

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI SÜRE VE SICAKLIKLARDA MUHAFAZA EDİLEN  
ÇİĞ SÜTLERDE KOAGULAZ POZİTİF *STAPHYLOCOCCUS*  
TÜRLERİNİN DAĞILIMI VE STAFİLOKOKAL  
ENTEROTOKSİN OLUŞUMU**

**Mustafa İNAL**

**DOKTORA TEZİ**

BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

**Danışman**

**Prof. Dr. Gürkan UÇAR**

KONYA-2014

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI SÜRE VE SICAKLIKLARDA MUHAFAZA EDİLEN  
ÇİĞ SÜTLERDE KOAGULAZ POZİTİF *STAPHYLOCOCCUS*  
TÜRLERİNİN DAĞILIMI VE STAFİLOKOKAL  
ENTEROTOKSİN OLUŞUMU**

**Mustafa İNAL**

**DOKTORA TEZİ**

BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

**Danışman**

**Prof. Dr. Gürkan UÇAR**

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 13202009 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2014

## ONAY SAYFASI

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Mustafa İNAL tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Yusuf DOĞRUER

İmza.....

Danışman : Prof. Dr. Gürkan UÇAR

İmza.....

Üye : Prof. Dr. Ahmet GÜNER

İmza.....

Üye : Doç. Dr. K. Kaan TEKİNŞEN

İmza.....

Üye : Doç. Dr. Tolga KAHRAMAN

İmza.....

ONAY :

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu ..... tarih ve ..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

İmza

Prof. Dr. Hasan Hüseyin DÖNMEZ

Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

Süt, organizmanın gelişimi ve yaşamının devamı için gerekli olan besin unsurlarının çoğunu ihtiva etmesi sebebiyle ideal bir besin olarak kabul edilmektedir. Bu sebeple süt ve ürünleri, tüm insanların özellikle de çocukların beslenmesinde önemli bir yere sahiptir.

Mikroorganizmaların üremesi için ideal bir besin ortamı olan süt ve ürünleri, üretimden tüketime kadar uzanan geniş bir yelpaze içerisinde gerekli tedbirler alınmadığı zaman insan sağlığı için ciddi bir risk oluşturabilmektedir. Süt ve ürünlerinin kaliteli ve güvenilir olması, tüketicinin doğal hakkı ve talebidir. Dolayısıyla söz konusu potansiyel tehlikeleri ortadan kaldırmak için üretimden tüketime kadar geçen tüm aşamalar, hem ürün kalitesi hem de sağlık açısından son derece önem taşımaktadır.

Meme hastalıkları başta olmak üzere hayvanın sağlık durumu, sağım koşulları, çiğ sütün depolama/paketleme ve soğukta muhafaza koşulları, çalışan personelin sağlık kontrollerinin düzeni ve eğitim durumları, işletmenin temel hijyen uygulamaları ve çevresel etkenler gibi ürün güvenliği ve kalitesini doğrudan ya da dolaylı olarak etkileyebilecek tüm faktörler, sütün enterotoksijenik stafilokoklarla kontamine olmasında ve stafilokokal enterotoksin oluşumunda etkili olabilmektedir. Kontrolsüz ve kötü üretim koşulları altında elde edilen çiğ sütün enterotoksijenik stafilokoklarla kontaminasyonu kaçınılmaz hale gelmektedir. Bu durum stafilokokal intoksikasyonlara sebep olmaktadır.

Bu araştırmanın yapılmasında yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı öğretim üyesi danışman hocam Prof. Dr. Gürkan UÇAR'a, teşvik ve uyarıları ile beni yönlendirerek bilgi ve birikimlerini aktaran bölümdeki öğretim üyesi tüm hocalarıma ve finansal desteklerinden dolayı Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>Sayfa No</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR.....</b>	<b>v</b>
<b>ÇİZELGE LİSTESİ.....</b>	<b>vii</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ.....</b>	<b>viii</b>
<b>1.GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1. Dünyada ve Türkiye'de Stafilokokal İntoksikasyonlar .....	2
1.2. Tarihçe.....	4
1.3. Stafilokokal İntoksikasyonlara Genel Bakış.....	4
1.4. Stafilokokların Doğada Bulunuşu .....	5
1.5. Stafilokokal Kontaminasyon Kaynakları .....	6
1.6. Gıda Grupları ve Stafilokokal İntoksikasyonlar .....	8
1.7. Stafilokokların Klasifikasyonu ve Genel Özellikleri .....	10
1.7.1. Hücre Yapısı .....	14
1.7.2. Virulans ve Patojenite Faktörleri .....	14
1.7.3. Hücre Duvarı.....	15
1.7.4. Kapsül.....	16
1.7.5. Yüzey Proteinleri.....	16
1.7.6. Biyofilm Oluşturma.....	16
1.7.7. Antibiyotik Direnci.....	17
1.7.8. Stafilokokal Enzimler .....	19
1.7.9. Stafilokokal Toksinler .....	24
1.7.10. Stafilokokal Enterotoksinler .....	29
1.8. Vitek-2 Compact Sistem.....	38
1.9. Enterotoksin Analizleri.....	41
1.9.1. Vidas Sistemi ve Vidas Staph Enterotoxin 2 .....	41
<b>2. GEREÇ ve YÖNTEM.....</b>	<b>45</b>
2.1. Gereç .....	45
2.2. Yöntem .....	47
2.3. İstatistiksel Değerlendirme .....	47
2.4. Mikrobiyolojik Analizler .....	48
2.4.1. Koagülaz Pozitif Stafilokok Sayımı.....	48
2.4.2. Vitek-2 Compact İdentifikasyon İşlemleri .....	50
2.4.3. Stafilokokal Enterotoksin Analizi .....	51
2.4.4. Koloni Sayım Tekniğiyle 30°C'de Mikroorganizma Sayımı .....	53

2.4.5. Somatik Hücre Sayımı.....	56
<b>3. BULGULAR.....</b>	<b>58</b>
<b>4. TARTIŞMA.....</b>	<b>68</b>
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>79</b>
<b>6. ÖZET.....</b>	<b>81</b>
<b>7. SUMMARY.....</b>	<b>82</b>
<b>8. KAYNAKLAR.....</b>	<b>83</b>
<b>9. EKLER</b>	
<b>Ek-A Etik Kurul Kararı.....</b>	<b>96</b>
<b>10.ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>97</b>

## SİMGELER ve KISALTMALAR

Agr	Accessory Gene Regulator
AOAC/USDA	Association of Official Agricultural Chemists / U.S. Department of Agriculture
$a_w$	Su Aktivitesi
BP-RPF Agar	Baird Parker Rabbit Plasma Fibrinogen Agar
CF	Clumping Factor
CRF	Coagulase-Reacting Factor
°C	Santigrat Derece
ÇF	Çalışma Faktörü
DNA	Deoksiribonükleik Asit
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
ELFA	Enzyme-Linked Fluourescent Assay
g	Gram
G+C	Guanin + Sitozin
HCl	Hidroklorik Asit
Ig	İmmunoglobulin
ISO	International Organization for Standardization
KNS	Koagulaz Negatif Stafilokok
KNSS	Koagulaz Negatif Stafilokok Sayısı
kob	Koloni Oluşturan Birim
KPS	Koagulaz Pozitif Stafilokok
KPSS	Koagulaz Pozitif Stafilokok Sayısı
L	Litre
Log	Logaritma
mg	Miligram
µg	Mikrogram
ml	Mililitre

MLE	Ana Lot Giriş/Spesifikasyon Kartı
mPCA	Plate Count Skim Milk Agar
MAKS	Mezofilik Aerobik Koloni Sayısı
MRD	Maximum Recovery Diluent
MRSA	Metisilin Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
ng	Nanogram
nm	Nanometre
OMA	Official Methods of Analysis
PTÇ	Pepton Tuz Çözeltisi
RFV	Relative Floresans Value
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonükleik Asit
SE	Stafilokokal Enterotoksin
SEA	Stafilokokal Enterotoksin A
SEB	Stafilokokal Enterotoksin B
SEC	Stafilokokal Enterotoksin C
SED	Stafilokokal Enterotoksin D
SEE	Stafilokokal Enterotoksin E
SHS	Somatik Hücre Sayısı
SPR	Solid Phase Receptacle -Katı Faz Sağlayıcı
TSST-1	Toksik Şok Sendromu Toksini
V-GPK	Vitek-2 Gram Pozitif İdentifikasyon Kartı



## ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa No

Çizelge 1.1.	<i>S. aureus</i> 'un Üreme ve Toksin Oluşturması İçin Gerekli Genel Koşullar	11
Çizelge 1.2.	Stafilokok ve Mikrokokların Temel Özellikleri	12
Çizelge 1.3.	Çeşitli İzolasyon Ortamlarında Stafilokokların Oluşturduğu Koloni Morfolojisi	14
Çizelge 1.4.	<i>S. aureus</i> 'un Virulens Faktörleri ve Patogenetik Mekanizmaları	15
Çizelge 1.5.	Gelişme ve Enterotoksin Üretimiyle İlgili Limitler	36
Çizelge 1.6.	V-GPK Kuyucuk İçerikleri	40
Çizelge 1.7.	Vidas Staph Enterotoxin 2 Kit İçeriği	43
Çizelge 1.8.	Reaktif Stribi Tanımı	43
Çizelge 2.1.	Farklı Süre ve Sıcaklıklarda Muhafaza Edilen Çiğ Sütlerle Yapılan Analizler	46
Çizelge 2.2.	Analizler ve Metotlar	47
Çizelge 3.1.	Somatik Hücre Sayısı ve Mezofilik Aerobik Koloni Sayısıyla İlgili İstatistiksel Veriler	58
Çizelge 3.2.	Farklı İnkubasyon Sıcaklıklarında KPSS(12), KPSS(24) ve KPSS(48)'e Ait İstatistiksel Veriler	60
Çizelge 3.3.	Çiftliklere Göre KPSS(12), KPSS(24) ve KPSS(48)'e İlişkin İstatistiksel Veriler	61
Çizelge 3.4.	Mevsimlere Göre KPSS(12), KPSS(24) ve KPSS(48)'e Ait İstatistiksel Veriler	62
Çizelge 3.5.	İnkubasyon Sürelerine Göre KPSS'nin Karşılaştırılmasına İlişkin İstatistiksel Veriler	63

## ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 3.1.	Çiftliklere Ait Mevsimsel Somatik Hücre Sayısı Verileri	59
Şekil 3.2.	Çiftliklere Ait Mevsimsel Mezofilik Aerobik Koloni Sayısı Verileri	59
Şekil 3.3.	12, 24 ve 48 Saatlik İnkübasyon Sonunda Bulunan Minimum ve Maksimum KPSS	63
Şekil 3.4.	KPS Açısından Kontrol Numunelerinin Sayısı	64
Şekil 3.5.	Çiftliklerin Pozitif ve Negatif SE Analizlerine Ait Veriler	65
Şekil 3.6.	4°C, 10°C ve 22°C'de İnkübe Edilen Numunelere Ait SE Analizleriyle İlgili Veriler	66
Şekil 3.7.	12, 24 ve 48 Saat İnkübe Edilen Numunelere Ait SE Analizleriyle İlgili Veriler	66
Şekil 3.8.	SE Pozitif Numunelere Ait KNSS ve KPSS	67
Şekil 3.9.	Çiftliklerden Elde Edilen Kontrol Numunelerine Ait Minimum ve Maksimum KPSS	67

## 1. GİRİŞ

Süt, insan beslenmesinde çok önemli bir yere sahiptir. Hijyenik koşullarda üretilmediği, muhafaza edilmediği, işlenmediği ve gerekli kontrollerinin yapılmadığı durumlarda süt ve ürünlerinde mikroorganizmalar kolayca üreyebilmekte dolayısıyla insan sağlığı açısından tehlike oluşturabilmektedir. Çiğ süt az sayıda bakteri içerse bile sağımdan sonra çevreden çeşitli yollarla bulaşan mikroorganizmaların etkisiyle oldukça kısa sürede bozulmakta ve insanlarda hastalıklara yol açan birçok patojenin potansiyel kaynağını oluşturmaktadır (Baz ve ark 2003).

Sağıldığı hayvanın sağlık durumundan ürün haline dönüşüncüye kadar geçirdiği her aşama sütün hijyenik kalitesini etkilemektedir. Süt ve ürünlerindeki mikroorganizmaların düzeyi ve tipleri, çiğ sütün mikrobiyolojik kalitesinin yanı sıra üretim-depolama koşulları ve sıcaklık gibi faktörlerle de yakından ilişkilidir. Kontrolsüz üretim koşulları, süt ve süt ürünleri kaynaklı infeksiyon ve gıda zehirlenmeleri riskini artırmaktadır (Sawant ve ark 2009). Süt ve ürünleri, stafilokokların gelişmesi ve toksin oluşturmaları için son derece uygun bir yapı ve bileşime sahiptir (Asao ve ark 2003). Ülkemizde süt ve ürünlerinin üretimi oldukça fazla olup bunların bir kısmı küçük işletmelerde ve mandıralarda kontrolsüz olarak üretilmektedir. Personelin yeterli sağım hijyeni bilgisine sahip olmaması ve uygun koşullara sahip yeterli süt toplama merkezlerinin bulunmayışı, istenilen düzeyde sağlıklı çiğ süt teminini zorlaştırmaktadır (Yalçın 2005).

Sütün stafilokoklar ile primer kontaminasyonunda özellikle subklinik mastitisli hayvanlar büyük rol oynamaktadır (Küplülü ve ark 2002, da Silva ve ark 2005). Ayrıca sütlerin sağımdan sonra oda sıcaklığında uzun süre tutulmaları, pastörizasyon eksikliği veya pastörizasyon sonrası kontaminasyon, personel hijyeni ve işletme sanitasyonuna ilişkin hatalar, süt ve ürünlerinde stafilokokal enterotoksin (SE) oluşumu riskini arttırmaktadır. Gıdaların enterotoksijenik stafilokoklarla kontaminasyonunda özellikle personel hijyeni ile ilgili problemlerin yanı sıra işletmelerde kullanılan alet ve ekipmanın temizlik ve dezenfeksiyonuna ilişkin hatalar büyük rol oynamaktadır. Stafilokoklar başta ısıl işlem olmak üzere mikroorganizmaların indirgenmesine yönelik uygulamalara karşı yüksek bir duyarlılık göstermektedir. Dolayısıyla gıdalarda ve ekipmanlarda bu

mikroorganizmaya veya enterotoksinine rastlanması zayıf bir sanitasyon göstergesidir (Soriano 2002).

Üretimi ve muhafazası uygun olmayan çiğ süttten üretilen gıdalar, çeşitli infeksiyonlara özellikle stafilokokal intoksikasyonlara yol açarak hem halk sağlığını tehdit etmekte hem de önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Çiğ süttün farklı süre ve sıcaklıklarda bekletilmesi, bakteriyolojik yükü ve toksin oluşumunu etkilemektedir. Bu araştırmada çiğ süttlerin farklı süre ve sıcaklıklarda muhafaza edilmesi ile koagulaz pozitif stafilokok (KPS) türlerinin dağılımı ve SE oluşumu arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu araştırma, ülkemizdeki süt ve ürünlerinin kalitesi ve bu kalitenin muhafaza koşulları ile ilişkisinin ortaya konulması yönüyle önem taşımaktadır.

Türkiye'de önceki yıllarda "Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği" gereğince gıdalarda *S. aureus* sayımı ile ilgili analizler yapılmaktaydı. Kapsam genişletildiği için, hâlihazırda KPS sayımı ve SE analizleri de "Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği"nde yer almaktadır. Fakat hâlen gıdalarda koagulaz pozitif stafilokok sayısı (KPSS) ve enterotoksin oluşturmaları ile ilgili akademik çalışma sayısının ve bilimsel verilerin oldukça sınırlı düzeyde olduğu ve bununla ilgili çalışmaların artırılması gerektiği düşünülmektedir.

### **1.1. Dünyada ve Türkiye'de Stafilokokal İntoksikasyonlar**

Epidemiyolojik araştırmalar genel gıda zehirlenmesi olguları içerisinde en önemli etkenlerden birisinin stafilokok türleri ve çoğunlukla *S. aureus* tarafından oluşturulan intoksikasyonlar olduğunu göstermiştir (Argudin ve ark 2010).

Gilligan ve ark (2000), dünyada gıda zehirlenmelerinin en yaygın sebebinin SE'ler olduğunu bildirmişlerdir. Atanassova ve ark (2001) ise *S. aureus*'un birçok ülkede yaygın gıda zehirlenmesi olgularına neden olan ikinci veya üçüncü patojen olduğuna dikkat çekmiştir.

Türkiye'de gıda zehirlenmeleriyle ilgili yeterli resmi veri bulunmamakla birlikte çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalar, gıda zehirlenmesi vakalarının yaklaşık 1/3'ünün enterotoksijenik stafilokoklarla kontamine gıdalardan kaynaklandığını ortaya koymaktadır (Küçükçetin ve Milci 2008).

