör sistem tarafından kontrol edilmektedir (Seo ve Bohach 2007).

Olgun piyojenik toksinler moleküler ağırlıkları 20-30 kDa arasında değişen, küçük, nonglikolize, polipeptit molekülleridir. Bunlar kimyasal inaktivasyona, proteolizise ve kaynatmaya karşı kısmen dayanıklıdır. Piyojenik toksinlerin aminoasit sekansları arasında % 22-80 oranında bir benzerlik saptanmıştır (Dinges ve ark 2000).

1.2.2.6.3.1. Eksfoliyatif Toksin

Epidermolitik toksin (Eksfoliyatif Toksin), deri yüzeyinde, genellikle çocuklarda değişik lezyonlara neden olmaktadır. İnsanlarda oluşturduğu hastalık SSSS (Staphylococcal Scalded Skin Syndrome) olarak adlandırılmıştır. Epidermisin stratum granulosum tabakasında çeşitli oranlarda çatlaklarla karakterizedir. ET-A (Eksfoliyatif Toksin A) ve ET-B (Eksfoliyatif Toksin B) olarak iki serotipi vardır. ET-A kromozomal, ET-B plazmid tarafından kodlanmaktadır. Ultrastrüktürel çalışmalar, serin proteazlar olan bu toksinlere maruz kalma sonucunda epidermisin stratum granulosum tabakasındaki intrasellüler köprüler (desmozomlar)'in ayrılmasının gerçekleştiğini göstermiştir. Bu toksinler hücre yıkımı veya inflamasyonla ilişkili değildir. Bu yüzden epidermisin etkilenen tabakasında ne stafilokoklar ne de lökositler bulunmamaktadır. Epidermisin toksine maruz kalması sonucu koruyucu nötralizan antikorlar gelişmektedir. Haşlanmış deri sendromu çoğunlukla küçük çocuklarda ve nadiren de büyük çocuklar ve erişkinlerde görülmektedir (Arbuthnott ve ark 1990).

1.2.2.6.3.2. Toksik Şok Sendromu Toksin-1 (TSST-1)

Protein tabiatında olup 22 kDa moleküler ağırlığına sahiptir. Proteolitik enzimler ve ısı ile inaktivasyona dirençlidir. Konakçı vücudunda T lenfosit proliferasyonunu ve monositlerden interleukin-1 salınımını uyarmaktadır (Winn ve ark 2006). Bazı suslar stafilokokal pirojenik ekzotoksin C ve stafilokokal enterotoksin F olarak da adlandırılan TSST'ni salgırlar. Süperantijenik yapıda olup stafilokokal pirojenik toksin süper antijenler ailesinde yer alır. Ani çocuk ölümlerine, artritise neden olabilmektedir. Çocuklarda sonradan oluşan bir kalp hastalığı olan Kawasaki sendromu gösteren hastaların % 60'ından TSST-1 üreten *S. aureus* izole edilmiştir. Toksik şok sendromu; geniş bir spektrumda klinik ve histopatolojik bulgularla karakterize akut ve potansiyel ölümcül bir hastalıktır. Diğer endotoksin aracılı şoklarda olduğu gibi kapillar sendroma bağlı hipotansiyon, hipoalbuminemi ve generalize ödem görülmektedir. Ölümcül vakalarda hipovolemik şok en önemli etkidir. Yüksek ateş, diffuz macular eritroderma, deride deskuamasyon, diyare, kusma, renal disfonksiyon, intrahepatik

kolestazis, trombositopeni ve hipokalsemi hastalarda tespit edilen diğer bulgulardır. Ayrıca akut solunum sendromu ve intravasküler koagülopati potansiyel hayatı tehdit edici komplikasyonlardır (Dinges ve ark 2000).

1.2.3. *S. aureus*'un Gıdalarda Bulunuşu ve Kontaminasyon Kaynakları

Gıdaların genellikle hazırlanma aşamalarında insanlar tarafından enterotoksijenik *S. aureus* ile kontamine olması ve uygun olmayan muhafaza sıcaklığı ve süresine bağlı olarak toksin oluşmakta ve toksin içeren gıdaların tüketilmesi sonucunda zehirlenme meydana gelmektedir (Erol 2007). *S. aureus*; havada, tozda, toprakta, dışkı ve dışkı ile kontamine suda, çevresel yüzeylerde, insektlerde, gıda hazırlanışında kullanılan ekipmanların üzerinde bulunmaktadır. İnsanlar ve hayvanlar etkenin asıl rezervuarlarıdır. Gıdaların *S. aureus* ile kontaminasyon kaynaklarının başında, özellikle burun-boğaz boşluğu ve delikleri olmak kaydıyla, deri ve derideki apselli olabilen yaralarda, apselerde, sivilcelerde, ter bezleri ve kıl köklerinde etkenin kolonize olduğu rezervuar insanlar gelmektedir (Uğur ve ark 2001).

Birçok gıda *S. aureus*'un gelişmesi için uygun bir ortam oluşturmaktadır. Stafilokoklar protein ve karbonhidratlarca zengin ve asitliği düşük gıdalarda kolaylıkla gelişmektedir. Stafilokokal intoksikasyonlardan sorumlu sayılan gıdalar arasında et ve et ürünleri, kanatlı eti, süt ve süt ürünleri, dondurma, kremalı pastacılık ürünleri, salatalar (yumurtalı, patatesli ve piliç etli) ve sandviçler bulunmaktadır. Özellikle salata ve sandviç gibi tüketime hazır gıdaların hazırlanması, depolanması ve sunulması aşamalarında kontamine edilmeleri *S. aureus* intoksikasyonları açısından risk oluşturmaktadır (Le Loir ve ark 2003, Bremer ve ark 2004, Normanno ve ark 2005).

Stafilokokal intoksikasyonlarda sıklıkla sorumlu tutulan gıdalar ülkelerin tüketim alışkanlıklarına bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. 1969-1990 yılları arasında İngiltere'de bildirilen stafilokokal gıda zehirlenmelerinin % 53'ünün kontamine et ürünleri (özellikle jambon), % 22'sinin kanatlı eti, % 8'inin süt ürünleri, % 7'sinin balık ve kabuklu deniz ürünleri ve % 3,5'inin ise yumurta tüketimi sonrasında ortaya çıktığı belirtilmektedir. Yine Fransa'da 1999-2000 yılları arasında meydana gelen stafilokokal intoksikasyonların % 32'sinden süt ürünleri (özellikle peynir), % 22'sinden et, % 15'inden sosis-sucuk gibi et ürünleri ile turtalar, % 11'inden balık ve diğer deniz ürünleri, % 11'inden yumurta ve yumurta içeren ürünler ve % 9,5'inden ise kanatlı etleri sorumlu tutulmuştur. Amerika'da ise 1975-1982 yıllarını kapsayan dönemde stafilokokal intoksikasyonların % 36'sının kırmızı et, %

12,3'ünün salata, % 11,3'ünün kanatlı eti, % 5,1'inin pastacılık ürünleri ve % 1,4'ünün süt ürünleri ile deniz ürünlerinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Bhatia ve Zahoor 2007).

Süt ve süt ürünlerinin birçok patojen için olduğu gibi *S. aureus* içinde uygun bir ortam olduğu kabul edilmektedir. *S. aureus* çiğ sütte doğal olarak bulunurken, yetersiz pastörizasyon veya ekipman ve personel kaynaklı kontaminasyon nedeni ile pastörize süt ve diğer süt ürünlerinde de bulunabilmektedir. *S. aureus* sütlere sağıldıkları hayvanlardan bulaşmaktadır. Özellikle mastitisli hayvanlardan sağılan sütle enteropatogenik *S. aureus* suşlarının önemli bir kaynağıdır. *S. aureus*'un neden olduğu gıda zehirlenmelerinin süt ürünlerinden çoğunlukla peynir ve süt tozu gibi ürünlerden kaynaklandığı belirtilmektedir. Herhangi bir sebep ile *S. aureus* kontaminasyonu şekillenmesini takiben uygun muhafaza koşullarının sağlanmaması (<7°C) etkenin gelişerek toksin sentezlemesine neden olmakta ve enterotoksin oluşumu sonrasında uygulanan pişirme, pastörizasyon vb. işlemler toksin eliminasyonunda yetersiz kalarak SGI'lere neden olmaktadır (Erol 2007).

Türk Gıda Kodeksi, 2009/14 Tebliğ numaralı, Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliğinde Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliğ'e göre çiğ süt *S. aureus* sayısı bakımından aşağıda verilen normları karşılamalıdır (Anonim 2009).

S. aureus 1 ml de: (m=100, M=500, n= 5, c=2)

n= örnekleri kapsayan örnek birim sayısı (adet)

m= bakteri sayısı için kabul edilebilir eşik değeri, (cfu/ml; gr) eğer tüm örnek birimlerindeki bakteri sayısı (m) i geçmemişse sonuç yeterli sayılır.

M= bakteri sayısı için maksimum sınır değeri (bir veya daha fazla örnek biriminde bakteri sayısı "M" veya daha fazla ise sonuç olumsuz sayılır).

c= örnek grubu içinde izin verilen maksimum sınırın (M) altında olması istenen örnek birim sayısı (diğer örnek birimlerindeki bakteri sayısı "m" veya daha az ise örnek olumlu sayılır).

1.3. Stafilokokal Enterotoksinler

Stafilokokal enterotoksinler (SE) heterojenik olmakla birlikte, suda çözünebilir, tek zincirli, 26-35 kDa molekül ağırlığında bir protein grubudur. İzoelektrik noktaları pH 7-8,6 arasında değişmektedir. Enterotoksinler proteolitik enzimlere, düşük pH değerlerine ve relatif

yüksek ısıya dirençli olduklarından gıda intoksikasyonları açısından oldukça önemlidirler. Enterotoksinlerin ısıya dirençleri, enterotoksinin tipine, gıda türüne, ortamın pH değeri ve tuz konsantrasyonuna bağlıdır (Erol 2007, Bhunia 2008).

SE'ler globüler yapıda proteinler olup, daha çok aspartik asit, glutamik asit, lizin ve tirozin amino asitlerini içermektedirler. SE'ler birçok konuda dirençlilik göstermektedir. Örneğin, ısıya oldukça dirençli olup, sütün pastörizasyonu ile enterotoksinler elimine edilememektedir. SEB'nin pH 7,3'de 60 °C'de 16 saat süre ile ısı işlemi uygulanmasına rağmen biyolojik olarak aktif olduğu gözlenmiştir. Yine SEC'nin serolojik yapısında 60 °C'de 30 dk süre ile ısı işlemi uygulanması sonucunda herhangi bir değişiklik saptanamamıştır. SE'ler tripsin, kimotripsin, rennin ve papain gibi proteolitik enzimlere de dirençlilik göstermektedirler. SE'lerin dayanıklı bir yapıya sahip olmalarında molekül yapılarında bulunan disülfid bağının rol oynayabileceği düşünülmektedir (Jay ve ark 2005).

SE'ler higroskopik özellik göstererek su ve tuzlu solüsyonlarda çözünbilme özelliğine sahiptirler. Enterotoksinler pH<2'de pepsin hariç insan intestinal sisteminin proteolitik enzimlerine dirençlidir (Erol ve İşeri 2004).

SE'lerin ısıya dayanıklılıkları üzerine yaptıkları bir çalışmada, SEA ve SEB'nin 100 °C'de 90 dakikada, 120 °C'de 30 dakikada, SEC'nin 100 °C'de 180 dakikada, 120 °C'de 60 dakikada tamamen inaktive olduğunu bildirmişlerdir. Termal dayanıklılıkta önemli kriterler; toksinin saflığı, serolojik tipi, yaklaşık toksin miktarı, ısı işlemi uygulanan ortam, ortamın pH değeri ile teşhis ve saptama yöntemidir. Toksinler kurumaya ve gama ışınlarına yüksek direnç göstermektedirler (Katsuhiko ve ark 2002, Erol ve İşeri 2004).