Amerika Birleşik Devletleri'nde stafilokokal gıda zehirlenmelerinden kaynaklanan üretim kaybı ve medikal masraflar nedeniyle yıllık yaklaşık 1,5 milyar dolar harcadığı bildirilmiştir (Normanno ve ark 2005). Yine bu ülkede yıllık 241.000'den fazla stafilokokal intoksikasyon vakası görüldüğü ve bu vakaların % 6,4'ünün hastaneye intikal ettiği rapor edilmiştir (Scallan ve ark 2011). Amerika Birleşik Devletleri'nde 1975-1982 yılları arasında stafilokokal gıda zehirlenmelerinin sadece % 1,4'ünün süt ürünlerinden kaynaklandığı tespit edilmiştir (Rosec ve ark 1997). Fransa'da ise 1999-2000 yılları arasında rapor edilen stafilokokal gıda zehirlenmelerinin % 32'sinin süt ve süt ürünlerinden ve özellikle Fransız halkının çok tükettiği çiğ süttten yapılan peynirlerden kaynaklandığı bildirilmiştir (Bhatla ve Zahoor 2007).

Ülkelerin gıda tüketim alışkanlıkları birbirinden farklı olduğu için stafilokokal gıda zehirlenmelerine neden olan gıdalar, ülkeden ülkeye farklılık gösterebilmektedir. Süt ve süt ürünlerinden kaynaklanan stafilokokal gıda zehirlenmelerinin ülkeden ülkeye farklılık göstermesinin, ülkelerin gıda tüketim alışkanlıkları ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Le Loir ve ark 2003).

Avrupa ülkelerinde ve Amerika Birleşik Devletleri'nde gıda kaynaklı vakaların istatistiksel verileri tespit edilmektedir. Türkiye'de ise gıda kaynaklı zehirlenme vakalarının istatistiği tam olarak belli olmadığı için ülke ekonomisine getirdiği maliyet ve iş gücü kaybı net bir şekilde belirlenememiştir.

Toplu beslenme günümüzde önemi giderek artan bir sektör haline gelmiştir. Bunda hizmetten yararlananların sayısının artmasının yanı sıra, hizmet basamağındaki herhangi bir noktada oluşabilecek aksaklığın yol açacağı olumsuz sonuçlar (örn; gıda zehirlenmeleri, ölümler, ekonomik kayıplar) önemli rol oynamaktadır. Gelişmiş ülkelerde kalite ve güvenlik açısından gerekli her türlü yasal önlem alınmakta ve konuya halk sağlığı yönüyle yaklaşılmaktadır. Türkiye'de ise halk sağlığında önemli bir konu olarak karşımıza çıkan toplu beslenme konusunda gerek yasal düzeyde gerekse sektör bazında birçok belirsizlikler ve sorunlar yaşanmaktadır. Türkiye'de gıda kaynaklı zehirlenmelerle ilgili istatistiksel veriler, 1996'da 4901 olgu ve buna bağlı 58 ölüm, 2000 yılında ise 5268 olgu ve buna bağlı 10 ölüm olduğunu göstermektedir (Devlet Planlama Teşkilatı Müsteşarlığı 2001).

## 1.2. Tarihçe

Çeşitli hastalıklara kaynak teşkil eden stafilokoklar çok eski zamanlardan beri bilinmekle beraber *Staphylococcus* adını ilk kez 1882 yılında Ogston kullanmıştır (Bilgehan 2000, Jay ve ark 2005).

1878 yılında Robert Koch, ilk kez stafilokokları ışık mikroskobu ile tanımlamıştır. Pasteur ise 1880 yılında sıvı besiyerinde üretmiştir. 1881 yılında İskoçyalı bir cerrah olan Alexander Ogston, salkım şeklindeki kokları kobaylarda çeşitli hastalıkların etkeni olarak göstermiştir. Ogston, üzüm salkımına benzeyen düzensiz kümeler oluşturmaları sebebiyle bu mikroorganizmayı *Staphylococcus* olarak isimlendirmiştir. Yunanca “*staphyle*” üzüm salkımı, “*coccus*” tane, zerre anlamına gelmektedir (Bilgehan 2000).

Rosenbach, 1884 yılında stafilokokları saf kültür olarak ilk üreten ve onların karakteristikleri üzerinde ilk laboratuvar çalışmalarını yapan kişidir. Winslow, 1920 yılında stafilokokları *Micrococcaceae* familyasına dahil etmiştir. Von Daranyi, 1925 yılında *S. aureus*'un koagule edici özelliğini tespit etmiş ve bu testin identifikasyonda önemli olduğunu göstermiştir. Alexander Fleming'in 1928 yılında penisilini bulması ve 1940 tarihinde Florey ve Chain tarafından penisilin üretiminin başlaması ile stafilokok infeksiyonlarının tedavisinde önemli bir aşama kaydedilmiştir. *S. aureus* suşlarında penisilin direnci 1944 yılında Kirby tarafından tanımlanmıştır. 1957 yılında bu mikroorganizmaların glikozu anaerobik fermente edebilme yeteneklerini belirleyen Evans, onları *Staphylococcus* isminde ayrı bir soy olarak sınıflandırılmıştır. Daha sonra Winslow tarafından ikinci tür olan *S. epidermidis* öne sürülmüştür. Üçüncü tür olan *S. saprophyticus* 1974 yılında stafilokoklara eklenmiştir. Tür sayısı 1980 yılında 13'e ulaşmış, 1984 yılında ise 20 olmuştur. Daha sonraları deoksiribonükleikasit (DNA) homolojisi, immunokimyasal ve biyokimyasal çalışmalarla tür sayısı 25'e ulaşmıştır (Şardan 2000).

## 1.3. Stafilokokal İntoksikasyonlara Genel Bakış

SE'ler ile kontamine gıdaların tüketimi ile ortaya çıkan stafilokokal gıda zehirlenmeleri, insanlarda görülen en yaygın gıda kaynaklı hastalıklardandır (Ünal 2013).

Pek çok stafilokok türü, insanların üst solunum yolları ve derilerinde doğal olarak bulunmaktadır. Stafilokoklar hem hastane infeksiyonlarında hem de gıda sektöründe epidemi yapabilme özellikleri sebebiyle halk sağlığı açısından önemli mikroorganizmalardır (Yücel ve Anıl 2011).

Stafilokokal gıda zehirlenmeleri, enterotoksijenik özelliğe sahip stafilokokların gıdalarda  $10^6$  (kob/g) veya daha yüksek sayıya ulaşması sırasında sentezlenen bir ekzotoksin olan enterotoksinin, alimenter yolla alımı sonucu oluşmaktadır (Cowell ve ark 2002, Erol ve İşeri 2004).

Deri ve yumuşak doku infeksiyonlarına (örn; impetigo, folikülit, furonkül, karbonkül, hidradenitis süpurativa ve cerrahi yara infeksiyonları), kardiyovasküler sistem infeksiyonlarına (örn; endokardit, perikardit, mediastinit ve septik vaskülit), solunum sistemi infeksiyonlarına (örn; pnömoni ve ampiyem), kas ve iskelet sistemi infeksiyonlarına (örn; osteomyelit, septik artrit ve septik bursit), santral sinir sistemi infeksiyonlarına (örn; menenjit ve spinal epidural apse) ve üriner sistem infeksiyonlarına sebep olan *S. aureus*, insanlarda besin zehirlenmelerinin yanısıra sepsisemi, toksik şok sendromu, otoimmün hastalıklar ve özellikle de süt ineklerinde mastitise neden olmaktadır (Omoe ve ark 2004, Stevens ve ark 2007, Hata ve ark 2008).

Günümüzde stafilokokal gıda zehirlenmelerinin esas nedeni olarak *S. aureus* sorumlu tutulurken *S. hyicus* ve *S. intermedius* gibi diğer KPS'lerin de enterotoksin ürettiği; ayrıca *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* ve *S. xylosum* gibi koagülaz negatif stafilokokların (KNS) da enterotoksin üretebildiği belirlenmiştir. *S. aureus* çiğ sütte bulunan en önemli mikroorganizmalardan birisi olup insan ve hayvanlar üzerindeki patojenitesi ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır (Sutherland ve Varnam 2002, Gündoğan 2006, Güven ve ark 2010).

#### **1.4. Stafilokokların Doğada Bulunuşu**

Stafilokoklar doğada yaygın olarak bulunan mikroorganizmalardır. Temel habitatları, memelilerin ve kanatlıların deri, ter bezleri ve mukoz membranlarıdır. Primat derisinde yaygın olarak bulunduğu için *S. aureus*'un temel doğal konakçılarının primatlar olduğu öne sürülmüştür. İnsanlarda özellikle erginlerde en uygun yerleşim yerinin anterior burun mukozası olduğu bildirilmiştir. Farinkste,

burun mukozasında, meme dokusunda, intestinal ve üriner kanallarda da bulunabilmektedirler. Sporadik olarak toprak, hava, toz, kum, deniz ve içme suları, lağım birikintileri, bitki yüzeyleri, kırmızı etler, kanatlı etleri ve süt ürünlerinden izole edilmişlerdir (Tomi ve ark 2005).

Cilt ve doku infeksiyonları, bakteriyemi, toksik şok sendromu, endokardit gibi birçok infeksiyona ve gıda zehirlenmesine neden olan *S. aureus* suşları için doğal rezervuar insandır (Demir ve ark 2003). Pek çok araştırmacı *S. aureus*'un sağlıklı insanların ellerinden, kollarından, yüzlerinden, derilerinden, boğazlarından ve burun deliklerinden izole edildiğini dolayısıyla insanların portör olduğunu bildirmiştir. Bu nedenle gıdaların stafilokoklarla kontaminasyonunda en önemli faktör olarak üretimde çalışan personel gösterilmektedir. Bunun yanı sıra, birçok evcil hayvanın da *S. aureus* kaynağı olduğu bildirilmiştir (Ayçiçek ve ark 2004, Jay ve ark 2005, Uyar ve Tengilimoğlu 2012).

Bazı türler genellikle bazı hayvanlarda daha fazla bulunmaktadır. *S. caprae* keçilerde, *S. gallinarum* tavuklarda, *S. sciuri* sincaplarda ve *S. hyicus* domuzlarda sıklıkla saptanmıştır. *S. aureus* ise deniz ve kara hayvanlarında geniş bir yayılım göstermektedir (Baird-Parker 1990). *S. intermedius* karnivorlarda ana türdür, bunlardan başka atlarda ve güvercinlerde de saptanmıştır. *S. epidermidis* insan derisinde çok yaygın bulunan bir etkidir. *S. hyicus* tavukların derilerinde ve burun mukozasında, *S. intermedius* güvercinlerde bulunabilmektedir (Kloos 1990). *S. aureus*'un meme ucuna kolonizasyonunun meme infeksiyonları ve mastitis olguları için ilk adım olduğu bildirilmiştir (Alişarlı ve Solmaz 2003).

### **1.5. Stafilokokal Kontaminasyon Kaynakları**

Gıdalarda stafilokokal kontaminasyon kaynakları çok çeşitli olabilmektedir. Gıda işleyen personelin öksürmesi veya hapşırması ile burun ve boğaz bölgesindeki enterotoksijenik stafilokoklar kontaminasyon kaynağı olabilmektedir. Ayrıca stafilokoklarla enfekte kesik ve yaralar da kontaminasyona sebep olabilmektedir. Hayvanlar da stafilokokal kontaminasyon kaynağı olabilmektedir. Bununla beraber stafilokokal gıda zehirlenmesi vakalarında insan kaynaklı kontaminasyon, hayvansal kontaminasyondan daha fazla önem taşımaktadır. Pek çok gıda zehirlenmesi vakası, gıda hazırlayan personelin kontaminasyonu ile oluşmaktadır. Bu gibi kişilerin herhangi bir gıdanın hazırlanması, depolanması veya dağıtılmasında çalışması, o



gıdanın söz konusu mikroorganizmalarla bulaşma olasılığını artırmaktadır (Tondo ve ark 2000, Gündoğan ve ark 2005).

Aynı zamanda ekipmanlar ve çevresel etmenler de kontaminasyon kaynağı olabilmektedir. İnsektler, rodentler ve diğer haşerelerin yanı sıra mutfaklarda kullanılan alet ve ekipmanların da kontaminasyon kaynağı olabileceği göz önünde bulundurularak haşerelere karşı doğru ve kararlı bir mücadele programının uygulanması ve mutfaklardaki alet ve ekipmanların hijyenine azami özen gösterilmesi gerektiği bildirilmiştir (Soriano 2002).

Sağlıklı hayvan etleri normal şartlarda çok az mikroorganizma ihtiva etmektedir. Mikroorganizmaların ete bulaşmaları genellikle kesim sırasındaki dış etkenlerle gerçekleşmektedir. Etin işlenmesi sırasında kullanılan alet ve makinelerin yanı sıra hava, yer, su, işçilerin elleri ve elbiseleri kontaminasyonu arttırmaktadır (Gülbandılar 2006).

Kanatlı mezbahalarındaki kesim ve işleme esnasında *S. aureus* ile kontaminasyonun artabileceği, özellikle tüy yolma işleminin önemli kontaminasyon kaynağı olduğu bildirilmiştir (Muratoğlu 2010).

Gıdalarda hayvansal kökenli SE üretimi, temel olarak mastitisli hayvanların süt ve ürünlerini akla getirmektedir. Tüketilmeden önce işlenen ve ısıtma işlemine tabi tutulan bu gıdalarda bulunan mikroorganizmalar genellikle yıkılmaktadır. Çiğ sütlerde bulunabilecek diğer mikroorganizmalar da rekabetçi özellikleri zayıf olan stafilokokların üremesini baskılayabilmektedir (Janstova ve 2012).

Süt ineklerinde *S. aureus*'un önemli bir mastitis etkeni olduğu göz önüne alındığında özellikle subklinik mastitisli ineklerden elde edilen sütlerin sağlıklı ineklerden elde edilen sütlere karışmış olması, süt ve ürünleri için en önemli kontaminasyon kaynağıdır (Ameh ve ark 1999).

Özellikle ısıtma işlemi gören gıdalarda üreyen stafilokokların önemli zehirlenme vakalarına sebep olduğu bildirilmiştir. Pek çok stafilokokal intoksikasyon, enterotoksin oluşuktan sonra ısıtma işlemine tabi tutulan gıdanın yenilmesi sonucunda oluşmuştur. Bununla beraber ısıtma işlemi uygulamasından sonra enterotoksin oluşumunu takiben yenilen gıdalar sonucunda da zehirlenme vakaları olmaktadır. Bu

durum gıda endüstrisinde pastörize süt gibi işlenmiş gıdalar açısından büyük önem taşımaktadır (Janstova ve 2012).

### **1.6. Gıda Grupları ve Stafilocokal İntoksikasyonlar**

Stafilocokal gıda zehirlenmeleri, enterotoksijenik stafilocok türlerinin gıdalarda üremeleri sırasında sentezledikleri, sindirim ve sinir sistemi üzerine etkili enterotoksinlerin meydana getirdiği gıda kaynaklı intoksikasyonlardır (Küplülü ve ark 2002).

Stafilocokal gıda zehirlenmelerinde öne çıkan gıdalar et ve et ürünleri, balık ve kabuklu deniz ürünleri, kümes hayvanları ve ürünleri, salatalar (örn; yumurta, ton balığı, balık, patates ve makarna salataları), fırın ürünleri (örn; kremalı pastalar, tartlar ve sandviçler) özellikle süt tozu ve peynir başta olmak üzere süt ve ürünleri, ayrıca süt-şeker-yumurtadan yapılan soslardır (Atanassova 2001, Uyar ve Tengilimoğlu 2012).

İnsanlarda görülen enterik hastalıkların çoğu hayvansal kaynaklı besinlerin tüketimi sonucu oluşmaktadır. Başlangıçta düşük sayıda olan mikroorganizmalar besinin uygun olarak işlenmediği, dağıtılmadığı ve hazırlanmadığı durumlarda çoğalmaktadır. Besin zehirlenmeleri başta Amerika Birleşik Devletleri olmak üzere dünyanın birçok yerinde önemli bir hastalık sebebidir (Gürbüz 2009).

Yapılan epidemiyolojik çalışmalar gıda zehirlenme vakalarında enterotoksijenik stafilocokların önemli derecede rol oynadığını, süt ve ürünlerinin sorumlu gıdalar arasında ilk sıralarda yer aldığını ortaya koymaktadır. *S. aureus* besin zehirlenmelerinde oldukça önemli bir yere sahip predominant etkidir (Oliver ve ark 2005, Eman ve ark 2011).

Süt, stafilocoklar da dâhil birçok mikroorganizmanın gelişme ve çoğalması için elverişli bir ortamdır. Çiğ süt normal olarak az sayıda bakteri içerse bile çeşitli yollarla bulaşan mikroorganizmaların etkisiyle oldukça kısa sürede bozulmakta ve genellikle birçok insan patojeninin potansiyel kaynağı olmaktadır (Tekinşen ve Tekinşen 2005, Zakary ve ark 2011).

Süt, yeterli ve dengeli beslenme için gerekli olan hayvansal protein, yağ, laktoz, vitamin ve mineral maddeleri yeterli miktarda içeren, özellikle bebek ve

çocukların kemik ve diş gelişimleri sürecinde önemli yeri olan, vücut fonksiyonlarını düzenleyen temel bir gıda maddesidir. Süt, ancak kaliteli ve sağlıklı biçimde tüketildiği ölçüde bu özellikleri ile mükemmel bir besin kaynağıdır. Üretim ve depolama koşulları, süt kalitesini etkileyen önemli etkenlerdir. Aynı zamanda, nötral pH'sı, içerdiği laktoz, sitrik asit, süt yağı, azot, mineral maddeler ve yüksek su içeriği ile birçok mikroorganizmanın gelişmesi için de mükemmel bir ortam oluşturmaktadır. Süt ve ürünlerindeki SE'lerin mevcudiyeti ve SE içeren besinlerin tüketimi, sağlık ve ekonomi açısından problem oluşturmaktadır. Son yıllarda yapılan birçok araştırma, stafilokokların özellikle süt ve ürünlerindeki varlığını doğrulamaktadır. (Gran ve ark 2003).