Serolojik olarak, 5 temel stafilokokal enterotoksin tipi (SEA, SEB, SEC, SED, SEE) tanımlanmıştır. SEA haricinde, bütün SE'ler genellikle geç logaritmik faz ya da erken durgunluk fazında yüksek düzeyde oluşturulmaktadır. SEA ise logaritmik fazın ilk döneminde üretilmektedir. SEG, SEI ve SEH, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEU, SEP, SEQ, SER yakın zamanda identifiye edilen enterotoksinler olup, bunların yapı ve fonksiyonlarına ilişkin çalışmalar devam etmekle birlikte bazılarının emetik aktivitesinin olmadığı bildirilmiştir (Seo ve Bohach 2007, Morandi ve ark 2009).

SE'lerin ortak özellikleri;

a) Emetik özellikte olmaları (sindirim sistemindeki reseptörlere bağlanarak vagus ve sempatik sinirler yoluyla beyindeki kusma merkezini uyarırlar),

b) Süperantijenite özelliği (T hücre proliferasyonunu geleneksel antijenlere göre daha yüksek düzeyde stimüle ederler),

c) Proteaz ve ısıya dirençlilik göstermeleri şeklinde sıralanabilmektedir (Dinges ve ark 2000).

Genel olarak enterotoksijenik *S. aureus*'ların gıdada 10^6 kob veya $>10^6$ kob /g-ml düzeyine ulaşmaları sonucu yeterli miktarlarda toksin oluşabilir. Toksinlerin oluşumunda suşun tipi, gıdanın kompozisyonu, sıcaklık, diğer fiziksel ve kimyasal parametreler ile inhibitörlerin varlığı rol oynamaktadır. Stafilokokal intoksikasyonların yaklaşık % 80'i A tipi toksin tarafından meydana gelir ve bunu SEB ve SED tipleri izler. Genel olarak A, B ve C tipi toksinlere daha çok insan orjinli suşlarda rastlanırken B tipine yumurta ve balıktan, C tipine sığır ve koyunlardan, D tipine ise kanatlılardan izole edilen suşlarda rastlanmaktadır. A ve D tipi intoksikasyonlara sık rastlanmasının sebebi, bu toksinlerin asıl kaynağının insan olması, logaritmik üreme fazında primer metabolit olarak oluşturulması, ayrıca A tipi toksininin çok değişik ve olumsuz koşullar (PH, Eh, a_w) altında oluşturulabilmesinden kaynaklanmaktadır. Buna karşın SEB ve SEC sekonder metabolit olarak ortaya çıktığından ancak logaritmik fazın sonunda oluşabilmekte, pratik koşullarda da bu 20 saatten az olan inkübasyon süresinde gerçekleşmemektedir (Erol 2007).

1.3.1. Enterotoksinlerin Biyolojik Etkinliği ve Toksisitesi

S. aureus'un infeksiyöz dozu 10^6 - 10^7 kob/g-ml'dir ve toksin konsantrasyonunda gıdanın gramında $1ng$ 'dır. *S. aureus* ile kontamine gıdanın tüketilmesini takiben toksinler absorbe edilir ve tipik gastroenteritise neden olur. Toksinler mide hattındaki vagus sinirlerini ve medullayı stimüle eder, kusma merkezi uyarılırken şiddetli emetik durum oluşturur. Ayrıca enterotoksinler intestinal epitelyum hücrelerine zarar verirler, intestinal vilileri parçalarlar. Stafilokok zehirlenmelerinde hastalık belirtileri salya çıkartma ile başlar. Daha sonra mide bulantısı, öğürme ve karın ağrısı görülür. Şiddetli zehirlenmelerde dışkı ve kusmukta kana rastlanabilir. Görülen diğer belirtiler, baş ağrısı, terleme, üşüme, kramplar, düşük nabız,

halsizlik ve şok durumlarıdır. Vücut sıcaklığı genellikle düşüktür, su kaybı fazladır. Zehirlenme belirtileri gıdanın tüketiminden 1-6 saat sonra genellikle 2-4 saat içinde görülmekte ve hastalık 1-2 gün içinde kaybolmaktadır. Stafilokokal enterotoksinlerin intestinal hücreler üzerine direkt etkisi açık değildir ve bu yüzden kolera toksini veya *Escherichia coli* enterotoksinleri gibi klasik enterotoksinlerden farklıdır (Halpin-Dohnalek ve Marth 1989, Sutherland ve Varnam 2002).

İntoksikasyonun oluşum ve seyrinde, bireysel duyarlılık, tüketilen gıda miktarı, bireyin genel sağlık durumu ve toksin tipi önem taşır. A tipi enterotoksin en kuvvetli etkileyen toksin tipi olup, duyarlı insanlarda 1 µg'ı intoksikasyon oluşumu için yeterlidir. Ancak genel olarak 1-10 µg toksinin oral yolla alınmasıyla zehirlenme tablosu meydana gelmektedir. Stafilokokal intoksikasyonda mortalite oranı genel olarak % 0,03 düzeyinde olup, daha duyarlı popülasyonlarda bu oran % 4,4'e çıkabilmektedir (Erol 2007, Seo ve Bohach 2007, Adams ve Moss 2008).

Bununla birlikte ABD'de okul çağı çocukları arasında görülen çikolatalı süttten kaynaklanan gıda zehirlenmesinden elde edilen bulgular, bu çocuklarda hastalık oluşumu için 0.5-0.75 ng/ml'lik SEA dozunun yeterli olabileceğini göstermiştir. Stafilokokal zehirlenmelerden kaynaklanan ölümler, özellikle çocuk ve yaşlılarda kaydedilmesine karşın çok nadir olarak görülmektedir (Kınık ve ark 1998, Su ve Wong 1997).

1.3.2. Enterotoksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler

1.3.2.1. Ekstrasellüler Faktörler

Besin maddeleri: Düşük su aktivitesi değerine sahip besi yerine prolin ilave edilmesiyle SEB oluşumunun stimüle edildiği ancak, glisin, betain ve karnitin ilavelerinde bu etkinin görülmediği bildirilmiştir. Demir, inorganik fosfat, karbondioksit veya bikarbonat içeren besiyerleri sekonder metabolitlerin oluşumunu artırmaktadır. Magnezyumun SEC, demirin ise SEB oluşumunu yüksek düzeyde etkilediği bildirilmiştir (Katsuhiko ve ark 2002).

Sıcaklık: *S. aureus* mezofilik özelliğe sahip bir bakteri olmasına rağmen, bazı suşları 6,7 °C'nin altında da üreyebilmektedir. Genellikle 6,7-47,8 °C 'ler arasında, optimal 35-37 °C arasında üreme göstermekle birlikte, 10-46 °C'ler arasında enterotoksin oluşturur. Toksin oluşumu için optimal sıcaklık 40-45 °C'ler arası olup, 25-30 °C 'de de toksin oluşturabildiği

saptanmıştır. 10 °C’de de düşük miktarlarda SEA, SEB, SEC ve SED oluşturduğu bildirilmiştir (Jay ve ark 2005, Adams ve Moss 2008).

pH değeri: Genellikle pH 4,0 ile 10,0 arasında oldukça geniş bir spektrumda üreyebilen *S. aureus* için optimal üreme ve enterotoksin üretimi için gerekli pH değeri 6,0 ile 7,0 arasında bulunmaktadır. Enterotoksinlerin izoelektirik pH değerleri ise Enterotoksin A (EA) için pH 6,8, EB için pH 8,6, EC için pH 8,6, ED için pH 7,4 ve EE için pH 7 şeklindedir. PH değeri 5,0’ın altında ve 9,0 üzerinde genelde toksin oluşturmadıkları bildirilmektedir. Ancak laboratuvar koşullarında SEA’nın PH 4,6’da, SEB ve SEC’nin PH 4,9’da toksin üretebileceği saptanmıştır (Le Loir ve ark 2003, Jay ve ark 2005, Erol 2007).

Atmosferik koşullar: Anaerobik koşulların *S. aureus*’un gelişimi ve SEA oluşumu üzerine etkilerini araştırıldığı bir çalışmada, Stafilokokal hücre yoğunluğunun aerobik koşullarda anaerobik koşullara göre 9-17 kat daha fazla olduğu bulunmuş ve SE oluşumunun gelişmeye bağlı olduğu gösterilmiştir. Anaerobik ortamda yavaş gelişme az toksin oluşumuna neden olurken her iki koşulda da inkübasyonun 120. dakikasından sonra SEA belirlenebilmiştir (Belay ve Rasooly 2002).

Sodyum klorür ve su aktivitesi: *S. aureus* genellikle % 7-10 düzeyinde NaCl içeren ortamlarda üreyebilirken, bu değer pH, a_w , sıcaklık gibi faktörlere bağlı olmakla birlikte bazı suşları için % 20’ye kadar çıkmaktadır. Toksin oluşturmak için ortamdaki maksimum NaCl miktarının % 10’a kadar düştüğü belirtilmektedir. *S. aureus*’un gelişebildiği ve toksin oluşturabildiği minimum a_w değerleri sırasıyla 0,83 ve 0,86 olarak bildirilmektedir (Adams ve Moss 2008).

Yüksek NaCl konsantrasyonunun pH’dan bağımsız olarak SE üretimini olumsuz yönde etkilediği belirtilmektedir. % 10 NaCl ve pH 5,4’de toksin oluştururken, NaCl düzeyi % 12 olduğunda ise toksin oluşturamadığı gözlenmiştir. *S. aureus*’un gelişmesinin pH 4,8 ve % 5 NaCl içeren sıvı besiyerinde inhibe olduğu tespit edilmiştir. % 10 NaCl içeren ve pH’sı 6,9 olan bir ortamda enterotoksin B’yi oluşturduğu, ancak % 4 NaCl içeren ve pH’nın 5,1 olduğu bir ortamda ise oluşturamadığı bulunmuştur. Genel olarak, ortamdaki tuz konsantrasyonu arttığında gelişmesi için gerekli olan minimum pH değerinin yükseldiği ifade edilmektedir (Le Loir ve ark 2003, Jay ve ark 2005).

Etkenin üremesi ve toksin oluşturabilmesi ile ilgili gerekli koşullar Çizelge 1.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. *S. aureus*’un üreme ve toksin oluşturması için genel koşullar (Erol 2007).

	Üreme		Toksın Oluşturma	
	Optimum	Spektrum	Optimum	Spektrum
Sıcaklık (°C)	37	6,7-47,8	40 –45	10 –47,8
pH	6,7	4-10	6 –7	4,5–9,8
aw değeri	0,98	0,83 – 0,99	0,98	0,86–0,99
% NaCl	0	0 –20	0	0 –10
Atmosfer	Aerob	Aerob-Anaerob	Aerob	Aerob-Anaerob

Rekabetçi özellik: *S. aureus* rekabetçi özelliği zayıf bir bakteri olup, gıdalardaki yarışmacı mikrofloraya oldukça duyarlıdır. Fermente gıdalarda laktik asit bakterileri tarafından üretilen laktik asit ve bakteriyosinler *S. aureus*’un gelişmesini olumsuz yönde etkilemektedir (Le Loir ve ark 2003). Sıvı besi yerinde *Pediococcus cerevisiae* ve toksin oluşturan *S. aureus* suşları arasındaki etkileşimler stafilokokların 20 kat daha az SEA, SEB ve SEC oluşturmalarıyla sonuçlanmıştır (Park ve ark 2006).