Ülkemizde çiğ süt, pastörize süt ve süt içerikli gıdalarla yapılan bazı çalışmalarda (Kıvanç ve ark 1992, Küplülü ve ark 2002) *S. aureus* ve enterotoksinleri tespit edilmiştir.

Stafilokoklar çiğ sütte yarışmacı floranın etkisi ile yavaş gelişmektedir. Pastörize edilen sütlerde ise, pastörizasyon sonrası personel kaynaklı bir kontaminasyon meydana gelmesi durumunda yarışmacı floranın yokluğuna bağlı olarak uygun olmayan muhafaza koşullarında stafilokoklar hızla gelişerek enterotoksin oluşturma düzeyine ulaşabilmektedir (Le Loir ve ark 2003). *S. aureus*'un varlığı yetersiz hijyen koşullarının göstergesi olup  $10^3$  (kob/ml) seviyesinin üzerine çıkması özellikle çiğ sütlerde SE oluşumu riskini artırmaktadır (De Oliveira ve ark 2011).

Çiğ sığır etleri patojen mikroorganizmaların kaynağı olarak besin kaynaklı hastalıkların nedeni olabilmektedir. Aynı zamanda etlerin hatalı işlenmesi, ürün elde etme sürelerinin göz önünde tutulmaması, piştikten sonraki bekleme sıcaklığının kontrol edilmemesi besin kaynaklı hastalıkların diğer nedenleri olarak sıralanabilmektedir. Et kaynaklı en önemli bakteriyel hastalık etkenleri *Salmonella spp* (% 48), *C. perfringens* (% 32) ve *S. aureus* (% 14)'tür (Gülbüz 2009).

Bazı gıdalar diğerlerine göre stafilokokal gıda zehirlenmelerine daha fazla sebep olabilmektedir. Aynı şekilde bazı besinlerin hazırlanma şekilleri de bakterilerin üreme hızını arttırabilmektedir. Oluşan toksin miktarı da gıda çeşidiyle yakından ilgilidir. Protein ve karbonhidrat yönünden zengin gıdalar, stafilokokların

gelişmeleri, çoğalmaları ve toksin oluşturmaları için daha uygun gıda maddeleridir. Stafilocoklar asit ihtiva etmeyen besinlerde kolayca çoğalabilmektedir. Asit nitelikli besinler yumurta ile karıştırılıp kullanıldığında asit niteliğini kaybetmekte ve stafilocoklar için uygun bir ortam haline gelebilmektedir. Salata mayonezleri, içinde asetik asit bulunması sebebiyle stafilocokların gelişmesine elverişli değildir, ancak bazı yiyeceklerle (haşlanmış patates vb.) karıştırılınca stafilocok gelişmesine elverişli bir ortam oluşabilmektedir. Isıl işlemin uygulandığı süt ve mamüllerinde ısının yeterli olmaması ve bu gibi mamullerin uygun hijyenik koşullarda işlenmemesi halinde ortamda kalan mikroorganizmalar gıda zehirlenmesine neden olabilmektedir (Tunail 2000).

Gıdalarda *S. aureus* bulunması, o gıdanın stafilocokal gıda zehirlenmelerine neden olacağı anlamına gelmemekte, gıdalarda *S. aureus* bulunmaması da o gıdanın stafilocokal gıda zehirlenmelerine neden olmayacağına dair güvence vermemektedir. Başta ısıl işlem olmak üzere çeşitli uygulamalar *S. aureus*'u öldürebilmekte fakat daha önce oluşmuş enterotoksini tahrip edemeyebilmektedir (Milci ve Yaygın 2006).

### **1.7. Stafilocokların Klasifikasyonu ve Genel Özellikleri**

*Micrococcaceae* familyasında yer alan stafilocoklar 0,5-1,5 µm çapında, sferik veya oval şekilde, Gram pozitif, kemoorganotrof, hareketsiz, sporsuz, aerob/fakültatif anaerob, mezofilik, katalaz pozitif, oksidaz negatif mikroorganizmalardır (Milci ve Yaygın 2006). Hücreler tek veya çiftler halinde düzensiz kümeler veya üzüm salkımı benzeri formlar oluşturmaktadır (Carey ve ark 2004, Madigan ve ark 2009). Koyunların apse etkeni olan *S. aureus ssp. anaerobius* ve *S. saccharolyticus* diğer stafilocoklardan farklı olarak anaerob koşullarda aerob koşullardan daha iyi üremektedir (De La Funte ve ark 1985).

Stafilocoklar 7-48 °C arasında üreyebilmekte ve 10-48 °C arasında toksin oluşturabilmektedirler. Optimum üreme sıcaklığı 37 °C'dir. Toksin oluşturma ve üreme yetenekleri için limit su aktivitesi değerleri sırasıyla aw:0.83 ve aw:0.85'tir (Baird-Parker 1990). *S. aureus*'un üreme ve toksin oluşturma için gerekli genel koşullar Çizelge 1.1'de verilmiştir.

Çizelge 1.1. *S. aureus*'un Üreme ve Toksin Oluşturması İçin Gerekli Genel Koşullar (Erol 2003).

	Üreme		Toksin Oluşturma	
	Optimum	Spektrum	Optimum	Spektrum
<b>Sıcaklık</b>	37	6,7-47,8	40-45	10-47,8
<b>pH</b>	6,7	4-10	6-7	4,5-9,8
<b>a<sub>w</sub> Değeri</b>	0,98	0,83-0,99	0,98	0,86->0,99
<b>NaCl (%)</b>	0	0-20	0	0-10
<b>Atmosfer</b>	Ae	Ae-An	Ae	An

Ae: Aerob, An: Anaerob

Morfolojik olarak benzer yapıda olan *Micrococcus* soyunun üyelerinden anaerobik olarak üremesi ve obligat aerobik mikrokoklardan farklı fermentasyon ve solunum metabolizmasına sahip olmaları sebebiyle ayrılmaktadır. Kimyasal ve biyokimyasal karakteristikleri açısından da iki soy oldukça farklıdır. Guanin ve Sitozin içerikleri ve hücre duvarı yapıları da oldukça farklıdır (Baird-Parker 1990). Stafilokoklar bazı antibiyotiklere duyarlılık deneyi ile ayırt edilebilmektedir. Stafilokok-mikrokok ayırımında sadece basitrasine duyarlılık deneyinin kesin kriter olarak kullanılmasının yeterli olduğu da savunulmuştur (Pezzlo 1992). Besiyerine 75 (mg/ml) polimiksin B eklenmesi ile *S. aureus* 24 saatte üreme gösterebilmektedir. Buna karşın diğer KNS'ler, mikrokoklar ve Gram negatif bakterilerin çoğunun üremesi önlenmektedir (Koneman ve ark 1997, Bilgehan 2000).

Çizelge 1.2'de stafilokokların temel özellikleri mikrokoklarla karşılaştırılarak verilmiştir.

Çizelge 1.2. Stafilokok ve Mikrokokların Temel Özellikleri (Cengiz 1999).

Özellik	Stafilokok	Mikrokok
Görünüm	Üzüm salkımı gibi düzensiz	Tetrad veya kübik
Hareket	Negatif	Negatif
45 °C'de üreme	Pozitif	Negatif
Anaerobik üreme	Var	Zorunlu aerob
Glukozdan asit oluşumu	Pozitif	Negatif
Oksidaz aktivitesi	Negatif	Pozitif
Katalaz aktivitesi	Pozitif	Pozitif
Pentoglycine köprüsü	Pozitif	Negatif
Ribitol gliserol teioik asit	Pozitif	Negatif
Eritromisinli aerobik ortamda gliserolden asit oluşumu	Pozitif	Negatif
Koagulaz	Pozitif	Negatif
Lizozim duyarlılığı	Dirençli	Duyarlı
Lizostafin duyarlılığı	Duyarlı	Dirençli
Basitrasin duyarlılığı	Dirençli	Duyarlı
DNA G+C (%mol)	30-40	66-75

Birçok stafilokok türü aerobik şartlarda üreyebilmek için organik nitrojen kaynağına ve bir veya daha fazla B grubu vitamene ihtiyaç duymaktadır. Bazı türler de anaerobik üreyebilmek için urasil ve/veya fermente edilebilir karbonhidrata gereksinim duymaktadır (Jay ve ark 2005).

Stafilokoklar çevre koşullarına dayanıklı, kuruluğa dirençli olup kurumuş balgam ve irinde haftalarca canlı kalmaktadır. Yüksek tuz konsantrasyonlarında üreme yeteneğindedir. Bu özellikten selektif besiyeri hazırlanmasında yararlanılmaktadır. Boyaların bakteriyostatik etkilerine duyarlı olan stafilokoklar, 1/500.000 oranında kristal violet bulunan besiyerlerinde ürememektedir. *S. aureus* spor oluşturmadığı halde vücut dışında uzun süre canlılığını koruyabilen tek insan patojenidir (Tükel ve Doğan 2000).

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. Anilin boyaları ile iyi boyanan stafilokoklar, sıvı

besiyerlerinde bulanıklık ve çöküntü yaparak çoğalmakta katı besiyerlerinde ise 1-2 mm çapında düzgün koloniler oluşturmaktadır. 60 °C'de 30 dakikada, % 2'lik fenolde 15 dakikada inaktive olmakta % 9'luk sodyum klorüre ve sakkarozaya tolerans gösterebilmektedir (Arda ve ark 1997, Koneman ve ark 1997). Antibiyotiklere karşı çok çabuk direnç oluşturmaktadır. Ürettiği penisilinaz etkisiyle penisilinin etkisini ortadan kaldıracılabilmektedir (Ekici ve ark 2008).

*S. aureus*, başta sıcaklık uygulamaları olmak üzere mikroorganizmaların indirgenmesine yönelik uygulamalara karşı yüksek bir duyarlılık göstermekte ve sıcaklığa dayanıklı, molekül ağırlığı 26900-29600 dalton arasında değişim gösteren, yapısında fazla miktarda lizin, tirozin, aspartik asit ve glutamik asit bulunduran, tek zincirli proteinler olan enterotoksinleri üretebilmektedir (Milci ve Yaygın 2006).

*S. aureus*, plaklarda düzgün, yuvarlak ve konveks yapıda koloni formu oluşturmaktadır. Genellikle koagülaz enzimi üretmekte, mannitol ve değişik şekerleri fermente ederek gaz oluşturmaksızın asit oluşturmaktadır. Çoğu % 7,5-10 NaCl içeren basit besiyerlerinde 18-45 °C'de kolaylıkla üremektedir. *S. aureus*'un diğer önemli kültürel karakteristikleri ise genellikle altın sarısı renkte olan koloni pigmentasyonu ile kanlı agarda beta-hemoliz oluşturmalarıdır. Jelatin eritir, nitratları nitrit ve amonyaka indirgerler. Laktoz ve maltozu kullanarak asit oluştururlar, gaz oluşturmazlar. Aerobik ve anaerobik olarak mannitolden asit oluştururlar. Aerobik olarak fruktoz, galaktoz, mannoz, riboz, sukroz, trehaloz, turanoz ve gliserolden asit oluştururlar (Cengiz 1999, Gülbandılar 2006).

Çeşitli kültür ortamlarında stafilokokların oluşturduğu koloni morfolojisi Çizelge 1.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 1.3. Çeşitli İzolasyon Ortamlarında Stafilokokların Oluşturduğu Koloni Morfolojisi (Baird ve Lee 1995).

Üreme Ortamı	Koloni Morfolojisi
BP (Baird-Parker agar)	Siyah, parlak, konveks, 1.0-1.5 mm çapında koloni - Dar, beyaz, sınırları düzgün ve çepeçevre 2-5 mm opak medyum içinde berrak zon
BPP (Baird-Parker with pig plasma)	Siyah, parlak, konveks koloni - Çepeçevre presipite fibrin halesi
BPF (Baird-Parker with fibrinogen)	Siyah, parlak, konveks koloni - Çepeçevre presipite fibrin halesi
BP+PP (Baird-Parker with phenol phtalein)	BP'ye benzeyen fakat 4 mm çapında donuk koyu pembe zon
KRANEP (Potassium thiocyanate actidione sodium azide egg yolk pyruvate agar)	Altın sarısı koloni - Çevresinde bulanık zon
LSM (Lipovitellin salt mannitol agar)	Koloni ile beraber opak zon
MSA (Mannitol salt agar)	Koloni etrafında parlak sarı zon
VJ (Vogel Johnson agar)	Siyah, konveks, parlak koloni - Etrafında sarı zon
PCVJ (Modified Vogel Johnson with phosphatidyl choline)	Siyah, konveks, parlak koloni - Etrafında sarı berrak zon

### 1.7.1. Hücre Yapısı

Stafilokoklar yaklaşık 2800 baz çiftli sirküler kromozom ile profajlar, plazmidler ve transpozonlardan oluşmaktadır. Stafilokokal DNA düşük oranda Guanin ve Sitozin (G+C) içermektedir. G+C içeriği % 30-39 mol arasındadır. *Micrococcus* soyu üyeleri ise % 68-74 mol G+C içermektedir (Öncül 2006).

### 1.7.2. Virulans ve Patojenite Faktörleri

*S. aureus*'un virulansı en yüksek olan stafilokok türü olduğu bilinmektedir. *S. aureus* suşları, etkenin konakçı hücrelerinde kolonize olmasına katkıda bulunabilen hemolizinler, nükleazlar, proteazlar, lipazlar, hiyaluronidaz ve kolajenazı da içeren enzimler ve sitotoksinleri üretebilmektedir. Bu komponentlerin ana görevi, lokal konakçı dokularını mikroorganizmanın üreyebilmesi için uygun hale getirmektir. Bunun yanı sıra bazı suşlar toksik şok sendromu toksini (TSST-1) ve enterotoksinleri içeren bir veya daha fazla ekzoprotein üretebilmektedir (Dinges ve ark 2000). *S. aureus*'un virulans faktörleri ve bu faktörlerin patogenetik mekanizmaları Çizelge 1.4'te gösterilmiştir.



Çizelge 1.4. *S. aureus*'un Virulens Faktörleri ve Patogenetik Mekanizmaları (Gordon 1998).

<b>Konakçı Savunmasının Engellenmesi</b>
Mikrokapsül
Protein A
Koagulaz
Yağ Asidi Metabolize Edici Enzim
Lökosidin ve/veya $\gamma$ -Toksin
<b>Dokuya Yerleşme</b>
Proteaz
Nükleaz
Lipaz
Hyaluronidaz
Stafilokinaz
<b>Sepsis Sendromunun Oluşması</b>
Toksik Şok Sendrom Toksini
Enterotoksinler
Sitolitik Toksinler ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ )
<b>Spesifik Toksinosisin İndüklenmesi</b>
Toksik Şok Sendrom Toksini
Enterotoksinler
Eksfoliatif Toksin
<b>Endotelial Hücrelere ve Bazal Membranlara Tutunma</b>
Fibrinojene Bağlanma Proteinleri, Fibronektin, Laminin, Kollajen, Trombospondin

### 1.7.3. Hücre Duvarı

Stafilokokal hücre duvarı yapısı, tipik Gram pozitif mikroorganizma yapısında olup 30-60 nm kalınlığındadır. *S. aureus*'un hücre duvarı kalınlığı 120 nm'nin üzerine de çıkabilmektedir (Schleifer ve Kroppenstedt 1990).

Hücre duvarının temel yapısını peptidoglikan (% 50), fosfat içeren teioik asit (% 40) ve proteinler oluşturmaktadır. N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramik asidin bir peptide kovalent bağlarla bağlanmasıyla oluşan polimer olan peptidoglikan, bakteriyi lizizden koruyarak ozmotik stabiliteyi sağlayan ve bakteriye şekil veren tabakadır. Sadece Gram pozitif bakteri duvarında bulunan teikoik asit, mukozalarda bulunan özgül reseptörlerle birleşerek stafilokokların konakçıya tutunmasını sağlamaktadır. (Cengiz1999, Tünger 2004).

Proteinler ise adezyon için önemli olan fibronektin, fibrinojen, laminin ve kollagen içermektedir. Adezyon proteinlerinin bağlanması ile bakteriyel tutunma mekanizması gerçekleşmiş olmaktadır. Antijenik proteinlerden en çok çalışılmış olanı Protein A'dır ve *S. aureus* suşlarının % 90-98'inde mevcuttur (Schleifer ve Kroppenstedt 1990, Öncül 2006).

#### **1.7.4. Kapsül**

*S. aureus* klinik izolatlarının % 90'ından fazlasında polisakkarit yapıda mikrokapsül bulunmaktadır. Bu kapsül, bakteriyi fagositozdan korumakta ve konak hücrelerine özellikle kateter gibi yabancı cisimlere tutunmayı sağlamaktadır (Öncül 2006).

#### **1.7.5. Yüzey Proteinleri**

Stafilokokların yüzeyinde bulunan protein A ve kapsül niteliğindeki polisakkarit maddelerin bakteriyi fagositozdan koruyucu etkileri vardır. Bu şekilde patojenitenin artmasına neden olmaktadır (Bilgehan 1995). *S. aureus*' un peptidoglikan tabakasında 42 kilodalton molekül ağırlığında protein A bulunmaktadır. Protein-A, hücre duvarı komponentlerinden birisi olup büyük bir kısmı peptidoglikan yapıya kovalent olarak bağlanmıştır. Ortama salınan serbest, hücreye bağlı ve hücre dışı olmak üzere üç tip protein-A bulunmuştur. Protein A'nın en önemli özelliği antikomplementer ve antifagositer etkisinin olmasıdır. Mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber, konakçı polimorf nükleer hücreleri tarafından patojenin eliminasyonunun antifagositik bir etkiyle inhibe edilmesini sağladığı ileri sürülmüştür (Graille ve ark 2000, Sardel ve McKillip 2004).