1.3.2.2. İntrasellüler Faktörler

S. aureus’un virulens faktörlerinin düzenlenmesinde *agr* (accessory gene regulator) geninin rolü büyüktür. *Agr* lokusundaki mutasyonlar birçok SE ve diğer ekzoproteinlerin oluşumunun azalmasıyla sonuçlanır. *Agr* tarafından gentranskripsiyonal ve translasyonal olarak düzenlenebilir. *Agr*’nin SEB ve SEC’yi transkripsiyonal düzeyde regüle ettiği ve bakteriyel gelişme siklusu boyunca *agr*’nin aktif hale geçmesi ile SEB, SEC ve SED oluşumunun aynı zamana rastladığı bildirilmiştir. Bütün SE’ler *agr* tarafından regüle edilmemektedir. Örneğin SEA erken oluşturulduğu için *agr* mutasyonlarından etkilenmemektedir (Tremaine ve ark 1993). *Agr* nötral pH değerlerinde en yüksek düzeyde aktive olur. Glikoz içeren düşük pH’lı besiyerlerinde *agr*’nin hedef aldığı genlerin negatif olarak regüle edildiği ve ekzoprotein oluşumunun azaldığı veya hiç oluşmadığı bildirilmiştir (Jablonski ve ark 1997). Bununla beraber bakteri yoğunluğunun düşük olduğu ortamlarda *agr* aktif hale geçememekte dolayısıyla adezinlerin yukarı düzenlenmesiyle yani aktif hale

geçmesiyle toksin ve enzimlerin oluşumu engellenmektedir. Bakteri yoğunluğunun fazla olduğu durumlarda *agr*'nin yukarı, adezinlerin aşağı düzenlenmesiyle toksin ve enzimlerin salınabildiği bildirilmiştir (Wisell 2000).

1.3.3. Stafilokokal Enterotoksinlerin Dizi Analizleri

Stafilokokal enterotoksin A (SEA)'yı kodlayan *entA* geni bir bakteriyofaj tarafından taşınmaktadır. Bu fajın sirkularizasyon ve karşılıklı gen aktarımı sonucunda bakteri kromozomuna dahil olduğu ve *entA* geninin faj bağlanma bölgesine yakın bir yerde lokalize olduğu saptanmıştır. Bu genin 771 baz çiftinden oluştuğu ve 257 aminoasit rezidüsünden oluşan enterotoksin A prekürsörünü kodladığı belirtilmiştir. Bu yapıda 24-rezidülük hidrofobik bir N terminal sekansı, 27 kDa moleküler ağırlığa sahip olgun SEA'yı oluşturmaktadır (Balaban ve Rasooly 2000). SEA, *S. aureus*'un logaritmik fazın ilk döneminde sentezlendiğinden çevre şartları optimal olmasa dahi intoksikasyon yapacak düzeye ulaşabilmektedir. Bu nedenle, SEA, stafilokokal gıda zehirlenmelerinde en sık sorumlu tutulan toksindir. Ayrıca, ekspresyonu için SEB, SEC, SED gibi *agr* regülasyonuna ihtiyaç duymamaktadır (Seo ve Bohach 2007).

Stafilokokal enterotoksin B (SEB), *S. aureus*'da kromozomal olarak lokalize olan *entB* geni tarafından kodlanmakta ve bu genin kodlama bölgesi yaklaşık 900 nükleotid içermektedir. Bu gen diğer bakteri suşlarında ise, 750 kb'lık bir plazmid ile taşınmaktadır. SEB prekürsör proteini, 31,400 Da moleküler ağırlığında ve 267 aminoasitten oluşmaktadır (Derbentli 2005). SEB ile SEC1 arasında % 68 düzeyinde bir amino asit benzerliği bulunmuştur (Jay ve ark 2005).

Stafilokokal enterotoksin C (SEC)'nin antijenik olarak SEC1, SEC2 ve SEC3 olmak üzere 3 farklı alt tipi vardır. SEC3, SEC1 ve SEC2 ile serolojik ve kimyasal olarak ilişkili olmasına rağmen, tamamıyla bu toksinlerle benzerlik göstermemektedir. *entC3* geni 801 baz çiftinden oluşmakta ve 27-rezidülük sinyal peptidini içeren 267 aminoasitlik prekürsör proteini kodlamaktadır. SEC3 ile SEC1 arasında % 98 düzeyinde bir nükleotid sekans benzerliği saptanmıştır (Jay ve ark 2005). SEC3 ile SEC2 ve SEC1 arasında sırasıyla 4 ve 9 aminoasitlik bir fark olduğu belirtilmiştir. *entC2* geni 801 bp'lik olup, 267 aminoasitlik prekürsör proteini kodlar. Olgun SEC2, 239 aminoasitten oluşmaktadır (Balaban ve Rasooly 2000).

Stafilokokal enterotoksin D (SED), gıda zehirlenmelerinden sıklıkla izole edilen ikinci önemli toksindir. SED'yi kodlayan *entD* geni 27,6-kb'lık penisilinaz plazmidinde lokalize olup, 30 aminoasitlik sinyal peptidi içeren 258 aminoasitlik prekürsör proteini kodlamaktadır (Jay ve ark 2005, Seo ve Bohach 2007). 228 aminoasitlik olgun polipeptit diğer SE'lerle sekans benzerliği göstermektedir. SED süperantijeni Zn⁺² varlığında MHC sınıf II moleküllerine yüksek düzeyde affinite göstermektedir (Zhang ve ark 1998, Balaban ve Rasooly 2000).

Stafilokokal enterotoksin E (SEE) geni (*entE*) 26 kDa moleküler ağırlığa sahip olgun proteini kodlar. Sekans analizleri sonucunda SEE, SED ve SEA'nın birbirleriyle yakın ilişkili olduğu bulunmuştur. SEE, SEA ile yüksek düzeyde (% 84) sekans benzerliği göstermektedir (Balaban ve Rasooly 2000, Erol ve İşeri 2004). SEE, stafilokokal gıda zehirlenmelerine nadiren neden olmaktadır (Seo ve Bohach 2007).

Stafilokokal enterotoksin G (SEG), SpeA, SEB, SEC ve SSA'ya (streptokokal süperantijen A) en çok benzeyen toksindir ve *entG* geni 258 aminoasitlik prekürsör proteini kodlamaktadır (Balaban ve Rasooly 2000).

Stafilokokal enterotoksin H (SEIH), yeni bulunan bir enterotoksin olup, 27300 Da moleküler ağırlığa sahiptir. Toksini oluşturan aminoasit sekansının amino (NH₂-) ucu kendine özgü olup, diğer enterotoksinlerle arasında herhangi bir çapraz reaksiyon saptanmamıştır (Balaban ve Rasooly 2000, Seo ve Bohach 2007).

Stafilokokal enterotoksin I (SEI), diğer SE'ler ile en az benzerliği olan toksindir ve *entI* geni 242 aminoasitlik prekürsör proteini kodlamaktadır (Balaban ve Rasooly 2000).

Stafilokokal enterotoksin J (SEIJ)'yi enterotoksin D'yi kodlayan plazmid üzerindeki bir açık okuma bölgesinin kodladığı bulunmuştur. Enterotoksin D ve J'nin açık okuma bölgelerinin birbirine zıt yönlerde transkripte olduğu ve 895 nükleotid içeren intergenik bir bölge sayesinde ayrıldığı saptanmıştır. 269 aminoasitten oluştuğu tahmin edilen SEJ proteininin SEA, SEE ve SED ile önemli düzeyde (% 64- 66) sekans benzerliği bulunmuştur. Moleküler düzeyde yapılan çalışmalar sonucunda, *entJ* determinantının SED'yi kodlayan bütün plazmidlerde bulunabileceği düşünülmektedir (Zhang ve ark 1998, Seo ve Bohach 2007).

Stafilokokal Enterotoksin K (SEK), SEK son zamanlarda keşfedilen yeni bir enterotoksindir. 26,000 Da moleküler ağırlığına sahiptir ve deneysel çalışmalarda izoelektrik noktası 7.0-7.5 olarak belirlenmiştir (Park ve ark 2006).

1.3.4. Stafilokokal Enterotoksinlerin Teşhisi

Stafilokokal intoksikasyonların kesin olarak belirlenebilmesi ancak enterotoksinlerin saptanması ile mümkündür. 100 g gıda içerisinde 0,1-10 ng enterotoksin bulunması zehirlenme semptomlarının ortaya çıkması için yeterlidir. Bu yüzden enterotoksinlerin saptanabilmesi için duyarlılığı yüksek testlere ihtiyaç vardır. Günümüzde duyarlı ve kolay bir metot olarak ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) tekniği kullanılmakta olup, diğer alternatif teknikler arasında; Ekstraksiyon - konsantrasyon metodu, RIA (Radio immun Assay), RPLA (Reversed Passive Latex Agglutination), VIDAS tekniği gösterilmektedir (Letertle ve ark 2003, Erol 2007). Kullanılan bu metotlarda çapraz reaksiyonların şekillenebileceği ve spesifitelerinin DNA bazlı metotlara kıyasla daha düşük olduğu bildirilmiştir (Aitichoua ve ark 2004). Bu nedenle PCR teknolojisi kullanılarak, SE'leri kodlayan genlerin DNA sekanslarının tespitine yönelik çalışmalar yapılmaktadır.

Çizelge 1.2. Stafilokokal enterotoksinlerin saptanmasında kullanılan test kitleri (Erol 2007).

Kit	Tespit Yöntemi	Saptanan SE'ler	Toksin Tiplerini Ayırma	Duyarlılık (ng/ml)	Test Süresi (saat)
RIDASCREEEN	ELISA	A-E	Evet	0,2- 0,75	3
SET-EIA	ELISA	A-D	Evet	0,1 - 1,0	20
TECRA	ELISA	A-E	Hayır	1,0	4
TRANSIA	ELISA	A-E	Hayır	0,2	1,5
RPLA	RPLA	A-D	Evet	0,5 - 1,0	20 -24
VIDAS	ELFA	A- E	Hayır	1,0	1,5

RIA, kültür filtratları ve gıda ekstraktlarında enterotoksinlerin saptanması için geniş oranda kullanılmıştır. Bu metot antikör moleküllerin üzerindeki bağlanma bölümlerine, örneklerde işaretlenmemiş bu toksin ile standart radyoaktif işaretlenmiş toksinin yarışması

esasına dayanır. Genel olarak hızlı (3-4 saat) ve 1-10 ng/g düzeyinin altında toksinleri saptayabilen bir yöntemdir. Dezavantajları ise non-spesifik reaksiyonlar, yüksek oranda purifiye enterotoksin gerektirmesi, antijenik epitopların işaretlenmesi esnasında mümkün olabilecek advers etkiler, radyoizotopların kısa yarılanma ömrü, radyonüklidlerin insan sağlığına zararları ve pahalı saptama cihazlarına gereksinim olmasıdır. ELISA veya EIA (Enzyme Immuno Assay) uzun zamanlardan beri antijen ve antikorların saptanmasında kullanılmıştır. ELISA, RIA'ya benzer olarak duyarlı ve hızlıdır. Enzim aracılığı ile kromojenik substratların katalizlenmesi ve visuel olarak değerlendirilmesi esasına dayanır ELISA testi için gerekli ekipman birçok laboratuarda bulunabilir ve enzim-antikor konjugatları aktivitelerini kaybetmeden -20°C 'de uzun bir periyotta saklanabilir (Çırak 1999, Brett 2006).