Stafilokokal protein-A'nın koagülaz ve nükleaz aktiviteleri ile büyük oranda korelasyon göstermesi, antifagositik etki oluşturması ve antibiyotik duyarlılığını azaltması gibi özellikleri patojenite kriteri olduğuna işaret etmektedir (Biçer 2009).

#### **1.7.6. Biyofilm Oluşturma**

Bakteriyel glikokaliks, bakteri tarafından oluşturulmuş, polisakkarit kaplı bir tabakadır. Bu materyal, yapışkan özelliğinden dolayı "slime" olarak da adlandırılmaktadır. Bir enfeksiyonun başlamasında birinci aşama, bakterilerin dokulara yapışmasıdır. *S. aureus* hücreleri, reseptörleri ile fibrinonektine, fibrinojene

veya fibril benzeri tabakalara bağlanmaktadır. *S. aureus*'un invitro koşullarda hücrelere veya hücre yüzeylerine yapışması ve biyofilm oluşturması, eksopolisakkarit üretimi, fagositoza karşı yüksek dirençle ve antibiyotiklere karşı düşük hassasiyetle yakından ilişkilidir (Cucarella ve ark 2001, Gündoğan ve ark 2006).

Süt endüstrisinde biyofilm oluşumunda süt proteinleri önemli rol oynamaktadır. Paslanmaz çelik yüzeyler üzerinde yapılan bir çalışmada  $\alpha$ -kazein,  $\beta$ -kazein, k-kazein ve  $\alpha$ -laktalbumin gibi süt protein fraksiyonlarının *S. aureus* ve

*L. monocytogenes* tutunmasını azalttığı ancak ortama glutaraldehit katıldığında *S. aureus* ve *L. monocytogenes* tutunmasının arttığı belirlenmiştir (Barnes ve ark 1999).

Biyofilm üretiminin saptanması için Freeman ve ark (1990) tarafından geliştirilmiş ve farklı araştırmacılar tarafından modifiye edilmiş bir yöntem olan Kongo Kırmızılı Agar metodu kullanılmaktadır. Kongo Kırmızılı Agar besiyerinde üreyen *S. aureus* kolonileri kırmızı siyah renkli koloni oluşturmalarına ve düzgün veya buruşuk koloni morfolojisi göstermelerine bakılarak izolatların biyofilm üretimi tespit edilebilmektedir (Knobloch ve ark 2002).

### **1.7.7. Antibiyotik Direnci**

Son yıllarda görülen antibiyotiklere karşı direnç gelişimi, büyük bir sağlık sorunu haline almıştır. Direnç, bir bakterinin antimikrobiyal bir ajanın öldürücü veya üremeyi durdurucu etkisine karşı koyabilme yeteneğidir. Direnç gelişimi ve yayılımı genellikle gereksiz ve uygun olmayan antibiyotik kullanımına bağlanmakla birlikte bakterilerin olumsuz çevre koşullarında yaşamını sürdürmek için kullandığı savunma sürecinin bir parçası olduğu da bildirilmektedir (Yüce 2001).

Antibiyotik direnci, doğal direnç veya kazanılmış direnç olmak üzere iki kısımda incelenebilmektedir. Enterokokların duvar yapıları nedeniyle sefalosporinlere dirençli olmaları, doğal dirence örnek olarak gösterilmektedir. Kazanılmış direnç ise kromozom, transpozon veya plazmid DNA'sındaki mutasyonlarla veya direnç geni taşıyan DNA dizilerinin başka bakterilerden transformasyon, transdüksiyon veya konjugasyon yoluyla alınması sonucu ortaya

çıkan dirençtir. Streptomisin ve florokinolonlara karşı gelişen direncin bu yolla oluştuğu bilinmektedir (Yüce 2001).

İlk antibiyotik, 1928 yılında *Penicillium* küfü ile kontamine agar plağında stafilokokların inhibe olduğunu gözlemleyen Sir Alexander Fleming tarafından keşfedilmiştir. Ancak zorluklar nedeniyle ilacın klinik kullanıma girmesi 1940 yılında olmuştur (Tanır ve Göl 1999).

Penisilinin çok yaygın kullanımı sonucunda penisilini parçalayan stafilokok türleri ortaya çıkmıştır (Aubry-Damon ve Courvalin 1999). *S. aureus* izolatları penisilinaz enzimi üreterek penisilindeki  $\beta$ - laktam halkasını parçalamak suretiyle penisilini inaktive etmektedir (Dündar ve Dündar 2002).  $\beta$ -laktamaz üreten *S. aureus* izolatları penisilin, amoksisilin ve ampisiline de direnç göstermiştir (Derbentli 1996). Penisilinaz aktivitesine sahip izolatların varlığının tespit edilmesinin ardından penisilinaz üreten *S. aureus* infeksiyonlarının tedavisinde kullanılan eritromisin, tetrasiklin, streptomisin ve gentamisin gibi antibiyotiklere karşı da direnç gelişmiştir (Gülay 2002, Namıduru ve Karaoğlan 2003). Antibiyotiklere karşı hızlı direnç geliştiren stafilokokların penisilin direncini makrolid, tetrasiklin ve aminoglikozid antibiyotik dirençleri izlemiştir. 1951 yılında çoğul dirençli *S. aureus* izolatlarının varlığı ortaya konulmuştur. (Cengiz 1999).

Penisilin dirençli *S. aureus* izolatlarının sağaltımı için 1960 yılında penisilinaza dirençli semisentetik bir penisilin olan metisilin üretilmiştir. Böylece stafilokok infeksiyonlarının tedavisinde ikinci büyük başarı kazanılmıştır (Özkütük ve ark 2003, Von Specht ve ark 2006).

Ancak bir yıl sonra metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) izolatları ortaya çıkmış ve bu durum tedavi seçeneklerini oldukça sınırlandırmıştır (Livermore 2000). 1970'li yılların sonu ile 1980'li yılların başlarından itibaren de MRSA suşlarında çoklu antibiyotik direnci ortaya çıkmaya başlamıştır (Sipahi ve ark 2007, Henriques ve ark 2010).

MRSA toplum ve hastane kaynaklı infeksiyonlarda çok önemli bir etkindir ve neonatal infeksiyonların önemli bir sebebidir (Ross ve ark 2005, Bertin ve ark 2006). MRSA, halk sağlığını tehdit eden dünya çapında ciddi bir problem haline gelmiştir (Guzman-Blanco ve ark 2009).

Son zamanlarda gündeme gelen vankomisin dirençli *S. aureus* olguları da kaygı oluşturmaktadır (Shutt ve ark 2005).

### 1.7.8. Stafilokokal Enzimler

#### **Koagulaz**

Patojen stafilokokların sentezlediği en önemli enzimlerden birisi olan koagulaz ısıya dirençli, filtrelerden geçebilen, plazmayı koagule eden, plazmadaki antifagositik faktörü de hidrolize edebilen ve patojeniteye önemli derecede katkı sağlayan bir enzimdir (Pottumarthy ve ark 2004).

Protein bileşiminde ve özel antijen yapısında olan koagulaz, stafilokoklardan başka *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis* gibi bazı bakteriler tarafından da meydana getirilebilmektedir (Koneman ve ark 1997, Bilgehan 2000).

İnsan veya tavşan plazması ile temasta bırakılan stafilokoklar veya bunların kültür süzüntüleri bir süre sonra plazmayı pıhtılaştırmaktadır. Bu tip stafilokoklar girdikleri organizmada koagulazları sayesinde bir fibrin zırhı ile kaplanarak fagositoza karşı korundukları gibi normal serumun bakterisit aktivitesini de önleyerek patojenite özelliği kazanmaktadırlar. Serbest veya bağlı koagulazın etkisiyle mikroorganizmanın fibrin ile kaplanması sonucu opsonizasyondan ve fagositozdan korunabildiği bildirilmiştir (Koneman ve ark 1997, Muratoğlu 2010).

Ekstraselüler bir proenzim olan koagulaz, *S. aureus* izolatlarında hücreye bağlı koagulaz (clumping faktör, CF) ve serbest koagulaz olmak üzere iki şekilde bulunabilmektedir. CF, plazmadaki fibrinojene etki ederek fibrine dönüştürmekte ve hücre yüzeyinde fibrin presipitasyonu meydana gelmektedir. Bunun sonucu olarak stafilokoklar aglutine olarak kümeleşmekte aynı zamanda birbirlerine bağlanabilmektedir. Serbest koagulazın etkisini gösterebilmesi için trombine benzeyen bir faktöre (Coagulase-Reacting Factor, CRF) ihtiyaç duyulmaktadır. Serbest koagulaz, CRF'yi aktive ederek plazmayı pıhtılaştırmaktadır. Serbest koagulaz ve CF, hem immunolojik yapıları hem de etki mekanizmaları yönüyle birbirlerine göre farklılık göstermektedir. Bu antijenlerin farklı enzimatik mekanizma ile plazmayı pıhtılaştırdıkları belirlenmiştir. Bu nedenle CF tespitinde lamda

koagulaz, serbest koagulaz tespitinde de tüpte koagulaz testi yaygın olarak kullanılmaktadır (Muratoğlu 2010).

Koagulasyon testi, tavşan kanı plazması ile yapılmaktadır. Plazmadan bir damla alınarak lam üzerinde *S. aureus* kültürü ile karşılaştırıldığında kümeleşme (topaklaşma) meydana gelirse bu durum CF ile plazma fibrinojeninin reaksiyona girdiğine işaret etmektedir. Tüp içinde tavşan plazması ile yapılan testte hücrelerin serbest koagulaz enzimlerinin etkisiyle plazmanın koagulasyonu gerçekleşmektedir. *S. aureus* suşlarının tamamının koagulaz üretmediği ve başka stafilocok türlerinin de CF veya serbest koagulaz ürettikleri belirlenmiştir. *S. aureus* suşlarında koagulaz aktivitesi ile enterotoksin oluşumu arasında yüksek bir korelasyon mevcuttur (Tükel ve Doğan 2000).

Stafilokokların sınıflandırmasında koagulaz üretimi en önemli biyokimyasal özelliklerdendir. Koagulaz pozitif olan stafilocoklar *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. aureus subsp. anaerobius*, *S. delphini*, *S. schleiferi subsp. coagulans*, *S. lutrae* ve *S. pseudointermedius*'tur. Gıdalar için önemli olan grup, koagulaz pozitif olan ve stafilocokal gıda zehirlenmelerine neden olan enterotoksijenik stafilocokların yer aldığı gruptur (Frenay ve ark 1999, Devriese ve ark 2005, Takashi ve ark 2010).

Koagulaz, patojen stafilocok izolatlarının ayırımında kullanılan önemli bir özellik olmakla birlikte patojenitede kesin olarak belirleyici bir faktör değildir; çünkü koagulaz ve termonükleaz negatif olan bazı stafilocok izolatlarının da enterotoksin oluşturabildiği bildirilmiştir. Bazı KPS türleri enterotoksin üretmezken bazı KNS türleri enterotoksin üretebilmektedir (Seo ve Bohach 2007). Gıda zehirlenmeleri olgularında koagulaz ve termonükleaz pozitif stafilocokların izole edilebildiği, bu iki özelliğin önemli olduğu ve bunların yanı sıra KNS'lerin de toksin oluşturarak gıda zehirlenmelerine neden olabileceği bildirilmiştir (Jay ve ark 2005).

Bautista ve ark (1988), yapmış oldukları bir çalışmada koagulaz negatif özellik gösteren *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. xylosus* türlerinin A, B, C ve D tipi toksinlerden bir veya birkaçını üretebildiklerini bildirmişlerdir. Fukuda ve ark (1984), köpeklerden izole ettikleri *S. intermedius* suşlarının A, B ve C toksinlerinden bir veya birkaçını oluşturabildiklerini, Crass ve Bergdoll (1986), koagulaz ve termonükleaz negatif stafilocoklar ve *S. epidermidis* tarafından A ve C

tipi toksinlerin oluşturulabildiğini bildirmiştir.

### **Katalaz**

Bütün stafilokoklar katalaz enzime sahiptir. Bakteriler bu enzim sayesinde toksik oksijen radikallerine karşı direnç kazanmaktadır. Fagositoz veya bakteri metabolizması sonucu oluşan hidrojen peroksit, su ve toksik olmayan oksijene çevrilerek bakteriler toksik etkilerden korunmaktadır (Arda ve ark 1997).

### **Deoksiribonükleaz**

KPS'lerin çoğu deoksiribonükleaz oluşturmaktadır. Deoksiribonükleaz enziminin üretimi, koagulaz enziminden sonra patojeniteyi belirleyen en önemli özellik olduğu için patojen stafilokokların ayırımında önemlidir. Deoksiribonükleaz enzimi, endo ve ekzonükleaz aktivitesine sahip nükleazları 3-fosfomononükleotidlere parçalayan fosfodiesterazdır. *S. aureus* izolatları DNA içeren besiyerinde deoksiribonükleaz enzimi ile ortamdaki DNA'ları hidrolize etmekte ve koloni çevrelerinde zon oluşumuna neden olmaktadır (Tükel ve Doğan 2000, Gündoğan ve ark 2005).

Deoksiribonükleaz deneyi, % 0,2 DNA içeren besiyerlerine ekilen stafilokokların üredikleri yerde ve çevrelerindeki DNA'yı eritmelerini araştırmak suretiyle yapılmaktadır (Koneman ve ark 1997, Bilgehan 2000).

### **Lesitinaz**

Bu enzim, yumurta sarısı ve insan serumunda bulunan lipoprotein kompleksini ayrıştırma özelliğine sahiptir. Lesitinaz aktivitesi, koagulaz üretimi, enterotoksin oluşturması ve termonükleaz aktivitesi, *S. aureus*'un dört önemli özelliğidir. *S. aureus* suşları genellikle fosfolipaz C (lesitinaz) aktivitesi göstermektedir. Bu özelliği nedeniyle yumurta sarısının emülsiyon halde katıldığı besiyerlerinde *S. aureus*'un tanısı kolaylaşmaktadır. Ürettikleri lesitinaz, besiyerinde yumurta sarısı emülsiyonunda bulunan lesitini hidrolize ederek koloninin etrafında berrak bir zonenin oluşmasına sebep olmaktadır. Ancak bu tür besiyerlerinde zonsuz atipik koloni oluşturan *S. aureus* suşlarının da geliştiği saptanmıştır. Örneğin Baird-Parker agar üzerinde tipik koloniler gibi siyah koloni oluşturan ancak lesitinaz

aktivitesi göstermeyen (zonsuz), mukozalı yapıda ve enterotoksin H üreten *S. aureus* izole edilmiştir (Tükel ve Doğan 2000).

### **Lipaz**

Plazma ve deri yüzeyinde biriken yağlı maddeler üzerinde etkili olan lipaz, lipidleri hidrolize ederek vücudun yağ bakımından zengin bölgelerinde, deri ve deri altında stafilokokların kolonize olmalarına yardımcı olmaktadır. Özellikle yüzeysel deri ve deri altı infeksiyonlarına neden olan stafilokoklarda bu enzim bulunmaktadır (Koneman ve ark 1997, Bilgehan 2000).

Lipaz, ekstraselüler bir enzim olup logaritmik üreme fazı boyunca sentezlenmektedir. Birçok stafilokokal suşun virulensinin artmasında önemli rol oynamaktadır. Plazma ve yağ dokularına etki ederek vücut yüzeyinde etkenin akümüle olmasını sağlamaktadır (Sardel ve McKillip 2004).

### **Hyaluronidaz**

*S. aureus* izolatlarının yaklaşık % 90'ı hyaluronidaz enzimi üretmektedir. Bu enzim, bağ dokusunun hücre matriksindeki mukopolisakkarit asidin bir grubu olan hyaluronik asidi hidrolize etmektedir. Stafilokokların doku içerisinde yayılmasını sağladığı için bu enzim aynı zamanda “yayılma faktörü” olarak da adlandırılmaktadır (Arda 1997, Cengiz 1999).

Hyaluronidaz, bağ dokuda bulunan hyaluronik asidin depolimerizasyonu suretiyle stafilokokların konakçı dokularında yayılmasını sağlayan ve antijenik özelliği olan bir maddedir (Koneman ve ark 1997, Bilgehan 2000).

### **Stafilokinaz**

Streptokoklarda olduğu gibi stafilokoklarda da fibrinolitik etki vardır. Bakteriler tarafından salınan kinazlar, plazmada bulunan plazminojen veya profibrinolizini aktive ederek plazmin (fibrinolizin) oluşturmaktadır. Fibrinolitik etki bu madde aracılığıyla oluşmaktadır (Koneman ve ark 1997, Bilgehan 2000). Plazminojeni plazmine dönüştürebilen ısıya dirençli stafilokinaz, genellikle insan orijinli koagulaz pozitif *S. aureus* izolatları tarafından üretilen stafilokokal fibrinolizindir (Cengiz 1999).



Plazminojen aktivatörü olan stafilokinaz, fibrin pıhtısının çözülmesine neden olmaktadır. Ayrıca fagositoz için önemli komponentler olan opsoninlerin parçalanmasını sağlayarak bakteriyi fagositozdan koruduğu bildirilmiştir (Rooijackers ve ark 2005).