Kompetitif ELISA ve kompetitif olmayan iki antikorlu sandwich ELISA gibi çeşitli tiplerde ELISA teknikleri geliştirilmiştir (Su ve Wong 1997). Sandwich ELISA, SE'lerin saptanmasında iyi bir metot olarak gösterilmiş ancak protein A varlığında yanlış pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Protein A'nın egellenmesi için koyun IgG'leri kullanılmış ve uygun sonuçlar alınmıştır (Notermans ve ark 1982).

Gilbert ve Wieneke (1987), SE'lerin saptanmasına yönelik 4 farklı metodu karşılaştırdıkları bir çalışmada, RPLA ticari test kitini kolay uygulanabilir, sandwich ELISA ticari test kitini ise çok duyarlı bulduklarını bildirmişlerdir. Ancak ELISA kitinin çok sayıda numuneyi işleme açısından pratik olmadığı belirtilmiştir. RPLA kitinin daha az numunede pozitif sonuç verdiği ve bazen non-spesifik aglütinasyonların oluşabildiği bildirilmiştir. Ayrıca ELISA kiti ile SED varlığında bazı gıda ekstratlarında kontrol tüplerinde yüksek absorbans değerleri ile karşılaşıldığı ve yanlış negatif sonuç alınabildiği bildirilmiştir.

1.4. *S. aureus* ve Toksinlerinin Neden Olduğu Gıda Zehirlenmeleri

Gıda zehirlenmesi, WHO tarafından 'kontamine gıdanın ya da suyun tüketilmesiyle ortaya çıkan hastalık' olarak tanımlanmıştır. Dünyadaki en önemli hastalıklar arasında olan gıda zehirlenmelerinde bugüne kadar 250 farklı gıda zehirlenmesi keşfedilmiş ve bunların 2/3'sine bakterilerin neden olduğunu bildirilmiştir. Stafilokokal gıda zehirlenmesi gıdadaki stafilokokal enterotoksin varlığıyla ortaya çıkmaktadır (Le Loir ve ark 2003, Kumar ve ark 2009).

S. aureus birçok ülkede yaygın gıda zehirlenmesi olgularına neden olan ikinci veya üçüncü patojen olarak bilinmektedir. Stafilokokal intoksikasyonlar gıda kaynaklı diğer infeksiyon ve intoksikasyonlara göre kısmen hafif seyirli ve kısa inkübasyon süresi ile karakterize olup, bildirilen vakaların daha çok salgınlar şeklinde ortaya çıktığı, sadece birkaç vakanın sporadik özellik taşıdığı bildirilmiştir. Bu salgınların sıklıkla gıdada önceden oluşturulan ve sindirim sistemi üzerine etkili enterotoksinlerin alimenter yolla alınması sonucu meydana geldiği ifade edilmiştir (Normanno ve ark 2005, Morandi ve ark 2007).

İlk stafilokokal gıda zehirlenmesi 1884 yılında ABD’de görülmüştür. Cheddar peynirinin tüketiminden sonra çeşitli hastalık vakaları ortaya çıkmış ve analizler sonucunda peynir örneklerinden yüksek düzeyde stafilokok türleri izole edilmiştir (Küçükçetin ve Milci 2008).

Türkiye’de gıda zehirlenmeleri ile ilgili resmi raporlar yetersizdir. Ancak çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalarda, gıda zehirlenmesi vakalarının yaklaşık üçte birinin *S. aureus* enterotoksinleri ile kontamine gıdaların tüketilmesinden kaynaklandığı bildirilmektedir. Gıda kaynaklı mikrobiyolojik hastalıklar içinde *S. aureus* zehirlenme oranının ABD’de % 45, Japonya’da % 25-30 ve Macaristan’da % 40 düzeyinde olduğu tahmin edilmektedir (Küçükçetin ve Milci 2008). ABD’de stafilokokal gıda zehirlenmeleri sebebiyle her yıl 241.188 kişi hastalanmakta, 1.064 kişi hastanelik olmakta ve 6 kişi hayatını kaybetmektedir. Toplamda 1,5 milyar dolarlık ürün kaybı ve tedavi giderlerinin meydana geldiği belirtilmektedir (Küçükçetin ve Milci 2008, Bennet ve Hait 2012).

Süt ve süt ürünlerinden kaynaklanan stafilokokal gıda zehirlenmeleri ülkeden ülkeye farklılık göstermekte olup bu durumun, ülkelerin gıda tüketim alışkanlıklarının değişik olmasından ötürü olduğu bildirilmiştir (Le Loir ve ark 2003). İngiltere’de 1969-1990 yılları arasında tespit edilen stafilokokal gıda zehirlenmelerinin % 8’ini süt ürünleri oluşturmakta iken, ABD’de 1975-1982 yılları arasında stafilokokal gıda zehirlenmelerinin sadece % 1,4’ünün süt ürünlerinden kaynaklandığı tespit edilmiştir (Küçükçetin ve Milci 2008). Fransa’da ise 1999-2000 yılları arasında stafilokokal gıda zehirlenmelerinin % 32’sinin süt ürünlerinden ve özellikle Fransız halkının çok tükettiği peynirlerden kaynaklandığı bilinmektedir (Le Loir ve ark 2003).

Brezilya’da 1999 yılı şubat ve Mayıs aylarında iki tane gıda kaynaklı salgının meydana geldiği bildirilmiştir. İlk salgında 50 kişinin etkilendiği ve intoksikasyona ilişkin

semptomların (diyare, kusma, baş dönmesi, titreme ve baş ağrısı) kontamine peyniri tüketen kişilerde 2 saat içinde görüldüğü belirtilmiştir. İkinci salgında etkilenen 328 kişide kontamine çiğ süt tüketimine bağlı olarak diyare ve kusma görülmüştür. Yapılan mikrobiyolojik analizler sonucunda, peynirden *S. aureus* ve çiğ süttten koagulaz negatif stafilocokların izole edildiği ifade edilmiştir. Kontamine peynirde SEA, SEB ve SEC saptanırken, çiğ sütte SEC ve SED bulunmuştur. Bunun sonucunda, ilk salgından sorumlu tutulan peynirin gıda ile temas halinde olan kişiler tarafından kontamine edildiği, çiğ süttün kontaminasyonunda ise mastitisin rol oynadığı bildirilmiştir (Do Carmo ve ark 2002).

Japonyada 2000 yılında stafilokokal gıda intoksikasyonuna bağlı olarak büyük bir salgın meydana gelmiştir. Etkilenen 13.420 kişinin kontamine süt ürünleri tüketimi sonucu hastalandığı tespit edilmiştir. Yapılan araştırmalar, süt ürünlerinin kontaminasyonundan yağsız süt tozunun sorumlu olduğunu göstermiştir. Yağsız süt tozunda yaklaşık 3,7 ng/g SEA tespit edilmiştir. Tahmini alınan toksin miktarının 20-100 ng arasında olduğu belirtilmiştir. Yağsız süt tozunun üretimi sırasında 130 °C ısı işlemi uygulanmasına rağmen, SEA aktivitesini korumuştur (Asao ve ark 2003).

Avusturya'da 2007 yılında okullarda meydana gelen ve 1025 çocuğun etkilendiği 166 olgu tespit edilmiştir. Aynı işletmede bulunan ineklerden elde edilen pastörize süt, vanilyalı-kakaolu süt, yoğurt gibi ürünlerin okullara dağıtılmasından sonra abdominal kramp, kusma ve halsizlik semptomları meydana gelmiştir. Semptomların tespitinden sonra sabah yapılan süt dağıtımını öğleden sonra durdurulmuştur. Alınan örneklerden yapılan incelemeler sonucunda salgına enterotoksijenik karakterde *S. aureus*'un neden olduğu anlaşılmıştır (Schmid ve ark 2009).

Fransa'da 2009 yılında Ekim-Kasım ayları arasında 6 gıda kaynaklı salgın meydana gelmiştir. Salgınlardan pastörize edilmemiş süttten yapılan yumuşak bir peynir sorumlu tutulmuştur. Peyniri tüketen 26 kişiden 23'ünde mide bulantısı, kusma, ishal ve abdominal kramp semptomları ile bazı olgularda ateş meydana gelmiştir. Şüpheli örneklerden yapılan inceleme ile koagulaz pozitif stafilokok örneklerinden yapılan PCR işlemi sonucunda *S. aureus* ve *see* geni tespit edilmiştir. Salgından sorumlu toksin SEE olarak bulunmuştur (Ostyn ve ark 2010).

Beslenmemizde önemli yere sahip olan süttün tüm dünyada stafilokokal enterotoksinler tarafından ciddi anlamda kirletildiği Çizelge 1.3'te gösterilmiştir (Cretenet ve ark 2011).

Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi'nin (EFSA-European Food Safety Authority) çeşitli ülkelere ait Stafilokokal gıda zehirlenmesi kaynaklı salgınları Çizelge 1.4'te gösterilmiştir (EFSA 2013).

Çizelge 1.3. Dünyada SE dağılımı (Cretenet ve ark 2011).

Ülke	Yıl	Numune Sayısı	Besin Cinsi	SE Cinsi	Sütün Cinsi
Amerika	1884	Belirtilmemiş	Peynir	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş
Amerika	1958	200	Peynir	Belirtilmemiş	Çiğ
Amerika	1965	Belirtilmemiş	Peynir	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş
Kanada	1977	12	Peynir	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş
Kanada	1980	62	Lor	SEA ve SEC	Belirtilmemiş
Amerika	1981	16	Peynir	Belirtilmemiş	Pastörize Edilmiş
İngiltere	1983	2	Peynir	Belirtilmemiş	Pastörize Edilmiş
Fransa	1983	20	Peynir	SEA ve SED	Çiğ
İskoçya	1984	27	Peynir	SEA	Çiğ
İskoçya	1985	2	Keçi Sütü	Belirtilmemiş	Çiğ
Amerika	1985	860	Çikolatalı Süt	SEA	Pastörize Edilmiş
İsrail	1987	3	Keçi Sütü	SEB	Çiğ
İngiltere	1988	155	Peynir	Belirtilmemiş	Pastörize Edilmiş
Brezilya	1994	7	Peynir	SEH	Belirtilmemiş
Fransa	1997	140	Peynir	Belirtilmemiş	Çiğ
Fransa	1997	140	Peynir	Belirtilmemiş	Çiğ
Fransa	1998	62	Peynir	Belirtilmemiş	Çiğ
Fransa	1998	37	Yarı Sert Peynir	Belirtilmemiş	Çiğ
Japonya	2000	13420	Süt Tozu	SEA ve SEH	Belirtilmemiş
Fransa	2001	4	Yumuşak Peynir	SEA	Belirtilmemiş
Fransa	2001	46	Yarı Sert Peynir	SED	Çiğ
Fransa	2002	104	Koyun Sütünden Pey	SEA	Çiğ
Fransa	2009	23	Peynir	SEE	Pastörize Edilmiş

Çizelge 1.4. 2011 yılında Avrupa'daki Stafilkokkal Gıda Zehirlenmesi Kaynaklı Salgınlar (EFSA 2013).

Ülke	Toplam Salgın Sayısı	Ağır Seyreden Salgınlar				Zayıf Seyreden Salgınlar			
		Salgın Sayısı	Vaka	Hastanede tedavi görenler	Ölüm sayısı	Salgın Sayısı	Vaka	Hastanede tedavi görenler	Ölüm sayısı
Belçika	2	2	7	0	0	-	-	-	-
Bulgaristan	4	-	-	-	-	4	46	-	0
Danimarka	2	2	32	0	0	-	-	-	-
Fransa	290	9	77	8	0	281	2,106	166	1
Almanya	2	2	17	4	0	-	-	-	-
İtalya	4	-	-	-	-	4	89	-	-
Hollanda	1	-	-	-	-	1	2	0	0
Polonya	4	2	78	63	0	2	125	0	0
Portekiz	6	6	90	0	0	-	-	-	-
Romanya	3	3	32	32	0	-	-	-	-
Slovakya	1	-	-	-	-	1	9	0	0
İspanya	22	7	35	0	0	15	150	1	0
İsveç	2	1	8	0	0	1	2	1	0
İngiltere	1	1	18	3	0	-	-	-	-

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Bu çalışmada Eylül-Kasım 2014 arasında Muğla ili Milas ve Yatağan ilçelerine bağlı köylerde bulunan süt toplama tanklarından, sağımdan hemen sonra tanklara aktarılan sütlerden her tank için 50'şer ml olmak üzere alınan 96 adet çiğ süt örneği steril kaplarda soğuk zincir altında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin/Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı laboratuvarına getirilerek koagülaz pozitif *S. aureus* düzeyleri ve enterotoksinlerin varlığı yönünden incelendi.

2.2. Yöntem

2.2.1. Çiğ Süt Örneklerinden *S.aureus* İzolasyonu

Analizi yapılan çiğ süt örneklerinde *S. aureus* sayımı TSE 6582 ISO 6888 (2001) standardı çerçevesinde gerçekleştirildi. Numuneler, aseptik şartlarda stomacher torbalarına 10'ar ml olacak şekilde alınıp, üzerine 90 ml sterilfizyolojik peptonlu su (OXOID CM0009) ilave edilerek karıştırıcıda (Bag mixer, Interscience, France) 2 dakika boyunca homojenize edildi. Homojenize edilen örneklerden 10^{-2} 'ye kadar seri dilüsyonlar hazırlandı. Bu dilüsyonlardan Egg yolk-Tellurite Emulsion (OXOID SR0054C) içeren Baird Parkar Agar'a (OXOID CM275) yüzeyde yayma plak yöntemiyle inokulasyon yapıp, 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından etrafı şeffaf zonla çevrili, gri ve siyah renkli karakteristik koloniler *S. aureus* şüpheli koloniler olarak değerlendirildi. Şüpheli kolonilere gram boyama, DNaz testi, mannitol fermantasyonu, tüp koagülaz testi ve katalaz testi uygulandıktan sonra, pozitif sonuç veren kolonilere Dry Spot Staphylect Plus Test Kiti (OXOID DR0100) prosedürleri uygulanarak doğrulama yapıldı.

2.2.1.1. Gram Boyama

Stafilokok olduğu düşünülen ve saflaştırılan bakteriler Hucker's modifiye Gram boyama tekniği ile boyandı (Downes ve Ito 2001). Bu amaçla lam üzerinde % 0,9 NaCl içerisinde çözüldürülen bakteriler ateşte fikse edildikten sonra 1 dakika kristal viyole,

yıkamayı takiben 1 dakika iodine ve 15 saniyeyi geçmeyecek şekilde % 95 etanol ile muamele edildi. Kontur boyaması için 30 saniye safranin içerisinde bekletildi. Mikroskop altında 100x objektifte bakterilerin renkleri ve morfolojileri incelenmiş olup Gram pozitif (viyole renkte) ve tek ya da ikili veya üzüm salkımı morfolojisinde düzensiz kümelenmiş mikroorganizmalar stafilokok olarak tanımlandı.

2.2.1.2. DNaz Testi

S. aureus izolatları, DNaz enzimi üretmekte ve koloni etrafındaki DNA'yı yapısal birimleri olan nükleotidlerine parçalamaktadır. Bu amaçla öncelikle şüpheli koloniler DNaz agara (OXOID CM0321) öze yardımıyla geçildi ve 37°C'de, 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası petri yüzeyini kaplayacak biçimde, 1N HCl ilave edildi ve DNA'nın HCl ile muamelesi sonrası presipitasyon varlığı incelendi. Sonuç olarak DNA'nın mikroorganizmalar tarafından kullanılmayan bölgeleri mat, *S. aureus* tarafından bakteri DNaz enzimi sayesinde DNA'nın parçalandığı bölgelerde şeffaf zonlar gözlemlendi ve bu sonucu veren koloniler DNaz pozitif olarak değerlendirildi (Anonim 2008).

2.2.1.3. Katalaz Testi

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

2.2.1.4. Mannitol Fermentasyonu

BPA'da gelişen *S. aureus* izolatları Mannitol Salt Agar'a (OXOID CM0085) geçildi. Besiyerinin fenol kırmızısı renginin sarıya dönüşmesi mannitol fermentasyonu açısından pozitif olarak değerlendirildi (Muratoğlu 2010).

2.2.1.5. Tüp Koagülaz Testi

BPA'da üreyen *S. aureus* için şüpheli koloniler 10 ml Nutrient Broth (OXOID CM0001) içeren tüplere aktarıldı, 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 0,3 ml tavşan plazması içeren tüplere NB'da gelişen kültürden 0,1 ml inokule edildi ve 37°C'de inkübasyona bırakıldı. 4 saat sonra pıhtılaşma durumu kontrol edilip pıhtılaşmanın

gözlenmesi koagülaz testi yönünden pozitif olarak değerlendirildi (Koneman ve ark 2006).

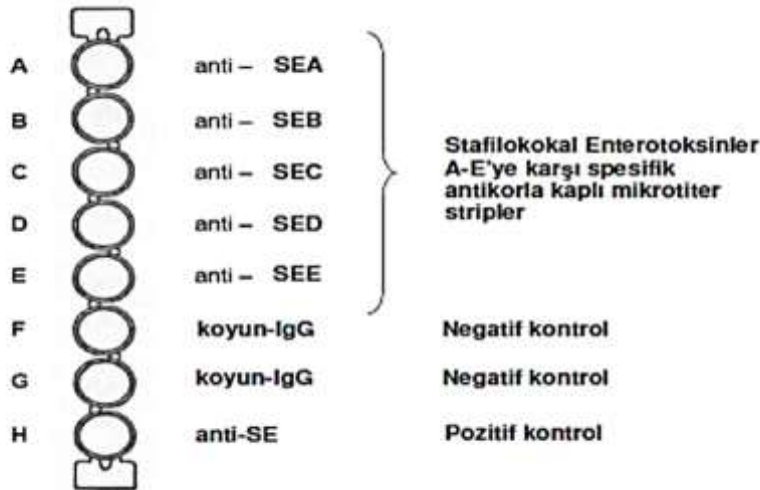
2.2.1.6. Dry Spot Staphytest Plus Testi

Dryspot staphytest plus testi (OXOID DR0100) ile stafilocokların clumping faktör, protein A ve kapsül polisakkaritlerinin ayırımı yapılmaktadır. Test kartının işaretli bölümüne bir damla serum fizyolojik üzerine bir öze dolusu şüpheli *S. aureus* konularak homojenizasyon sağlandı. Daha sonra homojenize sıvı test kartındaki reaksiyon bölümü ile muamele edildi ve 60-90 saniye sonra aglütinasyon (kümeleşme) görülmesi pozitif olarak değerlendirildi (Anonim 2008).

2.2.2.ELISA Tekniği ile Toksin Üretiminin Tespiti

Bu çalışmada SEA, SEB, SEC, SED ve SEE saptanması amacıyla Ridascreen Set A, B, C, D, E r-Biopharm (r-Biopharm AG, Darmstadt, Germany. Art. No.:R4101) ticari test kiti kullanılmıştır.

Her bir ELISA kiti 12 strip içermekte, şeritlerdeki ilk 5 kuyucukta (A-E) stafilocokkal 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).



Şekil 2.1. Ridascreen test kitinde bir mikrotiter strip düzeneği

Aseptik şartlarda alınan ve soğuk zincirde laboratuara getirilen çiğ süt numuneleri ticari kitin prosedüründe (r-Biopharm AG, Darmstadt, Germany. Art. No.:R4101) belirtilen şekilde hazırlanarak 10 °C'de 3500 g (g: gravity) devirde 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra yüzeyde oluşan süpernatant kısım dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Kit ve reaktifler kullanım öncesi oda sıcaklığına getirildikten sonra, her sribi bir izolat için kullanılan mikrotiter plağın A-G'ye kadar olan kuyucuklarına uzaklaştırma işleminin ardından kalan plazmadan 100 µl, H kuyucuğuna ise pozitif kontrolden 100 µl konulduktan sonra kuyucukların içindeki sıvıların iyice karışması sağlanıp 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda plaklar uygun şekilde boşaltılarak, kullanım talimatlarına uygun olarak hazırlanmış olan yıkama solüsyonundan her bir kuyucuğa 300 µl yıkama solüsyonu konularak yıkandı. Kuyucukların yıkama solüsyonu ile yıkanması işlemi 5 kez tekrar edildi ve her işlem sonrasında bu sıvı tamamen boşaltıldı. Yıkama yapılan kuyucukların üzerine 100 µl enzim konjugat 1 ilave edilip 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında tekrar kuyucuklardaki sıvılar boşaltılıp 5 kez yıkama işlemi gerçekleştirildi. Yıkama sonrasında kuyucuklara 100 µl enzim konjugat 2 ilave edildi ve 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Yine kuyucuklardaki sıvılar boşaltılıp 5 kez yıkama işlemi tekrar edildi. Yıkama yapılan kuyucuklara bu kez substrat-kromojen karışımından 100 µl ilave edilip 37 °C'de 15 dakika inkübasyonu takiben yıkama işlemi yapılmadan kuyucuklara 100 µl stop solüsyonu eklendi ve 30 dk içerisinde 450/650 nm absorbands değerinde ELISA cihazı okuyucusunda (ELISA Reader MINDRAY MR-96A) okuma işlemi gerçekleştirildi.

Her bir örnek için F ve G kuyucuklarında bulunan negatif kontrollerin Optik Dansite (OD) değerlerinin aritmetik ortalamasına 0,15 ekleyerek eşik değer belirlendi. Buna göre örneklerin OD değerleri eşik değerinin altında ise negatif, eşit veya üzerinde ise pozitif olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

Çalışmada Muğla ili Milas ilçesine bağlı köylerden 48, Yatağan ilçesine bağlı köylerden de 48 olmak üzere toplam 96 adet çiğ süt örneği koagülaz pozitif *S. aureus* sayıları ve stafilokokal enterotoksin (SEA, SAB, SEC, SED, SEE) yönünden incelenmiştir. Yatağan'dan alınan süt örneklerindeki *S. aureus* sayısı ortalama $1,87 \pm 1,95$ log kob/ml olarak belirlenirken 48 örneğin 24'ünden etken izole edilememiştir. Milas'tan alınan örneklerde *S. aureus* sayısı ortalama $1,93 \pm 1,84$ log kob/ml olarak bulunmuş, örneklerin 22'sinde mikroorganizma tespit edilememiştir (Çizelge 3.1). İncelenen toplam 96 örneğin hiçbirinde stafilokokal enterotoksin (SEA, SAB, SEC, SED, SEE) varlığı belirlenememiştir (Çizelge 3.2).

Yatağan'dan alınan 48 süt örneğinin 22 tanesi (% 45,83), Milas'tan alınan 48 süt örneğinin ise 25 tanesinin (% 52,08) Türk Gıda Kodeksi, 2009/14 Tebliğ numaralı, Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliğinde Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliğ'e göre *S. aureus* sayısı bakımından uygun olmadığı saptanmıştır.