### **Termonükleaz**

Termonükleaz, koagulaz pozitif *S. aureus*'ların % 90-96'sında bulunan, konakçı hücrelerin DNA ve RNA'sını (ribonükleik asit) hidrolize edebilen, endo ve ekzonükleolitik özellikleri bulunan, fosfodiesteraz yapısında, ısıya dayanıklı bir stafilokokal nükleazdır (Cengiz 1999, Bannerman 2003).

Enterotoksijenik *S. aureus*'un özelliklerinden biri de termonükleaz üretimidir. Termonükleaz üretimi *S. aureus* izolatlarının identifikasyonunda doğrulayıcı bir test olarak kullanılmaktadır (Bannerman 2003). Ancak koagulaz ve termonükleaz testlerinin identifikasyon ve tür ayrımı için yeterli olmadığı bildirilmiştir (Gandra ve ark 2005).

*S. aureus* intoksikasyonlarında etkeni taşıyan gıdada hem *S. aureus*'un kültürel yöntemle belirlenmesi, hem de toksinin gösterilmesi aynı anda paralel yapılmalıdır. Toksinin belirlenemediği durumlarda koagulaz pozitif *S. aureus* suşlarının gıdadaki sayısı önemli olmaktadır. Ancak asitliğin fazla geliştiği veya ısı işlem uygulanan gıdalarda önceden üremiş ve toksin oluşturmuş *S. aureus* suşları ölebilmekte ve ortamdaki varlıkları belirlenememekte ya da çok düşük sayıda belirlenmektedir. Ortamda *S. aureus*'un belirlenememesi, gıdada toksin olmadığı anlamına gelmemektedir. Böyle durumlarda ortamda termonükleazın varlığının gösterilmesi patojen stafilokokların  $1,0 \times 10^5$  (kob/gr) düzeyinde çoğaldıktan sonra ortamdaki çekildiklerine işaret edebilmektedir. Termonükleaz varlığı stafilokok varlığını kanıtlayabilmektedir fakat enterotoksin varlığının göstergesi değildir. Ayrıca diğer bazı bakterilerin de termonükleaz oluşturabilecekleri gözden kaçırılmamalıdır (Tükel ve Doğan 2000).

### **Beta Laktamaz**

Betalaktamaz (penisilinaz) üreten bakteriler penisilin ve analoglarının betalaktam halkasındaki amid bağını hidrolize ederek penisilolik asit oluşturmaktadır.

Stafilokoklar salgıladıkları bu enzim ile betalaktam grubu antibiyotiklere karşı dirençli hale gelmektedir. Bu durum patojenite artışına yol açmaktadır (Bilgehan 1995).

Klinik kullanıma girdiği dönemlerde stafilocokların hemen hemen tümünün penisiline duyarlı olduğu, günümüzde ise duyarlılığın % 5 ve altına düştüğü belirtilmektedir. Bu enzimleri kodlayan genler aktarılabılır özellikteki plazmidler üzerinde bulunduğundan diğer izolatlara hızlıca yayılım göstermektedir (Bilgehan 2000).

### **1.7.9. Stafilokokal Toksinler**

#### **Sitolitik Toksinler**

Sıvı besiyerlerinde üretilmiş stafilocokların kültür süzüntülerinde ekzotoksin niteliğinde maddelerin bulunduğu ve bunların eritrosit ve çeşitli hücreler üzerinde sitolitik, deney hayvanları üzerinde de öldürücü etkilerinin bulunduğu bilinmektedir. Bu toksinlere karşı organizmada nötralizan antikorlar oluşmaktadır. Bunlar alfa, beta, gama ve delta toksinlerdir (Koneman ve ark 1997, Bilgehan 2000).

#### **-Alfa Toksin (Alfa Hemolizin)**

Alfa toksin, ilk kez 1900 yılında Kraus ve Clairmont tarafından tanımlanmıştır (Cengiz 1999).

Geniş bir biyolojik etkinlik alanı olan alfa toksinin hemolitik, dermatolojik, lizozom parçalayıcı ve doku kültürlerinde sitolitik etkileri vardır. Dolaşım, kas ve böbrek korteksi dokuları alfa toksine karşı duyarlıdır. Alfa toksin bu dokular üzerinde tahribat yapmaktadır (Koneman ve ark 1997, Bilgehan 2000).

Alfa toksinler eritrosit, lökosit, trombositler dâhil olmak üzere çeşitli membranlarını parçalayarak etki etmektedir. Tavşan eritrositleri için hemolitik aktivitesi en fazla olan toksindir. İnsan eritrositlerine karşı fazla etkisi bulunmamaktadır. İnsan makrofajları ve trombositleri üzerine litik etkisi olmasına karşın monositlere karşı etkisizdirler. *S. aureus*'ların en iyi karakterize edilen toksinidir. Tavşanlara intravenöz olarak 1ng enjekte edildiğinde letal etki göstermektedir (Bilgehan 2000, Dinges ve ark 2000).

Dermonekrotik ve nörotoksik özelliği olan alfa toksin, birçok suş tarafından yüksek oranda sentezlenmektedir. Pek çok hücre tipine zarar veren alfa toksin, santral sinir sistemine toksik etki etmektedir. Düz kasların ve iskelet kaslarının paralizisine sebep olmaktadır (Arbuthnott ve ark 1990).

Alfa toksin, 33 kilodalton molekül ağırlığında ve hasar gücü yüksek bir toksindir. Antijenik özelliktedir ve anti toksini ile nötralize olmaktadır (Biçer 2009).

#### -Beta Toksin (Beta Hemolizin)

İlk kez Glenny ve Stevens tarafından 1935 yılında tanımlanmış olan bu toksin, yağ açısından zengin membranları hasara uğratan bir stafilokokal sfingomiyelinazdır. Sfingomiyeline etki ederek eritrositleri parçalamaktadır. Koyun ve insan eritrositlerini eritmektedir (Bilgehan 2000, Dinges ve ark 2000). İnsanlarda hastalık oluşturan *S. aureus* izolatlarında en çok bulunan sitolitik toksinler, alfa ve beta toksinlerdir (Dinges ve ark 2000).

Beta toksin antijeniktir ve antitoksini ile nötralize olmaktadır. Aktivasyonu için magnezyum ve kobalt iyonlarına gereksinim vardır (Cengiz 1999).

Alfa ve beta toksin, insanda hastalık yapan KPS suşlarında predominant olarak bulunmaktadır. KPS'lerin % 95'inde bunlardan biri veya diğeri bulunurken % 82'sinde her ikisi de birlikte bulunabilmektedir (Cengiz 1999, Dinges ve ark 2000).

#### -Gama Toksin (Gama Hemolizin)

1938 yılında Smith ve Price tarafından tanımlanan gama toksin, Möllby Wadströn tarafından izole edilmiştir (Cengiz 1999). Belirgin bir hemolitik etkisi vardır. İnsan dâhil birçok türün eritrositlerini hemoliz etmektedir. Mekanizması tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır (Dinges ve ark 2000).

İnsan, tavşan ve koyun alyuvarları gama toksine karşı duyarlı iken at ve kuş alyuvarları dirençlidir. Hemen hemen tüm *S. aureus* suşları gama hemolizin sentezlemektedir (Dinges ve ark 2000).

## -Delta Toksin (Delta Hemolizin)

Delta toksin, ilk kez 1947 yılında Williams ve Harper tarafından bildirilmiştir. Molekül ağırlığı 103 kilodalton olan delta toksin, antijenik değildir. Litik spekturumu oldukça geniştir ve dermonekrotik etkisi de saptanmıştır. Memelilerin eritrosit, lökosit, makrofaj, lenfosit ve trombositlerini hasara uğratan bir proteindir (Cengiz 1999, Bilgehan 2000).

Adenozin monofosfat birimini stimüle ederek iyon permeabilitesini değiştirmekte ve ileumda su absorpsiyonunu inhibe etmektedir (Koneman ve ark 1997).

## **Lökosidin**

Patojen stafilokokların birçoğu tarafından oluşturulan ve Panton Valentine Lökosidini olarak bilinen bu toksin, sadece insan ve tavşanlara ait polimorf çekirdekli lökositler ve makrofajlar üzerinde litik etkiye sahiptir. Diğer hücre tiplerine etki etmemektedir. Panton Valentine Lökosidini sitotoksisiteye sahiptir fakat diğer toksinlerin aksine non-hemolitiklidir (Dinges ve ark 2000).

Toksin elektroforetik olarak birbirinden ayrı F (Fast) ve S (Slow) olmak üzere iki protein komponentinden oluşmaktadır. Her iki komponent de antijeniktir ve formaldehitte toksoide dönüştürülebilmektedir. Lökositleri harap ettiği ve fagositozu engellediği için virulansta önemli rol oynamaktadır. Bu komponentler tek tek hareket ettikleri zaman lökositler üzerinde etkileri yoktur. Fakat birleştikleri zaman lökositlerin hücre membranlarında değişiklik yaparak permeabiliteyi arttırmaktadırlar. Hareket yeteneğini kaybeden hücre, şişerek granüllü ve yuvarlak bir şekil almakta ve yavaş yavaş parçalanmaktadır (Bilgehan 2000, Bhatia ve Zahoor 2007).

Genel olarak *S. aureus* izolatlarının sadece % 2'si lökosidin sentezleyebilmektedir. Fakat şiddetli dermonekrotik lezyonlardan izole edilen izolatların yaklaşık % 90'ında bu toksinlere rastlanmaktadır. Bu toksin, nekrotik doku lezyonlarında önemli bir faktör olarak görülmektedir (Dinges ve ark 2000).

Panton Valentine Lökosidini *S. aureus*'un spesifik ekzotoksinidir ve genellikle bazı deri infeksiyonları ve nekroze pneumoni ile ilişkilidir. Ancak onun virulans belirleyici rolü halen tartışılmaktadır (Moroney ve ark 2007).

### **Eksfoliyatif Toksin**

Eksfoliyatif Toksin, epidermolitik toksin ya da eksfoliatin olarak da bilinmektedir. İnsanlarda veziküler ve eksfoliyatif deri lezyonlarından sorumlu toksindir. İnsanlarda “Staphylococcal Scalded Skin Syndrome” (Soyulmuş Deri Sendromu) olarak adlandırılan ve epidermisin stratum granulosum tabakasında çeşitli oranlarda çatlaklarla karakterize bir hastalığa neden olmaktadır. Bu toksin çocuklarda da deri yüzeyinde değişik lezyonlara neden olmaktadır. Stafilokokların eksfoliyatif toksinine bağlı olarak ortaya çıkan, epidermis hasarı ve deride soyulmayla karakterize bir klinik tablo ile seyreden “Soyulmuş Deri Sendromu” (yenidoğanlar için Ritter hastalığı) 5 yaşın altındaki çocuklarda görülmektedir (Waldvogel 2000).

Bu toksinin Eksfoliyatif Toksin-A ve Eksfoliyatif Toksin-B olarak adlandırılan, antijenik ve biyokimyasal olarak birbirinden farklı iki serotipi bulunmaktadır (Aygen 2008). Eksfoliyatif Toksin-A kromozomal, Eksfoliyatif Toksin-B ise plazmide bağlı genler tarafından oluşturulmaktadır. Bu toksinlerin epidermisin bütünlüğünü koruyan proteini hedef alan proteaz ve esteraz aktiviteleri bulunmaktadır. İmmunolojik ve biyokimyasal olarak birbirinden farklı olarak değerlendirilen bu toksinlerin ortak özelliği süperantijen yapıda olmaları ve proteolitik aktiviteye sahip olmalarıdır (Koneman ve ark 1997). Her iki toksin de epidermisin stratum granulosum tabakasını oluşturan hücrelerin interselüler bağlarının kopmasına ve stratum granulosumun ayrılmasına neden olmaktadır (Takagi ve ark 1990).

Derinin granüler katmanında bulunan hücreler üzerindeki litik etkileri ile lezyon oluşturan bu toksinler, yangısal tepkime oluşturmamakta ve primer olarak hücre ölümüne yol açmamaktadır. Özellikle T lenfositler üzerinde mitojen etkiye sahiptirler (Koneman ve ark 1997, Bilgehan 2000)

## **Pirojenik Ekzotoksinler**

Protein yapısındaki pirojenik toksin A, Schlieverth ve arkadaşları tarafından 1979 yılında tanımlanmıştır. Bunlara pirojenik toksin B ve pirojenik toksin C eklenmiştir. Bunlar mitojen, pirojen ve endotoksin şokunu artırıcı özelliklere sahiptir. Enterotoksin ve TSST-1 de pirojenik etkiler göstermektedir (Cengiz 1999).

Stafilokoklar, "pirojenik toksik süperantijen" olarak adlandırılan bir grup toksin üretebilmektedirler. Bu toksinler en az üç biyolojik özellik göstermektedir. Bunlar pirojenite, toksisite ve en karakteristik olanı süperantijenitedir (Vasconcelos ve Da Cunha 2010).

SE'ler, TSST-1 ve ekzfoliyatif toksinler birer süper antijendir. Süperantijen terimi, ilk kez 1989 yılında normal peptid veya protein antijenlerden bazı farklı özellikleri olan bakteriyel kaynaklı antijenik yapılar için kullanılmıştır. Normal antijenik yapılar, hücreler üzerindeki doku uygunluk proteinlerine bağlanarak T lenfosit reseptörleriyle kompleks meydana getirmektedir. Böylece göreceli olarak az sayıda T lenfosit aktive olmaktadır. Süperantijenlerin normal antijenik yapılardan en önemli farkı, daha fazla sayıda T lenfosit aktive edebilmeleridir. Süperantijen özelliği gösteren mikrobik antijenler ile süperantijenlerin normal immun cevaptaki ve çeşitli hastalıklardaki rolü giderek daha iyi anlaşılmaktadır. Süperantijenler, normal antijen-doku uygunluk kompleksi (MHC-Major Histocompatibility Complex) tarafından aktive edilen T lenfositlerden çok daha fazla sayıda T lenfosit aktive edebilen antijenik yapılardır (Yücel ve Yücel 1996).

SE'lerin süperantijen olduğu ve mobil genetik elemanlar tarafından kodlandığı bildirilmektedir (Leterle ve ark 2003, Bania ve ark 2006).

## **Toksik Şok Sendromu Toksini (TSST- 1)**

İlk olarak 1978 yılında Todd tarafından tanımlanarak önemi ortaya konulmuştur. "Toksik Şok Sendromu" akut, potansiyel ölümcül bir olgu olup yüksek ateş, yaygın deri döküntüsü ve hipotansiyon ile karakterizedir (Muratoğlu 2010).

TSST-1, önce enterotoksin olarak tanımlanmış ve "Stafilokokal Enterotoksin F" ve "Stafilokokal Pirojenik Ekzotoksin C" olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra

yapılan hayvan deneyleri sonucunda diğer enterotoksinlere kıyasla emetik aktivite göstermediği ortaya çıkmış ve “Toksik Şok Sendromu Toksini-1” olarak adlandırılmıştır (Schlievert ve ark 2004).

*S. aureus*'un klinik izolatları, patojenitelerine katkıları olan TSST-1, SE'ler, eksfoliyatif toksinler ve lökositinlerden bir ya da daha fazlasını sentezleyebilmektedirler. TSST-1 ve enterotoksinler, pirojenik toksin süperantijenler olarak bilinmektedirler (Dinges ve ark 2000).

TSST-1, 22 kilodalton molekül ağırlığında, tek zincirli bir protein olup sıcaklığa ve proteolitik enzimlere karşı dirençlidir (Koneman ve ark 1997).

#### **1.7.10. Stafilokokal Enterotoksinler**

Enterotoksijenik stafilokok türleri tarafından sentezlenen, sindirim ve sinir sistemi üzerine etki ederek dünyada çok yaygın olarak görülen gıda kaynaklı intoksikasyonlara sebep olan proteinlerdir (Küplülü ve ark 2002).

1914 yılında Barber stafilokok mastitisi olan bir ineğin sütünün içilmesiyle başlayan akut gastroenterit tablosunu rapor etmiştir. Dack 1930 yılında enterotoksin oluşturan stafilokok hücre süspansiyonlarının sindirim yoluyla alınması sonucu besin zehirlenmesinin meydana geldiğini ortaya koymuştur (Cengiz 1999).

#### **Stafilokokal Enterotoksinlerin Yapısı, Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri**

SE'ler, suda çözünebilir, tek zincirli, 26-35 kilodalton molekül ağırlığında globuler ve heterojenik bir protein grubudur (Sharma ve ark 2000, Gran ve ark 2003). Basit proteinlerden oluşan SE'lerin çoğu nötral ya da bazik proteinlerdir (Jablonski ve Bohach 1997). SE'ler hidroliz yoluyla 18 aminoasit üretebilmekte ve yüksek oranda lizin, aspartik asit, glutamik asit ve tirozin içermektedir (Jay ve ark 2005).

SE'lerin DNA analizi çalışmalarında ilk olarak stafilokokal enterotoksin B (SEB)'nin aminoasit dizilimi belirlenmiştir. Aminoasit bileşimi yönünden stafilokokal enterotoksin A (SEA), stafilokokal enterotoksin D (SED) ve stafilokokal enterotoksin E (SEE) birbirlerine benzemektedir. SEB ise SEC<sub>1</sub>, SEC<sub>2</sub> ve SEC<sub>3</sub>'e

benzerlik göstermektedir. Benzerlikler özellikle metiyonin ve löysin içerikleri yönündendir (Erol ve İşeri 2004).

Enterotoksinler pH<2'de pepsin hariç insan intestinal sisteminin proteolitik enzimlerine dirençlidir. Enterotoksinlerin proteolitik enzimlere (tripsin, kimotripsin, kimozin, rennin, papain gibi), düşük pH değerine ve relatif yüksek ısıya dirençli olması gıda intoksikasyonları açısından önemlidir (Erol ve İşeri 2004, Milci ve Yaygın 2006).

SE'ler ısıya oldukça dirençlidirler. Isıya dayanıklılık SE'lerin en önemli özelliği olup gıdalardaki enterotoksinler pişirme, pastörizasyon veya diğer ısı uygulamaları ile tamamen inaktive edilememektedir (Jay ve ark 2005, Rall ve ark 2008).

Enterotoksinlerin ısıya dirençleri, enterotoksinin tipi, gıdanın türü, ortamın pH değeri ve tuz konsantrasyonları ile ilişkilidir. SEB, ısıya en dirençli toksin olarak gösterilmektedir (Bhunja 2008).

Termal dayanıklılıkta önemli kriterler toksinin saflığı, serolojik tipi, başlangıç toksin miktarı, ısı işlemi uygulanan medium, ortamın pH değeri, tuz konsantrasyonu ile teşhis ve saptama yöntemidir (Balaban ve Rasooly 2000, Erol ve İşeri 2004, Ikeda ve ark 2005).

Baird-Parker (1990), SE'lerin 121 °C'de 3-8 dakikada yıkımlanmadığını ayrıca kurutma, soğutma ve dondurma işlemlerine karşı dirençli olduğunu bildirmiştir. Jay ve ark (2005) ise, SEA'nın termal inaktivasyonunun 121,1 °C'de 11 dakika olduğunu belirtmiştir.

Enterotoksinler higroskopik yapıda olup kolayca suda ve tuz solüsyonunda çözünebilir özelliktedirler. İzoelektrik noktaları 7,0 ile 8,6 arasında değişmektedir (Erol ve İşeri 2004).

*S. aureus* izolatları enterotoksinlerin bir veya birkaçını bir arada üretebilmektedir. Enterotoksin tipleri içerisinde SEA ve SED'nin sıklıkla, SEC'nin kısmen, SEB ve SEE'nin ise nadiren intoksikasyona neden olduğu bildirilmiştir (Doyle ve Beuchat 2007). SEA ve SED'e sıklıkla rastlanmasının nedeni, bu toksinlerin asıl kaynağının insan olması, logaritmik üreme fazında primer metabolit



olarak üretilmesi, ayrıca SEA'nın olumsuz koşullar altında oluşturulabilmesidir. Buna karşın SEB ve SEC, sekonder metabolit olarak ortaya çıkmakta olup ancak logaritmik üreme fazının sonunda oluşabilmekte ve pratik koşullarda da bu durum 20 saatten az olan inkübasyon sürecinde gerçekleşmemektedir (Muratoğlu 2010). SEA, *S. aureus*'un logaritmik üreme fazının ilk döneminde üretildiğinden dolayı çevre şartları optimal olmasa bile intoksikasyon oluşturabilecek düzeye ulaşabilmektedir. Bu nedenle SEA, gıda zehirlenmelerinde en yaygın görülen enterotoksin tipidir (Tsai ve Li 2008).

İlk identifiye edilen enterotoksin SEB'dir. İkinci identifiye edilen enterotoksin ise SEA'dır (Erol ve İşeri 2004). *S. aureus* toksinleri içerisinde en toksik olanı SEA'dır. Isıya en dayanıklı olan ise SEB'dir. Bundan dolayı ikisinin yapısı moleküler düzeyde araştırılmıştır (Tükel ve Doğan 2000).

### **Stafilokokal Enterotoksinlerin Klasifikasyonu**

Enterotoksinler, özgül antikorları ile verdikleri immunolojik reaksiyonlarla birbirlerinden ayrılmaktadırlar (Cengiz 1999). SE'ler, emetik toksinler olup kimyasal ve antijenik özellikleri esas alınarak alfabetik sıralamaya göre adlandırılmaktadır. Temel olarak beş serotipe ayrılmaktadır (SEA, SEB, SEC, SED, SEE). Fakat son yıllarda yeni tip enterotoksinlerin (SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SEU) de varlığı rapor edilmiştir (Omoe ve ark 2002). Ayrıca yeni tanımlanan gen sekansları ile SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SEU genlerinin yapıları belirlenmiştir (Omoe ve ark 2003, Orwin ve ark 2003). Pek çok SE tipi serolojik olarak identifiye edilmekte ve SEA ile SEU arasında isimlendirilmektedir (Lamprell ve ark 2004).

Bazı SE'ler, klasik enterotoksinler gibi primatlar üzerinde kusmaya neden olmadıklarından dolayı "stafilokokal enterotoksin benzeri toksinler" olarak (SE-like, SEI) tanımlanmışlardır (Ünal 2013).

### **Stafilokokal Enterotoksinlerin Biyolojik Etkinliği ve Toksisitesi**

Stafilokokal gıda zehirlenmesi, enterotoksijenik stafilokokların logaritmik fazdan sabit faz başlangıcına kadar sentezledikleri toksinlerin alimenter yolla alınması sonucu oluşmaktadır (Argudin ve ark 2010).

Kısa inkübasyon süresi, gıda intoksikasyonunun en önemli işaretidir. Akut semptomların süresi genellikle 24 saatten daha kısa olup ölüm oranı çok düşüktür (Küplülü ve ark 2002). Stafiloenterotoksikozis vakalarında inkübasyon süresi 1-6 saattir (genellikle 2-4 saat). Hastalık süresi ise 1-2 gündür (bazen aylarca). Semptomlar bulantı, kusma, karın ağrısı ve ishaldir (Doğruer 2004).

Kusma, stafilokokal gıda zehirlenmelerinde sıklıkla görülen predominant ve ciddi bir semptomdur. Toksinlerin bağırsaktaki lokal sinir reseptörlerini uyarmasına bağlı olarak vagus ve sempatik sinirler üzerinden geçen impulsların beyin subkortikal kusma merkezini uyarması sonucu emetik tepki oluşmaktadır (Sutherland ve Varnam 2002).

Stafilokokal gıda zehirlenmelerinde görülen ikinci en yaygın semptom ishaldir. Enterotoksinler intestinal epitelyum hücrelerine zarar vermekte ve intestinal vilileri parçalamaktadır. SE'lerin intestinal hücreler üzerine direkt etkisi açık değildir ve bu yüzden kolera toksini veya *E. coli* enterotoksinleri gibi enterotoksinlerden farklıdır (Sutherland ve Varnam 2002).

Baş ağrısı, baş dönmesi, genel halsizlik, nabızda zayıflık, yüzeysel solunum ve şok daha az görülen diğer semptomlardır (Jorgensen ve ark 2005a). Vücut sıcaklığı genellikle düşüktür ve su kaybı fazladır. Şiddetli zehirlenmelerde dışkı ve kusmakta kana rastlanabilmektedir. Görülen diğer belirtiler terleme, üşüme, abdominal kramplar, halsizlik ve şok durumlarıdır (Gülbandılar 2006, Bendahou 2008).

SE'nin etkisi şahıslara göre değişim göstermektedir. Aynı miktarda toksin alan şahısların bazılarında semptom görülmezken bazılarında ise hafif veya şiddetli semptomlar görülebilmektedir. Bebekler, yaşlılar ve hastalar gibi riskli gruplarda çok daha düşük kontaminasyon seviyelerinde de sağlık sorunları ortaya çıkabilmektedir. Stafilokokal gıda zehirlenmesi olguları genellikle ölümcül değildir. Ancak ölümle sonuçlanmış vakalar da bildirilmiştir (Ellis ve ark 2003, İşeri ve Erol 2009).

SE'ler çocuklarda ve yaşlılarda nadiren ölüme sebep olmaktadır (Berdgoll ve Lee Wong 2006, Stewart 2003). Çocuk ve yaşlılarda ölüm oranının % 0.03'ten % 4,4'e kadar değişebildiği bildirilmiştir. İnsanlar, kediler ve maymunlar SE'ye karşı oldukça hassastır ( Jay ve ark 2005, Bhunia 2008).

Toksinin tipi, minimal doz üzerinde etkili olmaktadır. İntoksikasyona neden olan minimal toksin dozu ile ilgili farklı görüşler bildirilmiştir. Sutherland ve Varnam (2002), intoksikasyona sebep olan SE dozunun toksinin tipine bağlı olarak değiştiğini ve genel olarak yenilen gıdada 1 ng/g SE bulunmasının semptomların ortaya çıkması için yeterli olduğunu belirtmişlerdir.

Le Loir ve ark (2003), stafilokokal toksin içeren gıdaların alınması ile zehirlenme tablosunun oluşabilmesi için genellikle 100 g gıdada 1 µg toksinin bulunması gerektiğini belirtmişler, okul çocuklarında çikolatalı süttten ileri gelen bir stafilokokal gıda zehirlenmesi olayında 0.2 µg düzeyindeki SEA'nın zehirlenmeye yol açtığını bildirmişlerdir.

Deneysel çalışmalarda gönüllülerde 0.14 µg/kg enterotoksin dozu ile orta şiddetli intoksikasyon oluşturulmuş ise de doğal stafilokokal intoksikasyonlardan elde edilen bulgular, toksin dozunun  $\leq 1$  µg/kişi olduğunu göstermektedir (Stewart ve ark 2003). Yetişkin insanda intoksikasyonun meydana gelmesi için 0.1-1 mg enterotoksinin gıda ile alınması yeterlidir (Küplülü ve ark 2002).

SE'ler, gıda zehirlenmelerinin yanı sıra toksik şok benzeri sendroma, artritise, alerjik reaksiyonlara ve otoimmün hastalıklara neden olmaktadır (Krakauer 1999, Balaban ve Rasooly 2000). SE'lerin ayrıca spesifik olmayan T hücre proliferasyonunu uyaran süperantijen fonksiyonları da bulunmaktadır (Yücel ve Yücel 1996).

Stafilokokal gıda intoksikasyonlarının % 95'inin klasik enterotoksinler tarafından geri kalan % 5'inin ise sonradan tanımlanan SE'ler tarafından meydana getirildiği tahmin edilmektedir (Kwon ve ark 2004). Yeni tip SE'lerin gıda zehirlenmelerindeki rolü henüz kesinlik kazanmamıştır. Bazılarının emetik aktivite göstermediği, bazılarının ise halen test edildiği bildirilmiştir. Sonuç olarak bu enterotoksinlerin isimleri bazı bilimsel kaynaklarda "stafilokokal benzeri enterotoksin" (Staphylococcal enterotoxin-like) olarak da geçmektedir (Lina ve ark 2004, Vernozy - Rosand ve ark 2004).

Stafilokokal gıda zehirlenmelerinde enterotoksin oluşumuna sebep olan etken, çoğunlukla *S. aureus* olarak belirlenmiştir. Ancak *S. aureus* dışında bazı etkenler de enterotoksin oluşumuna sebep olabilmektedir. Bunlar *S. haemolyticus*, *S.*

*cohnii*, *S. xylosus*, *S. equorum*, *S. lentus*, *S. capitis* ve *S. intermedius*'tur (Muratoğlu 2010). *S. aureus*'un Baird-Parker agar üzerindeki atipik kolonilerinin veya koagulaz negatif suşların da enterotoksin oluşturabildikleri görülmüştür (Alişarlı ve Solmaz 2003, Gülbandılar 2006).

## **Stafilokokal Enterotoksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler**

### **Ekstraselüler Faktörler**

-Rekabetçi özellik:

Stafiloklar, karışık kültürlerde diğer mikroorganizmalar tarafından kolayca baskılanabilmektedir. *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* önemli baskılayıcı bakteriler olarak bildirilmektedir. Bunun yanında *E. coli*, *Pseudomonas*, *Serratia* ve *Aerobacter*, *S. aureus*'un gelişimi üzerine baskılayıcı etki göstermektedir (Ekici ve ark 2008).

Sıvı besi yerinde *P. cerevisiae* ve toksin oluşturan *S. aureus* suşları arasındaki etkileşimlerin 20 kat daha az SEA, SEB ve SEC oluşumu ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Erol ve İşeri 2004).

*S. aureus* rekabetçi özelliği zayıf bir bakteri olup gıdalardaki yarışmacı mikrofloraya oldukça duyarlıdır. Fermente gıdalarda laktik asit bakterileri tarafından üretilen laktik asit, hidrojen peroksit ve bakteriyosinler *S. aureus*'un gelişimini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu nedenle, uygulanan değişik işlemlerle normal florası inhibe edilen gıdalar, stafilokokal intoksikasyonlar açısından büyük risk taşımaktadır (Le Loir ve ark 2003, Charlier ve ark 2009).

*Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Lactobacillaceae*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* ve saprofitik flora *S. aureus* ile antagonistik etki oluşturmaktadır (Mossel ve Van Netten 1990). Gonzalez ve ark (1994), endüstride kullanılan *L. sake* ve *P. pentosaceus*'tan oluşan starter kültür kullanımının SEA, SEB, SEC<sub>1</sub> ve SED sentezini tamamen inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Mutluer ve ark (1993), salamura beyaz peynir yapımında *S. lactis* ve *S. cremoris* starter kültür kullanımının SEA, SEB, SEC ve SED oluşturma özelliğindeki *S. aureus*'un gelişimini ve toksin oluşumunu tamamen inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Buriti ve ark (2007) *S. thermophilus*'un, Anas ve ark (2008)

*L. paracasei subsp. paracasei* ve *L. rhamnosus*'un, Alomar ve ark (2008) ise *L. garvieae* ve *E. faecalis*'in *S. aureus* gelişimini inhibe ettiğini belirtmişlerdir.

-Kontaminasyon Düzeyi:

Enterotoksinler stafilokokların  $10^6$  (kob/g) veya daha yüksek sayıya ulaşması sırasında sentezlenen bir ekzotosindir (Cowell ve ark 2002, Erol ve İşeri 2004, Delbes ve ark 2006, Charlier ve ark 2008).

*S. aureus* sayısı  $10^5$  (kob/g) düzeyinde olduğu zaman kritik seviyeye ulaşmış olmaktadır. Bununla beraber daha düşük *S. aureus* sayısı, gıdanın kesinlikle güvenli olduğunu göstermemektedir (Tükel ve Doğan 2000).

Jablonski ve Bohach (2001) ise *S. aureus* sayısının  $10^3$ - $10^5$  (kob/g) düzeyine ulaşması halinde toksin oluşabileceğini ve bu durumun tüketici sağlığını tehdit edebileceğini rapor etmiştir.

-Atmosferik Koşullar:

Stafilokoklar aerob/fakültatif anaerob mikroorganizmalardır (Milci ve Yaygın 2006). Anaerobik koşulların *S. aureus*'un gelişimi ve SEA oluşumu üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada stafilokokal hücre yoğunluğunun aerobik koşullarda anaerobik koşullara göre 9-17 kat daha fazla olduğu bulunmuş ve SE oluşumunun mikroorganizma gelişimiyle ilgili olduğu gösterilmiştir (Belay ve Rasooly 2002).

-Sıcaklık:

Fujikawa ve Morozumi (2006), sütte *S. aureus* sayısının  $10^6$  (kob/ml)'ye ulaşması ile birlikte toksin miktarının doğrusal olarak yükseldiğini, toksin üretiminin de 14-32 °C arasında arttığını bildirmişlerdir. Medvedova ve ark (2009a), UHT sütte 7 °C'de stafilokokal üremenin olduğunu belirtmişlerdir. Asperger ve Zangerl (2003) ise *S. aureus*'un minimal gelişme sıcaklığının 6,5-7 °C olduğunu bildirmişlerdir.

Çizelge 1.5'te gelişme ve enterotoksin üretimi ile ilgili bilgiler sunulmuştur.

Çizelge 1.5. Gelişme ve Enterotoksin Üretimiyle İlgili Limitler (Paulin ve ark 2012).

Faktör	Gelişme		Toksin Üretimi	
	Optimum	Limitler	Optimum	Limitler
Sıcaklık (°C)	37	7 - 48	40 - 45	10 - 48
pH	6-7	4-10	7-8	4.5 - 9.6 Aerobik 5.0 - 9.6 Anaerobik
Su Aktivitesi	0.98	0.83 - > 0.99 Aerobik 0.9 - >0.99 Anaerobik	0.98	0.87 - >0.99 Aerobik 0.92 - >0.99 Anaerobik

-pH:

Gelişme için optimum pH değerleri 6-7 arasındadır. SEB oluşumu ile karşılaştırıldığında SEA oluşumu pH değişikliklerine daha toleranslıdır (Erol ve İşeri 2004).

Bergdoll ve Lee Wong (2006), birçok izolatın pH 4,5 ile 9,3 arasında gelişebildiğini bildirmiştir. Valero ve ark (2009) ise 5 enterotoksijenik izolat içeren bir kokteylin pH 4,5'te geliştiğini rapor etmiştir.

Çizelge 1.5'te gelişme ve enterotoksin üretimine ilişkin pH limitleri sunulmuştur.

-Besin Maddeleri:

Qi ve Miller (2000) düşük  $a_w$  değerine sahip besiyerine prolin eklenmesiyle SEB oluşumunun stimüle edildiğini buna karşın glisin, betain ve karnitin ilave edildiğinde böyle bir etkinin görülmediğini bildirmişlerdir.