Çizelge 3.1. İncelenen çiğ süt örneklerinde *S.aureus* sayısı (log kob/ml)

Bölge	n	<2	2≤ - <3	3≤ - <4	4≤ - <5	Ortalama	Standart Sapma
Yatağan	48	24	2	14	8	1,87	1,95
Milas	48	22	3	18	5	1,93	1,84

Çizelge 3.2. İncelen çiğ süt örneklerinde stafilokokal enterotoksin varlığı

BÖLGE			SEA		SEB		SEC		SED		SEE		EŞİK DEĞER	SONUÇ
	Kit	n	Min	Maks	Min	Maks	Min	Maks	Min	Maks	Min	Maks		
YATAĞAN	1	12	0.002	0.004	0.002	0.005	0.001	0.004	0.000	0.003	0.024	0.003	0.152-0.158	NEGATİF
	2	12	0.002	0.006	0.005	0.032	0.030	0.016	0.001	0.004	0.005	0.007	0.152-0.154	NEGATİF
	3	12	0.003	0.006	0.004	0.008	0.002	0.005	0.000	0.005	0.005	0.007	0.154-0.155	NEGATİF
	4	12	0.003	0.007	0.003	0.005	0.002	0.003	0.001	0.003	0.002	0.007	0.153-0.156	NEGATİF
MİLAS	5	12	0.004	0.006	0.005	0.009	0.003	0.004	0.001	0.004	0.005	0.036	0.153-0.155	NEGATİF
	6	12	0.000	0.003	0.003	0.005	0.000	0.003	0.000	0.002	0.002	0.008	0.153-0.164	NEGATİF
	7	12	0.002	0.007	0.003	0.006	0.002	0.003	0.001	0.003	0.002	0.049	0.154-0.155	NEGATİF
	8	12	0.002	0.005	0.005	0.006	0.001	0.003	0.002	0.003	0.004	0.025	0.153-0.155	NEGATİF

4. TARTIŞMA

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

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

Çalışmamızda Yatağan'dan alınan 48 örneğin 24'ünden (% 50), aynı şekilde Milas'tan alınan 48 örneğin ise 26'sından (% 54,16) olmak üzere toplam 96 adet çiğ süt örneğinin 50'sinden (% 52,08) farklı düzeylerde *S. aureus* izole edilmiştir.

Çiğ sütlerde *S. aureus* açısından yapılan çalışmalarda farklı izolasyon oranları bildirilmiştir. Jorgensen ve ark (2005) Norveç'te inek ve keçi sütleri ile içinde peynir örneklerinin de bulunduğu çiğ süttten yapılan ürünlerde enterotoksijenik *S. aureus* varlığını inceledikleri bir çalışmada inek sütlerinin % 75 düzeyinde *S. aureus* ile kontamine olduğunu bulmuşlardır. Normanno ve ark (2005) İtalya'da 2000-2002 yılları arasında yaptıkları bir araştırmada 437 adet çiğ süt örneğinden 168 (% 38,4) adedinin koagülaz pozitif *S. aureus* içerdiğini belirtmişlerdir. Nohutçu (2005) yaptığı çalışmada 190 adet çiğ süt örneğinden 55 (% 35) adet, Gündoğan ve ark (2006) da, 60 çiğ süt örneğinden 60 (% 100) adet *S. aureus* izole ettiklerini açıklamışlardır. Morandi ve ark (2007) izole ettikleri 112 adet *S. aureus*'un 86'sının çiğ sütlerden 26'sının çiğ sütlerden hazırlanan ürünlerden olduğunu bildirmişlerdir.

Rall ve ark (2008) da Brezilya'da yaptıkları çalışmada klasik kültürel metotlarla 54 çiğ süt örneğinden 38 adet (% 70) *S. aureus* izole etmişlerdir. Virgin ve ark (2009), yaptıkları çalışmada incelenen 542 süt örneğinin 218'inde (% 40,22) *S. aureus* olduğunu belirlemişlerdir. Diğer bir çalışmada Garcia ve ark (2009), İspanya'da 75 süt örneğinin hepsinde (% 100) *S. aureus* saptamışlardır. Yılmaz ve Gönülalan (2010), Kayseri ilinde yaptıkları çalışmada toplam 60 adet çiğ süt örneğinin 30'unun Türk Gıda Kodeksi 2000/6 Tebliğ numaralı, Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği'ne *S.aureus* sayısı yönünden uygun olmadığını bildirmişlerdir. Gönülalan ve Ertaş (2010) inceledikleri 100 süt örneğinin 60'ında (% 60) *Staphylococcus* spp. üremesi tespit etmişlerdir. İnceledikleri 300 izolata yaptıkları katalaz ve koagülaz testi ile izolatlardan 42'sinin (% 14) *S. aureus* olduğunu belirlemişlerdir.

Yapılan çalışmalar incelendiğinde genel olarak çiğ sütte yüksek oranlarda *S. aureus* izole edilebildiği görülmektedir. Çalışmamızda çiğ sütlerden % 52,08 oranında *S. aureus* izole edilmiş olması, örnek alınan köylerdeki süt tanklarındaki hijyen yetersizliği ve süütün temin edildiği hayvanlardaki meme hastalıklarıyla ilişkilendirilebilir.

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

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

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

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

Joffe ve Baranovics (2006) tarafından yürütölen çalışmanın sonucunda, Letonya’da marketlerde satışı sunulan süt ve süt ürünü örneklerinin % 44,1, mastitisli sütlerin % 25, çiğ süt örneklerinin ise % 22,5 düzeyinde *S. aureus* ile kontamine olduğu bulunmuştur. Enterotoksijenik *S. aureus*’un % 77,3 düzeyinde en çok mastitisli sütlerden izole edildiği ve izolatların en çok SEA ürettikleri belirtilmiştir. Sonuç olarak, mastitisin süt ve süt ürünlerinin enterotoksijenik *S. aureus* ile kontaminasyonunda önemli bir rol oynayabileceği ifade edilmektedir.

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

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

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

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

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

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

Çalışmamızda iki farklı ilçeye bağlı köylerden alınan toplam 96 adet çiğ süt örneğinin hiç birisinde stafilokokal enterotoksin varlığına rastlanmamıştır. Gıdalarda enterotoksijenik *S. aureus* bulunmasına rağmen zehirlenme yapacak düzeyde enterotoksin mevcut olmayabilmektedir. Diğer taraftan enterotoksin üretiminden sorumlu genlere sahip olan bir suş çeşitli faktörlere bağlı olarak tespit edilebilir düzeyde enterotoksin üretmeyebilmektedir (Muratoğlu 2010). Çalışmamızda *S. aureus* düzeyinin toksin oluşturabilecek sayıya ulaşmaması, örneklerinin sonbahar aylarında alınmış olması ve dolayısıyla mevsimsel sıcaklıkların düşük olması toksin tespit edilememesinin nedenleri arasında olduğu düşünülmektedir.

5. SONUÇ

Araştırmada, Muğla iline bağlı ilçelerden toplanan çiğ sütler, *S. aureus* ve enterotoksin varlığı yönünden incelenmiştir. Analiz edilen çiğ süt örneklerinin hiçbirinde Stafafilokokal enterotoksin bulunmamasına rağmen *S. aureus* sayıları bakımından halk sağlığı açısından risk oluşturabileceği düşünölmektedir.

Yetersiz hijyenik koşullar sebebi ile sütler *S. aureus* ile kontamine olmaktadır. Tüm dünyada önemli bir hayvansal gıda olan olan süt, Türkiye’de hala işleme tabi tutulmadan tüketiciye ulaştırılmaktadır. Sokak sütü ve açık pazarlarda satılan süt ürünlerinin tüketimi yaygın olarak devam etmektedir. Çiğ sütlerde hızla üreyen *S. aureus*’ların ürettikleri enterotoksinler sütün kalitesini ve hijyenini önemli ölçüde etkilemektedir. SE bulunduran sütlerin kaynatılması veya pastörize edilmesi, sütteki enterotoksinlerin ortadan kaldırılmasında etkili olmamaktadır.

Bütün bu bilgiler işığında, 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, işletmelerde çalışan personelin hijyenine ve eğitimine gerekli önemin verilmesinin sütte *S. aureus* üremesi ve enterotoksin oluşturma riskini en aza indirebileceği sonucuna varılmıştır.

ÖZET

Çiğ sütlerde *Staphylococcus aureus* ve stafilokokal enterotoksin varlığının belirlenmesi

Bu çalışmanın amacı çiğ sütlerde *Staphylococcus aureus* ve enterotoksininin varlığının incelenmesidir. Bu amaçla 2014 yılı Eylül-Kasım ayları arasında Muğla ili Yatağan ilçesine bağlı köylerden 48, Milas ilçesine bağlı köylerden de 48 olmak üzere toplam 96 adet çiğ süt örneği *S. aureus* sayıları ve stafilokokal enterotoksin (SEA, SEB, SEC, SED, SEE) varlığı yönünden incelenmiştir.

Analizi yapılan çiğ süt örneklerinde *S. aureus* sayımı TSE 6582 ISO 6888 standardı çerçevesinde gerçekleştirilmiştir. Analizler sonucunda Yatağan'dan alınan 48 süt örneğinin 24'ünden (% 50) ortalama $1,87 \pm 1,95$ log kob/ml, Milas'tan alınan 48 örneğin ise 26'sinden (% 54,16) ortalama $1,93 \pm 1,84$ log kob/ml düzeyinde *S. aureus* saptanmıştır. Toplam 96 adet çiğ süt örneğinin 50'sinden (% 52,08) farklı düzeylerde *S. aureus* izole edilmiştir. İncelenen 96 adet çiğ süt örneklerinden 47 adedinin *S. aureus* sayısı yönünden Türk Gıda Kodeksi, 2009/14 Tebliğ numaralı, Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliğinde Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliğ'e uygun olmadığı belirlenmiştir.

Bu çalışmada stafilokokal enterotoksin varlığının saptanması amacıyla ELISA yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem Ridascreen Set A, B, C, D, E r-Biopharm (r-Biopharm AG, Darmstadt, Germany. Art. No: R4101) ticari test kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Test sonucunda 96 adet çiğ süt örneğinin hiçbirinde stafilokokal enterotoksin varlığı (SEA, SEB, SEC, SED, SEE) belirlenmemiştir.

Sonuç olarak incelenen çiğ sütlerde enterotoksin tespit edilmemiş olmakla birlikte *S. aureus* varlığı nedeniyle halk sağlığı açısından risk oluşturabileceğini göstermiştir. Bu sebepten süt üretiminde başta meme sağlığı olmak üzere sağım hijyeni, sağım ekipmanlarının temizliği ve üreticilerin bilgilendirilmesi konularına önem verilmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Çiğ Süt, *Staphylococcus aureus*, Stafilokokal Enterotoksin, ELISA

SUMMARY

Detection of *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxins in Raw Milk Samples

The purpose of this study is the investigation of the presence of *Staphylococcus aureus* and enterotoxin in raw milk. For this reason we examined 96 raw milk samples (48 of them were collected from village located around Yatağan district of Mugla province and others from Milas district between September and November 2014) for *S. aureus* count and staphylococcal enterotoxins (SEA, SEB, SEC, SED, SEE).

S. aureus analyses in raw milk samples were conducted within the framework of TSE 6582 ISO 6888 standard. As a result of analysis, 24 of the 48 milk samples (50%) from Yatağan with a mean of 1.87 ± 1.95 log cfu/ml *S. aureus* and 26 samples (54.16%) from Milas with a mean of 1.93 ± 1.84 log cfu/ml *S. aureus* were determined. *S. aureus* was isolated at different levels from 50 (52.08%) of total raw milk samples. According to Turkish Food Codex (Number: 2009/14) 47 samples of 96 total raw milk examined were determined to be inappropriate in terms of *S. aureus* count.

In this study ELISA test used for the presence of staphylococcal enterotoxins. This method was performed by Ridascreen Set A, B, C, D, E r-Biopharm (r-Biopharm AG, Darmstadt, Germany. Art. No: R4101) commercial test kit. The result of test, neither of 96 raw milk samples was contaminated with staphylococcal enterotoxin (SEA, SEB, SEC, SED, SEE).

In conclusion, although no enterotoxins were identified in any of the milk samples, considering public health *S. aureus* presence might be a great problem if preservation procedures are not applied properly. Therefore in the production of milk, udder health hygiene, milking equipment hygiene and improving workers knowledge about milking and hygiene procedures are very important.

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

KAYNAKLAR

- Adams MR, Moss MO. *Staphylococcus aureus*. In: Adams MR, Moss MO (Eds). Food Microbiology. 3rd edition. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2008. p. 252-256.
- Akan M. Staphylococcus infeksiyonları. In: N. Aydın, J. Paracıkoğlu (Eds). Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). Ankara: İlke-Emek Yayınları; 2006. p. Bölüm 2.
- Aktaş A. Dermatofitoz şüpheli köpeklerde *Staphylococcus aureus*'un rolü. Yüksek Lisans Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın, Türkiye. 2014.
- Aktaş F. Stafilokokal enfeksiyonlar. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ders Notları. 2006.
- Aitichoua M, Henkensb R, Sultanac AM, Ulrichc RG, Ibrahime MS. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A and B genes with PCR-EIA and ahand-held electrochemical sensor. Molecular and Cellular Probes 2004;18: 373–377.
- Anonim. Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği 2000/6.2000.
- Anonim The Oxoid Manual. Compiled by E.Y.Bridson, Unipath Ltd. Hampshire. 2008.
- Anonim. Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliğinde Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliğ 2009/14.2009.
- Arbuthnott JP, Coleman DC, De Azavedo JS. Staphylococcal Toxins In Human Disease. Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement 1990; 101-107.
- Arda M, Minbay A, Aydın N. Özel Mikrobiyoloji. Ankara Ankara Üniversitesi Basımevi; 1982; 96-106.
- Asao T, Kumeda Y, Kawai T, Shibata T, Oda H, Haruki K, Nakazawa H, Kozaki S. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: Estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. Epidemiology & Infection 2003; 130: 33-40.
- Ayar A, Demirulus H. Eğitim Çağındaki Gençlerin Süt Ve Süt Ürünleri Tüketim Alışkanlıklarının Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma Gıda, 2000; 25(5): 371-376.

- Baysal A. Beslenme. Bölüm 2 Besinler, Süt. 10. Baskı, Ankara, Hatiboğlu Yayınları. 2004; 268-275.
- Balaban N, RAsooly A, Staphylococcal enterotoxins. International Journal of Food Microbiology 2000; 61: 1-10.
- Belay N, Rasooly A. *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin A production in anaerobic environment. J Food Prot 2002; 65: 199-204.
- Bennet RW, Hait J. *S. aureus*. İçinde Lampel, K.A (Ed.). Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. (2nd ed.). 2012. <http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/CausesOfIllnessBadBugBook>.
Erişim Tarihi: 01.07.2015.
- Besler H, Ünal S. Ankara'da satılan sokak sütlerinin bazı vitaminler açısından değerlendirilmesi ve ev koşullarında uygulanan kaynatmanın süreye bağlı olarak vitaminlere olan etkisi. IV Uluslararası Beslenme ve Diyetetik Kongresi Bildiri Kitabı. 2006.
- Bhatia A, Zahoor S. Staphylococcus aureus enterotoxins: A review. Journal of Clinical and Diagnostic Research 2007; 1(2): 188-197.
- Bhunja A. K. *Staphylococcus aureus*. In: Foodborne Microbial Pathogens, mechanisms and pathogenesis. Springer New York, 2008; 125-134.
- Bilgehan H. Klinik Mikrobiyoloji, Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. 10. Baskı. İzmir: Barış Yayınları, Fakülteler Kitapevi; 2000.
- Black RE, Williams SM, Jones IE, Goulding A. Children who avoid drinking cow milk have low dietary calcium intakes and poor bone health. American Journal of Clinical Nutrition 2002; 76: 675–680.
- Boynukara B, Gulhan T, Alişarlı M, Gurturk K, Solmaz H. Classical enterotoxigenic characteristic of *Staphylococcus aureus* strain isolated from bovine subclinical mastitis in Van, Turkey International Journal of Food Microbiology 2008; 125: 209-211.
- Bremer PJ, Fletcher GC, Osborne C. *Staphylococcus aureus*. New Zealand Institute for Crop & Food Research Limited Private Bag 4704, Christchurch, New Zealand, 2004; 29 (8): 640-653.
- Brett MM. Kits for detection of food poisoning toxins produced by *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. Methods in Biochemistry 2006; 21(1): 91-98.

- Cauwelier B, Gordts B, Descheemaeker P, Van Landuyt H. Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin (30 microg) for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2004; 23(5): 389-92.
- Cengiz AT, *Staphylococcus*. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara Güneş Kitabevi. 1999; 339-346.
- Chambers HF. Methicillin resistance in *Staphylococci*: Molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clinical Microbiology Reviews* 1997; 10(4): 781-91.
- Cottagnoud P. Cellular and molecular aspects of drugs of the future, 2002
- Cremonesi P, Vimercati C, Pisoni G, Castiglioni B, Luzzana M, and Ruffo G. Identification of enterotoxin genes *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and caprine milk. *Veterinary Research Communications* 2006; 30: 41-243.
- Cretenet M, Even S, Le Loir Y. Unveiling *Staphylococcus aureus* enterotoxin production in dairy products: a review of recent advances to face new challenges. *Dairy Science & Technology* 2011; 91: 127-150.
- Çakır P. Gıda ve insan kaynaklı *Staphylococcus aureus* strainlerinin karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir Türkiye. 2007.
- Çırak MY. Enzyme linked Immunosorbent assay sistemleri. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri* 1999; 19: 242-248.
- Derbentli Ş. Stafilokoklarda antibiyotik direnci. *Antibiyotik ve Kemoterapi dergisi* 2005; 19: 54-60.
- Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Enterotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbial Reviews* 2000; 13 (1): 16–34.
- Do Carmo LS, Dias RS, Lınardı VR, De Sena MJ, Dos Santos DA, De Faria ME, Pena EC, Jett M, Heneine LG. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiology* 2002; 19: 9-14.
- Downes FP, Ito K. (eds). *Compendium methods for the microbiological examination of foods* Washington D.C, 4, APHA (American Public Health Association).2001.

- Ekici L, Telli R, Yetim H, Gıda kaynaklı enfeksiyon ve İntoksikasyon bakterileri-1. Gıda teknolojileri elektronik dergisi 2008; 2: 29-42.
- Erol İ. *Staphylococcus aureus*. İçinde: Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi kitabı, Ed. Erol İ, Ankara, ISBN 978-975-00131-0-9, 2007.
- Erol İ, İşeri Ö. Stafilokokal Enterotoksinler Ankara Üniversitesi Veteriner fakültesi dergisi 2004; 51: 239-245.
- EFSA. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. European Food Safety Authority Journal 2013;11(4): 226-229.
- Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Staphylococcus, Micrococcus* and Similar Organisms: Bailey and Scott s Diagnostic Microbiology. 12th Ed. USA: Mosby. 2007; 254-263.
- Fox PF, McWeeney PLH. Advanced Dairy Chemistry. Volume 1. In Chapter 1: Milk Proteins: General and Historical Aspects. Third Edition. Part A, Springer Verlag Publish. New York. 2003.
- Fujikawa H, Morozumi S. Modeling *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in milk. Food Microbiology 2006; 23: 260–267.
- Garcia P, Madera C, Martinez B, Rodriguez A, Suarez JE. Prevalance of bacteriophages infecting *Staphylococcus aureus* in dairy samples and their potential as biocontrol agents. Journal of Dairy Science 2009; 92(7): 3019-3026.
- Gilbert, R.J, Wieneke, A.A. Comparision of four methods for the detection of staphylococcal enterotoxin in foods from outbreaks of food poisoning. International Journal of Food Microbiology 1987; 4: 135-143.
- Gran HM, Wetlesen A, Mutukumira AN, Rukure G, Narvhus CA. Occurrence of pathogenic bacteria in raw milk, cultured pasteurized milk and naturally soured milk produced at small-scale dairies in Zimbabwe. Food Control 2003; 14: 539-544.
- Gönç S, Oysun G, Ergüllü E. Süt Üretiminde Sorunlar ve Destekleme Politikaları, Türkiye 5. Sütçülük Kongresi, 1993.
- Gönülalan Z, Ertaş N, Kayseri İlinde Satılan Çiğ Sütlerde *Staphylococcus aureus* ve Enterotoksinlerinin Varlığı Üzerine Araştırmalar. Sağlık bilimleri dergisi 2010; 24(1): 11-15.

- Gülbandılar A. Kütahya yöresinde çeşitli kaynaklardan elde edilen *Staphylococcus aureus* izolatlarının karakterizasyonu, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. 2006.
- Gündoğan N, Çitak S, Turan E. Slime production, Dnase Activity and Antibiotic Resistance of *Staphylococcus aureus* Isolated from Raw Milk, Pasteurised Milk and Ice Cream Samples, Food Control 2006; 17: 389-392.
- Halpin-Dohnalek MI, Marth EH. *Staphylococcus aureus*, Production of extracellular compounds and behavior in foods A review. Journal of Food Protection 1989; 52: 267-282.
- Iwatsuki K, Yamasaki O, Morizane S, Oono T. Staphylococcal Cutaneous Infections: Invasion, Evasion and Aggression. Journal of Dermatological Science 2006; 42: 203-214.
- İnal T. Süt ve Süt Ürünleri Hijyen ve Teknolojisi. İstanbul Final Ofset A.Ş. 1990.s. 34-59.
- Jablonski LM, Bohach MP Doyle, LR Beuchat, TJ Montville (Eds), ASM Press, Washington DC, *Staphylococcus aureus*, In Food Microbiology Fundamentals and Frontiers 1997; 353-375.
- Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. Staphylococcal Gastroenteritis. In: Modern Food Microbiology, Seventh Edition, USA, ISBN 0-387-23180-3, 2005.
- Joffe R, Baranovics E. Bovine mastitis as the primary contamination source of milk and milk products with *S. aureus* enterotoxins. Veterinarija ir Zootechnika 2006; 36(58): 21-26.
- Jorgensen HJ, Mork T, Hogasen HR, Rorvik LM. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk Norway. Journal of Applied Microbiology 2005; 99: 158-166.
- Kalkan S, Halkman K. Bacillus Cereus ve İçme Sütünde Oluşturduğu Sorunlar. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi 2006; 4(1): 1-11
- Katsuhiko Omoe, Machiko Ishikawa, Yu Shimoda, Dong-Liang Hu, Shigeo Ueda, Kunihiro Shinagawa. Detection of seg, seh, and sei genes in *Staphylococcus aureus* Isolates and Determination of the Enterotoxin Productivities of *S. Aureus* Isolates Harboring seg, seh, or sei Genes journal of clinical microbiology, mar. 2002; 857-862
- Kılıç S. Hindi etlerinden izole edilen koagulaz pozitif Stafilokokların enterotoksin oluşturma yeteneklerinin EIA (Enzyme Immuno Assay) yöntemiyle belirlenmesi. Yükek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye. 2007.

Kınık Ö, Gönç S, Akalın S. Çiğ Sütte Patojen Mikroorganizmalar. Uluslar arası Sütçülük Federasyonu (IDF) Yayını. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları. İzmir. 1998; 527-284.