Demir, inorganik fosfat, karbondioksit veya bikarbonat içeren besiyerleri sekonder metabolitlerin oluşumunu artırmaktadır. Magnezyumun SEC, demirin ise SEB oluşumunu yüksek düzeyde etkilediği bildirilmiştir (Erol ve İşeri 2004).

-NaCl ve Su Aktivitesi:

% 5'lik NaCl konsantrasyonları tuzsuz ortamlara oranla *S. aureus* üremesini artırırken % 7,5 ve % 10 düzeylerindeki NaCl konsantrasyonunun üremeyi kısmen geciktirdiği bildirilmiştir (Erol ve İşeri 2004).

Düşük  $a_w$  değerinin SEA ve SEB biyosentezi üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışma sonunda düşük  $a_w$  değerinde SEB oluşumunun SEA'ya göre daha az olduğu belirtilmiştir (Qi ve Miller 2000).

Valero ve ark (2009), tuzun nemlendirici olarak kullanıldığı ve 5 enterotoksijenik izolat içeren bir kokteylin  $a_w$ : 0.867'de geliştiğini rapor etmişlerdir.

Çizelge 1.5'te gelişme ve enterotoksin üretimine ilişkin  $a_w$  limitleri sunulmuştur.

-Diğer Kimyasal Maddeler:

Laktobasiller tarafından üretilen veya gıdalara ilave edilen hidrojen peroksit *S. aureus*'un üremesini inhibe edebilmektedir *S. aureus* sayısının azaltılmasında iodonin (1000 mg/L) oldukça etkili olduğunu saptanmıştır. *S. aureus* FRI-100 ve FRI-472 suşlarının gelişiminde prüvik asidin etkili olduğu, FRI-137 suşunun gelişiminde laktik asidin etkili olduğu ve S6 suşunun gelişiminde ise laktik asit, sitrik asit, asetik asit, prüvik asit ve propiyonik asidin etkili olduğu bildirilmiştir (Erol ve İşeri 2004).

İnhibisyonda asıl faktör ortamın asidifikasyonu olarak görülmektedir. Ayrıca laktik asit bakterileri tarafından salınan bakteriyosinlerin de etkisi vardır. Örneğin lantiyobiotik üreten *L. lactis* hem *S. aureus*'u (Rilla ve ark 2004) hem de KPS'leri (Kim ve ark 2010) inhibe etmektedir.

### **İntraselüler Faktörler**

SE tiplerinin oluşturulmasında enterotoksijenik özellikteki stafilokok hücrelerinin bulunduğu gelişme fazları önemli etkiye sahiptir. Buna ilişkin olarak SEA, hücrenin logaritmik fazında oluşturulurken SEB, SEC ve SED geç logaritmik faz veya erken duraklama fazında oluşturulmaktadır. Ayrıca sekonder metabolitler de bakteriler üzerine inhibitör bir etki yapabilmektedir. Bu çerçevede SEB'i

oluşturan *S. aureus* suşlarının gelişme siklusu süresince toksin tarafından baskılandığı saptanmıştır (Erol ve İşeri 2004).

*S. aureus*'un virulens faktörlerinin düzenlenmesinde "accessory gene regulator" (Agr) geninin rolü büyüktür. Agr lokusundaki mutasyonlar, SE ve diğer ekzoproteinlerin oluşumunun azalmasıyla sonuçlanmaktadır. Bunun yanı sıra bütün SE'ler Agr tarafından regüle edilmemektedir. Örneğin SEA, Agr mutasyonlarından etkilenmemektedir (Erol ve İşeri 2004). Agr, nötral pH değerlerinde en yüksek düzeyde aktive olmaktadır. Glukoz içeren düşük pH'lı besiyerlerinde Agr'nin hedef aldığı genlerin negatif olarak regüle edildiği ve ekzoprotein oluşumunun azaldığı veya hiç oluşmadığı bildirilmiştir (Jablonski ve Bohach 1997). Bununla beraber bakteri yoğunluğunun düşük olduğu ortamlarda Agr aktif hale geçememektedir. Dolayısıyla adezinlerin aktif (yukarı) 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).

*S. aureus* tarafından oluşturulan değişik enterotoksin tiplerinin miktarları da suşa bağlı olarak farklılık göstermektedir. Çoğu *S. aureus* suşlarının iki veya daha fazla enterotoksin oluşturabildiği bildirilmiştir (Erol ve İşeri 2004).

### **1.8.Vitek-2 Compact Sistem**

Vitek-2 Compact Sistem, analiz edilen organizma ve reaksiyonlarla ilgili verilere dayanan bir metodoloji kullanarak organizmaları tanımlamaktadır. Sözkonusu türün bir dizi ayırıcı biyokimyasala karşı gösterdiği tipik reaksiyonları tahmin etmek amacıyla bilinen suşlardan yeterli miktarda veri toplanmaktadır (Biomerieux Vitek-2 Sistem Ürün Bilgisi 410825-2010).

Mükemmel bir identifikasyon profili algılanmazsa, olası organizmalardan oluşan bir liste sunulmakta veya suşun veritabanının kapsamı dışında olduğu belirlenmektedir. Yazdırılan laboratuvar raporunda, identifikasyonu tamamlamak için gerekli tamamlayıcı testlere ilişkin öneriler yer almaktadır. Testler identifikasyonu tamamlamak için yeterli değilse standart mikrobiyoloji referanslarına ve literatüre başvurulması gerekmektedir. Bazı türler slashline (karışık) sınıf



identifikasyonuna ait olabilmektedir. Slashline sınıflarını ayırmak için tamamlayıcı testler kullanılabilir (Biomérieux Vitek-2 Sistem Ürün Bilgisi 410825-2010).

### **Vitek-2 GP İdentifikasyon Kartı**

Vitek-2 Gram pozitif identifikasyon kartı (V-GPK), birçok Gram pozitif mikroorganizmanın otomatik identifikasyonu için tasarlanmış, kanıtlanmış biyokimyasal yöntemlere ve yeni geliştirilen substratlara dayanan, karbon kaynağı kullanımı, enzimatik aktiviteler ve direnci ölçen 43 biyokimyasal test içeren, tek kullanımlık bir malzemedir. Kesin identifikasyon sonuçları, 4-8 saatte elde edilmektedir (Biomérieux Vitek-2 Sistem Ürün Bilgisi 24474-2010).

Çizelge 1.6'da Vitek-2 Gram Pozitif İdentifikasyon Kartı (V-GPK) kuyucuk içerikleri sunulmuştur.

Çizelge 1.6. V-GPK Kuyucuk İçerikleri (Biomerieux Vitek-2 Sistem Ürün Bilgisi 410825-2010).

Kuyucuk	Test	Anımsatıcı	Miktar/Kuyucuk
2	D-AMİGDALİN	AMY	0,1875 mg
4	FOSFATİDİLİNOSİTOL FOSFOLİPAZ C	PIPLC	0,015 mg
5	D-KSİLOZ	dXYL	0,3 mg
8	ARGİNİN DİHİDROLAZ 1	ADH1	0,111 mg
9	BETA-GALAKTOSİDAZ	BGAL	0,036 mg
11	ALFA-GLİKOSİDAZ	AGLU	0,036 mg
13	Ala-Phe-Pro ARİLAMİDAZ	APPA	0,0384 mg
14	SİKLODEKSTRİN	CDEX	0,3 mg
15	L-ASPARTAT ARİLAMİDAZ	AspA	0,024 mg
16	BETA-GALAKTOPİRANOSİDAZ	BGAR	0,00204 mg
17	ALFA-MANNOSİDAZ	AMAN	0,036 mg
19	FOSFATAZ	PHOS	0,0504 mg
20	LÖSİN ARİLAMİDAZ	LeuA	0,0234 mg
23	L-PROLİN ARİLAMİDAZ	ProA	0,0234 mg
24	BETA GLUKURONİDAZ	BGURr	0,0018 mg
25	ALFA-GALAKTOSİDAZ	AGAL	0,036 mg
26	L-PIROLİDONİL-ARİLAMİDAZ	PyrA	0,018 mg
27	BETA-GLUKURONİDAZ	BGUR	0,0378 mg
28	ALANİN ARİLAMİDAZ	AlaA	0,0216 mg
29	TİROZİN ARİLAMİDAZ	TyrA	0,0276 mg
30	D-SORBİTOL	dSOR	0,1875 mg
31	ÜREAZ	URE	0,15 mg
32	POLİMİKSİN B DİRENCİ	POLYB	0,00093 mg
37	D-GALAKTOZ	dGAL	0,3 mg
38	D-RİBOZ	dRIB	0,3 mg
39	L-LAKTAT ALKALİLEŞMESİ	ILATk	0,15 mg
42	LACTOSE	LAC	0,96 mg
44	N-ASETİL-D-GLİKOZAMİN	NAG	0,3 mg
45	D-MALTOZ	dMAL	0,3 mg
46	BASİTRASİN DİRENCİ	BACI	0,0006 mg
47	NOVOBİOSİN DİRENCİ	NOVO	0,000075 mg
50	% 6,5 NaCl'de ÇOĞALMA	NC6.5	1,68 mg
52	D-MANİTOL	dMAN	0,1875 mg
53	D-MANNOZ	dMNE	0,3 mg
54	METİL-B-D-GLUKOPİRANOSİD	MBdG	0,3 mg
56	PULLULAN	PUL	0,3 mg
57	D-RAFİNOZ	dRAF	0,3 mg
58	O/129 DİRENCİ (comp.vibrio.)	O129R	0,0084 mg
59	SALİSİN	SAL	0,3 mg
60	SAKKAROZ/SÜKROZ	SAC	0,3 mg
62	D-TREHALOZ	dTRE	0,3 mg
63	ARGİNİN DİHİDROLAZ 2	ADH2s	0,27 mg
64	OPTOKİN DİRENCİ	OPTO	0,000399 mg

## 1.9. Enterotoksin Analizleri

Gıdalarda stafilokok sayımı ve SE aranması ile ilgili analizler, gıda güvenliğinin sağlanması ve epidemiyolojik çalışmalara ışık tutulması yönünden büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla tek ve çift jel difüzyon tüp yöntemi, pasif veya reversed pasif lateks aglutinasyon testi, mikroslide yöntemi ile RIA ve ELISA gibi teknikler kullanılmaktadır (Erol ve ark 1993). Stafilokokal gıda zehirlenmelerinden sorumlu tutulan gıdaların çoğu düşük düzeyde ( $<1 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ ) enterotoksin içermektedir. Dolayısıyla kullanılan tekniklerin duyarlılığının yüksek ve uygulanmasının kolay olmasına gereksinim vardır. Vidas, Tecra ve Transia metotlarının benzer duyarlılıklar göstermelerine rağmen Vidas yönteminin doğal kontamine konserve mantarda renature toksin tespitinde diğerlerinden daha üstün olduğu bildirilmiştir (Bennett 2005). Yine gıdalarda SE tespitine yönelik üç immunolojik metodun karşılaştırıldığı bir çalışmada Vidas Set2'nin daha spesifik ve daha hassas olduğu, tespit limitlerinin SEA ve SEB için  $<0.5\text{ng/g}$ , SEC<sub>2</sub> ve SEE için  $<1\text{ng/g}$ , SED ve SEE için  $1\text{ng/g}$  olduğunu rapor edilmiştir (Vernozy-Rozand ve ark 2004).

Becker ve ark (1994), SET-EIA, Ridascreen ve TECRA-SET testleri ile enterotoksin tayininde yanlış pozitif sonuç aldıklarını, bu nedenle zayıf pozitiflik veren test sonuçlarının kabul edilmemesi gerektiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar deneysel olarak SE ile kontamine ettikleri sığır etlerinde SE'nin en iyi Vidas tekniği ile saptandığını bildirmişlerdir.

### 1.9.1. Vidas Sistemi ve Vidas Staph Enterotoxin 2

Vidas Staph Enterotoxin 2, ELFA (Enzim Bağlantılı Floresan Testi) tekniği kullanılarak gıda ürünlerinde SE'lerin spesifik olarak saptanması için otomatik Vidas sisteminde kullanılan kalitatif, otomatik bir enzim immün testtir. % 100 özgüllük ve  $0.25 \text{ ng/g}$  hassasiyet göstermektedir. Toksin tipinin belirlenememesi Vidas için bir dezavantaj olarak görülmektedir (Biomerieux Vidas Staph Enterotoksin2-REF 30705-2008).

Yapılan laboratuvarlar arası çalışmalar sonunda yanlış pozitif ya da yanlış negatif sonuca rastlanılmadığını belirten Avrupa Referans Laboratuvar Birliği,

özellikle süt ve ürünlerinde SE tespitinde Vidas Set2'nin güvenle kullanılabilceğini belirtmiştir (Hennekinne ve ark 2007a, Hennekinne ve ark 2007b).

Minividas, on iki adet tek reaktif sribi içine alan florometrik optik sistem, testi gerçekleştiren mekanik sistem, gerekli ısıyı sağlayan inkübasyon sistemi, merkezi işlemci ünitesi, termal yazıcı, reaktif strip etiketinde kodlanmış bilgiyi ve lot kartlarını okumak için barkod okuyucu gibi donanımlara sahip olan ve Vidas test kitleri ile çalışmak üzere tasarlanmış otomatize bir sistemdir (Biomerieux Minividas Kullanım Klavuzu 93607-2012).

Katı faz sağlayıcı (SPR), katı faz olarak işlev görmeyen yanı sıra pipetleme aygıtı olarak da kullanılmaktadır. SPR'nin iç kısmı, yüzeye adsorbe edilmiş anti-SE'lerin antikorları ile kaplanmıştır. Testin reaktifleri kullanıma hazırdır ve kapatılmış reaktif striplerine ön dağıtım yapılmıştır (Biomerieux Vidas Staph Enterotoksin2-REF 30705-2008).

Testin tüm basamakları cihaz tarafından otomatik olarak yapılmaktadır. Reaksiyon ortamı SPR'nin içine birkaç defa alınıp bırakılmaktadır. Gıda ekstresinin bir kısmı reaktif sribine bırakılmaktadır. Mevcut antijenler, SPR'nin iç kısmını kaplayan anti-enterotoksin antikorlarına bağlanmaktadır. Bağlanmamış numune bileşenleri yıkanarak temizlenmektedir. Alkalen fosfataz ile işaretlenmiş antikorlar, SPR'nin içine alınıp bırakılmaktadır ve SPR duvarındaki antikorlara bağlı stafilokokal antikorlara bağlanmaktadır. Sonraki yıkama basamakları ile bağlanmamış konjugat temizlenmektedir. Son saptama basamağında substrat (4-metil-umbelliferil fosfat) SPR içerisine alınıp bırakılmaktadır. Konjugat enzim, bu substratın hidrolizini katalize etmektedir. Test tamamlandığında sonuçlar her bir numune için cihaz tarafından otomatik olarak değerlendirilmektedir. Sonra bu değerler, bir iç referansla (eşik) karşılaştırılarak her bir sonuç için pozitif veya negatif olarak tek tek yorumlanmaktadır (Biomerieux Vidas Staph Enterotoksin2-REF 30705-2008).

Vidas Staph Enterotoxin 2 kit içeriği Çizelge 1.7'de verilmiştir.

Çizelge 1.7. Vidas Staph Enterotoksin 2 Kit İçeriği (Biomerieux Vidas Staph Enterotoksin2-REF 30705-2008).

SET2 Reaktif Stribi	STR	Kullanıma hazırdır.
SET2 SPR	SPR	Kullanıma hazırdır. SPR'lerin iç kısmı antistafilokokal enterotoksin antikorları ile kaplanmıştır.
SET2 Standart (1 x 6 ml)	S1	Kullanıma hazırdır. Saflaştırılmış enterotoksin A (< 1.0 ng/ml) + koruyucu ve protein stabilizörleri içermektedir.
SET2 Pozitif Kontrol (1 x 6 ml)	C1	Kullanıma hazırdır.
Negatif Kontrol (1 x 6 ml)	C2	Kullanıma hazırdır. TRIS-tamponlanmış tuzlu su (TSB) (150 mmol/l) - Tween pH 7.6 + koruyucu içermektedir.
SET2 Konsantre edilmiş Ekstraksiyon Tamponu (1 x 55 ml)	R1	2.5 mol/l TRIS- 10g/l Tween- 10g/l MIT pH:8.0
MLE Kartı (Master Lot Entry)		Testi kalibre etmek için gerekli fabrika ana kalibrasyon verilerini içeren spesifikasyon kağıdıdır.

SPR'nin iç kısmı üretim sırasında stafilokokal anti-enterotoksin antikorları ile kaplanmıştır. Reaktif stribi, etiketli bir folyo ile kaplanmış 10 kuyucuktan oluşmaktadır. Etiket test kodunu, kit lot numarasını ve son kullanma tarihini gösteren bir barkod içermektedir. İlk kuyucuğun folyosu, numune girişini kolaylaştırmak için delinmiştir. Her bir stribin son kuyucuğu, içinde florometrik okumanın yapıldığı bir küvettir. Stribin merkez bölümünde yer alan kuyucuklar test için gerekli çeşitli reaktifleri içermektedir (Biomerieux Vidas Staph Enterotoksin2-REF 30705-2008). Set2 reaktif stribinin tanımı Çizelge 1.8'de verilmiştir.

Çizelge 1.8. Reaktif Stribi Tanımı (Biomerieux Vidas Staph Enterotoksin2-REF 30705-2008).