Koneman EW, Winn WC, Allen SD, Janda WM, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL. Medical Bacteriology: Taxonomy, Morphology, Physiology, and Virulence; Staphylococci and Related Gram- Positive Cocci. In: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th Ed. USA: Lippincott Williams and Wilkins, 2006; 167-207, 624-662.

Köşker Ö, Tunail N. Süt ve Mamulleri Mikrobiyolojisi ve Hijyeni Uygulama Klavuzu. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi. Yay. No: 985, Uygulama Kılavuzu No:217, Ankara. 1985.

Kumar TDK, Muralı HS, Batra HV. Simultaneous detection of pathojenic *B. cereus*, *S. aureus* and *L. Monocytogenes* by multiplex PCR. Indian Journal of Microbiology 2009; 49: 283-289.

Küçükçetin A, Milci S. *Staphylococcus aureus* ile Kontamine Olan Peynirlerden Kaynaklanan Gıda Zehirlenmeleri. Gıda 2008; 33 (3): 129-135.

Küplülü Ö, Sarımehtemoğlu B, Kaymaz Ş. Pastörize sütlerde Elisa tekniği ile stafilokokal enterotoksin varlığının belirlenmesi. Turkish Journal of Veterinary & Animal Science 2002; 26: 631-637.

Lamprell H, Villard L, Chamba JF, Beuvier E, Borges E, Maurin F, Mazerolles G, Noel Y, Kodjo A. Identification and biotyping of coagulase positive staphylococci (CPS) in ripened French raw milk cheeses and their in vitro ability to produce enterotoxins. Revue de Medecine Veterinaire 2004; 155(2): 92-96.

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

Letertle C, Perelle S, Dilasser F, Fach P. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the egc cluster of *Staphylococcus aureus*, Journal of Applied Microbiology 2003; 95: 38-43.

Majjala K. Cow milk and human development and well-being. Livestock Production Science 2000; 65: 1-18.

Metin M. Süt Teknolojisi: Sütün Bileşimi ve İşlenmesi. 3. Baskı, E.Ü. Mühendislik Fakültesi Yayınları, İzmir, 2001; 793s

Miller GD, Jarvis KJ, McBean LD. Handbook of Dairy Foods and Nutrition. The Importance of Milk and Milk Products in the Diet. Ed: Jensen RG, Kroger M. New York: CRC Press; 2000; 4-24.

Morandi, S., Brasca, M., Lodi, R., Cremonesi, P., Castiglioni, B. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. *Veterinary Microbiology* 2007; 124: 66-72.

Muratoğlu K. Gıdalaradan izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının toksijenik özellikleri ve antibiyotiklere duyarlılıkları üzerine bir araştırma. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye. 2010.

Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller PA. Medical Microbiology; 4th ed. Philadelphia: Elsevier. 2005; 203–212, 221–236.

Nassasra GIA. Sütlerde bulunan metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'un PCR yöntemiyle ile tespit edilmesi ve SCCmec tiplendirilmesi. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye. 2011.

Nohutçu Y. Çiğ Süt ve peynir örneklerinden *Staphylococcus*'ların izolasyonu ve antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye. 2005.

Normanno G, Firinu A, Virgilio S, Mula G, Dambrosio A, Poggiu A, Decastelli L, Mioni R, Scuola S, Bolzoni G, Di Giannatale E, Salinetti A.P, La Salandra G, Bartoli M, Zuccon F, Pirino T, Sias S, Parisi A, Quaglia M.C, Celano G.V. Coagulase-positive *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *Journal of Food microbiology* 2005; 98: 73-79

Notermans S, Timmermans P, Nagel J. Interaction of staphylococcal protein A in enzyme-linked immunosorbent assays for detecting staphylococcal antigens. *Journal of Immunological Methods* 1982; 55: 35-41.

Oliver SP, Jayarao BM, Almeida RA. Foodborne pathogen mastitis milk quality and dairy food safety. NMC Annual Meeting Proceedings; 2005; 1-26.

Ostyn A, De buyser ML, Guillier F, Groult J, Felix B, Salah S, Delmas G, Hennekinne JA. First evidence of a food poisoning outbreak due to staphylococcal enterotoxin type E, France, *Eurosurveillance* 2010; 15(13): 19528.

Örmeci Kart MÇ, Demircan V. Dünyada ve Türkiye’de Süt ve Süt Ürünleri Üretimi, Tüketimi ve Ticaretindeki Gelişmeler. Akademik Gıda 2014; 12(1): 78-96

Park YH, Lee SU, Ferens WA, Samuels S, Davis WC, Fox LK, Ahn JS, Seo KS, Chang BS, Hwang SY, Bohach GA. Unique features of bovine lymphocytes exposed to a staphylococcal enterotoxin. Journal of Veterinary Science 2006; 7: 233–239.

Plano LRW. *Staphylococcus aureus* Exfoliative Toxins: How they Cause Disease. The Journal of Investigative Dermatology 2004; 122: 1070–1077.

Rall VLM, Vieira FP, Rall R, Vieitis RL, Fernandes A, Candeias JMG, Cardoso KFG, Araujo JP. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. Veterinary Microbiology 2008; 132,408-413.

Rosec JP, Guiraud JP, Dalet J, Richard N. Enterotoxin production by *Staphylococci* isolated from foods in France. Food Microbiology 1997;35: 213-221.

Sancak YC, Alişarlı M, Akkaya L. Otlu Peynirlerde Enterotoksijenik *Staphylococcus aureus* Suşları ve Enterotoksin Varlığı Üzerine Bir Araştırma. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Dergisi 2006; 9(1): 218-225.

Schleifer KH, Bell JA. Family VIII. Staphylococcaceae fam. nov. In William B. Whitman ed. Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology Second Edition Volume 3 The Firmicutes. Dordrecht, Heidelberg, London, New York: Springer, 2009: 392-401

Schmid D, Fretz R, Winter P, Mann M, Haeger G, Staeger A, Ruppitsch W, Ladstaetter J, Mayer N, De Martin A, Allerberger F. Outbreak of staphylococcal food intoxication after consumption of pasteurized milk products, June 2007, Austria. Wiener Klinische Wochenschrift 2009; 121: 125-131.

Seo KS, Bohach GA. Foodborne Pathogenic Bacteria. *Staphylococcus aureus*. In: Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Third Edition. Ed: Doyle, M.P. Beuchat, L.R. Washington: ASM Press. 2007; 493-518.

Soejima T, Nagao E, Kubota T, Yamagata H, Kagi H. Comparison between ultrafiltration and trichloroacetic acid precipitation method for concentration of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in dairy samples. International Journal of Food microbiology 2004; 93: 185-194.

Soejima T, Nagao E, Yano Y, Yamagata H, Kag H, Shinagawa K. Risk evaluation for staphylococcal food poisoning in processed milk produced with skim milk powder. International Journal of Food Microbiology 2007; 115: 29-34.

Sutherland J, Varnam A, Enterotoxin-producing *Staphylococcus*, *Shigella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Aeromonas* and *Plesiomonas* In: CW Blackburn, PJ McClure (Eds), Foodborne Pathogens. CRC press, Washington, DC. 2002; 384-415

Su YC, Wong ACL. Current perspectives on detection of staphylococcal enterotoxins. Journal of Food Protection 1997; 60 (2): 195-202

Süt Konseyi. Ulusal Süt Konseyi Dünya ve Türkiyedeki süt istatistikler. 2013.

Tan S, Ertürk YE. Peynir. Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü dergisi, Sayı 1, Ankara. 2002.

Tekinşen C. Süt Ürünleri Teknolojisi. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Konya, 1996.

Tekinşen OC, Nizamlıoğlu M. Süt Kimyası. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Konya. 2001.

Tremaine MT, Brockman DK, Betley MJ, Staphylococcal enterotoxin A gene (sea) expression is not affected by the accessory gene regulator (agr). Infect Immun 1993; 61: 356-359.

TSE 6582-1 EN ISO 6888-1A. Gıda ve hayvan yemlerinin-mikrobiyolojisi-koagülaz-pozitif stafilkokların (*Staphylococcus aureus* ve diğer türler) sayımı için yatay metot-bölüm 1: baırd-parker agar besiyeri kullanarak. 2001.

Tunail N. *Staphylococcus aureus*. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Genişletilmiş 2. Baskı. Ankara: Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını. Sim Matbaası; 2000; 3(2): 522.

Tükel Ç, Doğan HB. *Staphylococcus aureus*. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ankara: Sim Matbaacılık; 2000; 357-366.

Tünger A. *Staphylococcus aureus*: Mikrobiyoloji, Patogenez ve Epidemiyoloji. Ulusoy S, Usluer G, Unal S. Gram-Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2004; 9-68.

Uğur M, Nazlı B, Bostan K. Gıda Hijyeni, Teknik Yayınevi, 2001; 52-55.

Umoh VT, Adesiyun AA, Gomwalk NE. Antibioqram of staphylococcalstrain isolated from milk and milkproducts. Journal of Veterinary Medicine 1990; 37: 701-706.

Üçüncü M. Süt ve Mamülleri Teknolojisi Ders Kitabı. Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü. İzmir, 2005.

Üçüncü M. A'dan Z'ye Peynir Teknolojisi. Cilt I, Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, İzmir, 2008; 543s.

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

Valsangiacomo C, Dolina M, Peduzzi R, Jaggli M. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from hospitalized patients and dairy food (fresh cheese): a survey over a decade in southern Switzerland: Clinical Microbiology and Infection 2000; 6: 7.

Virgin JE, Van Slyke TM, Lombard JE, Zadoks RN. Short communication: Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* detection in US bulk tank milk. Journal of Dairy Science 2009; 92(10): 4988-4991.

Walstra P, Jenness R. Dairy Chemistry and Physics. Wiley Interscience Publication. New York. 1984; 467p.

Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6th Ed. Lippincott Williams and Wilkins. Baltimore, MD, USA. 2006.

Wisell, KT. Regulation of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. Karolinska University Press, Sweden. 2000.

Yetişmeyen A. Süt Teknolojisi. A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları, Yayın No:1482 Ankara. 1997;229s.

Yılmaz S, Gönülalan Z. Kayseri bölgesinde tüketime sunulan çiğ sütlerde *Staphylococcus aureus* ve enterotoksin varlığının araştırılması. Sağlık bilimleri dergisi 2010; 19(1): 26-33.

Zhang S, Iandolo JJ, Stewart GC. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). FEMS Microbiology Letters 1998; 168: 227-233.

ÖZGEÇMİŞ

2 Ocak 1989 yılında Diyarbakır'da doğdum. İlköğretimimi Mehmet Akif Ersoy İlköğretim Okunda, ortaöğretimimi Atatürk Ortaokunda, lise öğretimimi Yatağan Lisesi'nde tamamladım. 2007 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesini kazandım ve 2012 yılında mezun oldum. Aynı yıl Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalında yüksek lisansa başladım. 2013 yılından bu yana Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı bünyesinde veteriner hekim olarak çalışmaktayım.

TEŐEKKÖR

Tezimin fikir aŐamasından sonuÇ aŐamasına kadar bilgisini ve desteğini benden esirgemeyen, başta danıŐmanım Yrd. DoÇ. Dr. Devrim BEYAZ olmak üzere, tÖm Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı öğretim üye ve yardımcılara, hayatımın her döneminde maddi ve manevi destekleriyle beni buralara getiren aileme ve her daim yanımda olarak desteğini esirgemeyen sevgili eŐim Melih DUYUK'a sonsuz teŐekkÖrlerimi sunarım.