Kuyucuklar	Reaktifler
1	Numune kuyucuğu: 500 µl gıda ekstresi kuyucuğa, standart ya da kontrol pipetlenir.
2	Ön yıkama solüsyonu (400 µl): TRIS - NaCl (150 mmol/l) - Tween pH 7.6 -protein stabilizörü + koruyucu
3-4-5-7-8-9	Yıkama Tamponu (600 µl): TRIS - NaCl (150 mmol/l) - Tween pH 7.6 + koruyucu
6	Konjugat (400 µl): alkalin fosfataz-işaretli anti-stafilokokal enterotoksin antikorları + koruyucu
10	Substrat ile birlikte okuma küveti (300 µl): 4-Metil-umbelliferil fosfat (0.6 mmol/l) + Dietanolamin (DEA) (0.62 mol/l veya 6.6 %, pH 9.2) + koruyucu

Her yeni reaktif lotu kullanılmadan önce spesifikasyonlar (veya fabrika ana kalibrasyon eğri bilgisi) her kit içinde yer alan ana lot giriş (MLE Kartı-Spesifikasyon Kartı) kullanılarak cihaza girilmektedir. Bu işlem testi başlatmadan önce yapılmazsa cihaz sonuçları yazdıramamaktadır. Ana lot bilgisinin her bir lot için sadece bir kere girilmesi gerekmektedir. Bilgiler MLE kartla otomatik ya da manüel olarak girilebilmektedir (Biomerieux Vidas Staph Enterotoksin2-REF 30705-2008).

Her yeni reaktif lotu açıldığında kitin içindeki standart kullanılarak ana lot bilgisi girildikten sonra kalibrasyon yapılmaktadır. Daha sonra her 14 günde bir yeniden kalibrasyon yapılmaktadır. Bu işlem, cihaza özel kalibrasyon eğrilerinin elde edilmesini sağlamak ve kitin raf ömrü sırasında test sinyalinde meydana gelebilecek olası küçük değişiklikleri telafi etmektedir (Biomerieux Vidas Staph Enterotoksin2-REF 30705-2008).

S<sub>1</sub> ile tanımlanan standart iki kez test edilmektedir. Standart değer, ayarlanan RFV (Rölatif Floresans Value) aralığı içinde olmalıdır. Aksi takdirde kalibrasyonun yeniden yapılması gerekmektedir. (Biomerieux Vidas Staph Enterotoksin2-REF 30705-2008).

## 2. GEREÇ ve YÖNTEM

### 2.1. Gereç

Materyal olarak kullanılan çiğ sütler Konya'da bulunan 3 çiftlikten temin edildi.

Üretilen sütlerin süt işleme fabrikasına geliş süresinin uzun olması ihtimali ve bu sürenin tam olarak tespit edilememesi, hayvanlara başta antibiyotik olmak üzere ilaç uygulamalarının yapılmış olması ihtimali, içinde muhtemel hastalıklı hayvanların da bulunduğu pek çok hayvanın sütünün karıştırılmış olması ve bunun kontrol edilememesi, sütün elde edildiği orijinin tam olarak tespit edilememesi gibi muhtemel faktörler sebebiyle ve analiz sonuçlarının daha doğru bir yaklaşımla karşılaştırılabilmesi amacıyla nispeten birbirine benzeyen bir örnek numunelerin elde edilebilmesi için numuneler süt işleme fabrikalarından değil çiftliklerden alındı.

Çiftlik sahiplerine, çalışan personele ve çiftlik veteriner hekimine araştırmayla ilgili gerekli bilgiler verildi. Antibiyotik başta olmak üzere herhangi bir ilaç ya da aşı kullanılmaması, şayet kullanılması zorunlu ise numune alındıktan sonra kullanılması, analizler için kontrol altındaki hayvanlardan alınan sütlerin kullanılması, mastitis gibi süt kalitesini etkileyebilecek hastalıklarda hasta hayvanların ve sütlerinin ayrılması, araştırma süresince iletişimin kesilmemesi ve çiftlik ile ilgili bilgilerin gizliliğinin korunması gibi araştırmanın bilimsel ve etik yönlerini ilgilendiren konularda mutabakat sağlandı.

Numuneler, ineklerin hastalık durumlarının ve ilaç kullanımının kontrol edilebildiği 3 farklı çiftlikten temin edildi. Farklı süre ve sıcaklıklarda muhafaza edildikten sonra analiz edilmek üzere, her çiftlikten 3 aylık her bir dönemde 10 adet çiğ süt örneği alındı ve böylece bir çiftlikten 4 kez toplam 40 (4x10) adet örnek alındı.

Numune alma kurallarına uygun olarak steril 200 ml'lik şişelere alınan çiğ süt numuneleri, numune taşıma kurallarına ve soğuk zincire riayet edilerek en kısa süre içerisinde ve uygun numune taşıma kapları içinde laboratuvara getirildi.

Araştırma kapsamındaki analizler, çalışma performansını etkileyecek tüm parametrelerin (örn; cihaz ağırlık kontrol, mikropipet doğrulama, cihaz sıcaklık kontrol, otoklav doğrulama, temizlik ve hijyen kontrol, kalite kontrol, çevre şartları izleme) kontrol edildiği ve TÜRKAK tarafından akredite olan bir laboratuvarında yapıldı.

Dönem içerisinde çiftlikten alınarak laboratuvara getirilen 10 adet çiğ süt örneğinden bir tanesi kontrol numunesi olarak kabul edildi ve hemen KPS sayımı analizleri/tür identifikasyonları ve SE analizleri yapıldı. Ayrıca diğer mikrobiyolojik analizler (toplam mezofilik aerobik koloni sayımı, somatik hücre sayımı) de yapıldı.

Diğer 9 numune ise 4 °C, 10 °C ve 22 °C'de 12, 24 ve 48 saat inkübasyona tabi tutulduktan sonra KPS sayımı analizleri/tür identifikasyonu ve SE analizleri yapıldı. Bununla ilgili bilgiler Çizelge 2.1'de sunulmuştur.

Çizelge 2.1. Farklı Süre ve Sıcaklıklarda Muhafaza Edilen Çiğ Sütlerle Yapılan Analizler.

İnkübasyon Sıcaklığı	İnkübasyon Süresi		
	12 saat	24 saat	48 saat
4 °C	KPS Sayımı-Tür identifikasyonu ve SE Aranması	KPS Sayımı-Tür identifikasyonu ve SE Aranması	KPS Sayımı-Tür identifikasyonu ve SE Aranması
10 °C	KPS Sayımı-Tür identifikasyonu ve SE Aranması	KPS Sayımı-Tür identifikasyonu ve SE Aranması	KPS Sayımı-Tür identifikasyonu ve SE Aranması
22 °C	KPS Sayımı-Tür identifikasyonu ve SE Aranması	KPS Sayımı-Tür identifikasyonu ve SE Aranması	KPS Sayımı-Tür identifikasyonu ve SE Aranması

Numuneler, mevsimsel değişimlerin de değerlendirilebilmesi amacıyla 3'er aylık 4 dönem içerisinde alındı.



## 2.2. Yöntem

Bu araştırmada kullanılan referans metotlar Çizelge 2.2’de sunulmuştur.

Çizelge 2.2. Analizler ve Metotlar.

Analiz	Metot
KPS Sayımı	ISO 6888-2:1999 Referans Metodu
SE Aranması	AOAC Research Institute (070404/2004 ) ve AOAC OMA (2007.06) Onaylı Protokolleri / DGAL/SDSSA/SDRRC/N2005-8194 Bildirisi Resmi Metodu
30 °C’de Koloni Sayımı	TS 7703 EN ISO 4833:2004 Referans Metodu
Somatik Hücre Sayımı	91/180/EEC (1991/ L093,13.04.199, P. 0001-0048) Resmi Protokolü

## 2.3. İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin hesaplanmasında SPSS Release 21 istatistik paket programı kullanıldı.

İnkubasyon sıcaklığının, sütün temin edildiği işletmenin ve sütün alındığı mevsimin KPSS’ye etkisinin belirlenebilmesi için "Kruskal-Wallis Testi" uygulandı. İnkubasyon sürelerinin KPSS’ye etkisinin belirlenebilmesi için de "Wilcoxon Signed Rank Testi" uygulandı.

## 2.4. Mikrobiyolojik Analizler

### 2.4.1.Koagulaz Pozitif Stafilokok Sayımı

KPS Sayımı için ISO 6888-2:1999 referans metodu uygulandı.

#### Kullanılan Araç ve Gereçler

-Otoklav (Hirayama, model: HV-85L, seri no:05035803, 121 °C)

-İnkübatörler

(Nüve cooled inkübatör, model: S120, seri no:01-0077, 10 °C±1)

(Binder cooled inkübatör, model: KB115, seri no:05-84541, 22 °C±1)

(Heraeus inkübatör, model: Hera cell 240, seri no:40360832, 35 °C±1)

-Buzdolabı (Bosch, model:KDN36V04NE, 4 °C±2 )

-Analitik terazi (aeADAM, model: PGV 2502i, seri no:AE43382, tolerans:0,1)

-Çalkalayıcı su banyosu (GFL, model: 1083, seri no:11668409L)

-Stomacher (IUL, Masticator, seri no: 916/470)

-pH metre (WTW İnoLab pH 730, seri no: 11231554)

-Bunzen beki, steril pipet, spatül, steril stomacher torbası vb. malzemeler

-Vortex (Heidolph, Reax Top, seri no: 030418732)

-Otomatik pipet-1ml (Eppendorf, model: Research 100, tolerans:0.006)

-Steril petri kutusu (15x90 mm), steril pipet ucu, erlenmayer, beher, mezür, cam tüpler vb. laboratuvar malzemeleri

#### Kullanılan Kimyasal ve Biyolojik Maddeler

-Pepton Tuz Çözeltisi (PTÇ)

Pepton : 10 g

NaCl : 8,5 g

Distile su : 1000 ml

Besiyeri su banyosunda ısıtılarak çözüldürüldü. Otoklavda 121 °C'de 15 dakika süreyle sterilize edildi. Sterilizasyon sonrası pH 7,0±0,2 olacak şekilde ayarlandı.

-Baird Parker Rabbit Plasma Fibrinogen Agar:R<sub>1</sub> (BP-RPF Agar)

Beef extract	: 15 g
Yeast extract	: 1 g
Sodyum piruvat	: 10 g
Glycine	: 12 g
Lithyum klorid.6 H <sub>2</sub> O	: 5 g
Agar	: 12,5 g

Hazır olarak temin edilen (90 ml) BP-RPF Agar su banyosunda eritildi. 48°C±2'ye kadar soğutulduktan sonra 1 vial Rabbit Plasma Fibrinogen: R<sub>2</sub> eklendi.

-Rabbit Plasma Fibrinogen:R<sub>2</sub>

Tavşan fibrinojeni	: 3,75 g
Tavşan plazması	: 25 ml
Tripsin inhibitörü	: 25 mg
Potasyum tellürit	: 25 mg

Hazır olarak temin edilen liyofilize tavşan plazması 10 ml steril suda çözündürüldü.

**Analiz**

10 ml çiğ süt, 90 ml PTÇ ile homojenize edildi. Hazırlanan 1/10'luk dilüsyondan, numunede beklenen mikroorganizma yoğunluğuna göre içerisinde 9 ml PTÇ bulunan tüplere 1'er ml aktarılarak seri dilüsyonlar hazırlandı. Her dilüsyondan 1'er ml alınıp paralel olarak steril petrilere aktarıldı. Bu petrilere üzerine taze hazırlanan ve R<sub>2</sub> içeren BP-RPF agar, derinliği yaklaşık 3 mm olacak şekilde döküldü. Besiyeri ile dilüsyonun homojen şekilde karışması sağlandı. Agar katılaştıktan sonra 35 °C'de 18-24 saat (gerekirse tekrar 18-24 saat) inkübasyona bırakıldı. KPS kolonileri, opak bir hare ile çevrili genellikle gri-siyah renkteki kolonilerdir.

## Sonuç ve Hesaplama

İnkubasyon sonrasında petrilerdeki koloniler (15-300 arasındakiler) sayıldı. Etrafı zonla çevrili gri-siyah renkli KPS kolonileri sayıldı ve hesaplama aşağıdaki gibi yapıldı.

$$N = \sum C / V(n_1+0,1n_2)d$$

- $\sum C$  :Petrilerdeki toplam KPSS  
V :İnokulasyon hacmi (ml)  
 $n_1$  :İlk dilüsyonun ekildiği petri sayısı  
 $n_2$  :İkinci dilüsyonun ekildiği petri sayısı  
d :Ekilen ilk dilüsyonun dilüsyon oranı

Petrilerde bulunan KPSS, 15 koloniden az ise hesaplama aşağıdaki gibi yapıldı.

$$N = C / 2d$$

- C :Paralel petrilerdeki toplam KPSS  
d :Başlangıç süspansiyonunun dilüsyon oranı  
Negatif sonuçlar, <1/d olarak rapor edildi.

Sonuçlar, 1 ml sütte koloni oluşturan birim olarak (kob/ml) verildi.

### 2.4.2. Vitek-2 Compact İdentifikasyon İşlemleri

#### Kullanılan Araç ve Gereçler

- Vitek-2 GP İdentifikasyon Kartı (Biomerieux, REF:21342)
- Vitek Densicheck (Biomerieux, model: Densicheck, seri no: IDK212136)
- Vitek-2 Kaseti
- Steril tuzlu su (% 0.45 NaCl, pH: 4,5-7,0)
- Saydam plastik tek kullanımlık test tüpleri (12 mm x 75 mm)
- Steril plastik öze
- Uygun agar ortamı

KPS'lerin identifikasyonu Vitek-2 Compact System (Biomérieux, seri no 3690) ile yapıldı.

Primer plaktan izole koloniler seçildi veya uygun agar ortamında (Nutrient Agar) test edilecek organizmanın alt kültürü alınarak uygun şekilde 35 °C'de 24 saat inkübe edildi. Saydam plastik test tüpüne aseptik olarak 3 ml steril tuzlu su alındı. Nutrient agar plağından, taze (<18 saat) ve benzer 3-4 tipik koloni alındı. Yeterli sayıda koloni, steril plastik öze yardımıyla içerisinde tuzlu su bulunan test tüpüne aktarıldı ve vorteks yardımıyla homojen hale getirildi. Yoğunluğu McFarland No: 0,50 ila 0,63'e eşdeğer olan homojen organizma süspansiyonu hazırlandı.

V-GPK ve içinde mikroorganizma süspansiyonun bulunduğu test tüpü, kasete yerleştirildi. Testle ilgili verilerin cihaza tanıtılmasının ardından GP kartı ve süspansiyon tüpünün bulunduğu kaset, cihazın dolun ünitesine yerleştirildi. Bu kaset, dolun işleminin tamamlanmasından sonra yükleme ünitesine yerleştirildi. Barkotların taranması ve kart borucuklarının kesilerek mühürlenmesinin ardından kartlar otomatik olarak karosele yüklendi. İdentifikasyon işleminin tamamlanmasından sonra kartlar otomatik olarak atık kaset kutusuna gönderildi. Analize ait sonuç çıktısı alındı.

#### **2.4.3. Stafilokokal Enterotoksin Analizi**

SE analizinde AOAC Research Institute (070404/2004 ) ve AOAC OMA (2007.06) onaylı protokolleri / DGAL/SDSSA/SDRRC/N2005-8194 bildirisi resmi metodu uygulandı.

#### **Kullanılan Araç-Gereçler, Reaktif ve Materyaller**

- Santrifüj (Hettich Universal320R, seri no:0005054-02-00)
- Minividas (Biomérieux, seri no: V1211882, model:vidas12)
- Otomatik pipet 0,5 ml (Brand, 0,1-1ml, model: transferpette, tolerans: 0.005)
- Stomacher (IUL, Masticator, seri no: 916/470)
- Steril stomacher torbaları
- Santrifüj tüpleri (50 ml)
- pH indikatör stribi (Macherey-Nagel pH-fix 0-14)

### -İnkübatörler

(Nüve cooled inkübatör, model: S120, seri no:01-0077, 10 °C±1)

(Binder cooled inkübatör, model: KB115, seri no:05-84541, 22 °C±1)

-Buzdolabı (Bosch, model:KDN36V04NE, 4 °C±2 )

-Vidas Staph enterotoxin 2 reaktif kiti (Ref 30705)

### **Kullanılan Kimyasal ve Biyolojik Maddeler**

-1N Sodyum hidroksit (NaOH)

-5N Hidroklorik asit (HCl)

### **Analiz**

25 ml çiğ süt alınarak pH'sı kontrol edildi. 5N HCl kullanılarak pH 3,5 ile 4,0 arasında bir değere ayarlandı. Bu süspansiyon 18-25 °C'de 3000-5000 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Üst faz alındı ve 1N NaOH kullanılarak pH 7,5 ile 8,0 arasında bir değere ayarlandı. 18-25 °C'de 3000-5000 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Daha sonra pamuk ve enjektör kullanmak suretiyle süzme işlemi gerçekleştirilerek kaba partiküller ortamdan uzaklaştırıldı. Filtratın 500 µl'si alınarak Vidas Set2 reaktif sribinin numune kuyucuğuna pipetlendi.

### **Kalite Kontrol-Kalibrasyon ve Okuma**

Her Vidas Set2 kitinde bir pozitif ve bir negatif kontrol bulunmaktadır. Bu kontroller, reaktif performansının değişmediğini görmek için yeni bir kitin açılmasından hemen sonra çalışılmaktadır. Her kalibrasyonda bu kontroller test edilmektedir. Pozitif kontrol değeri, beklenen değerlerden sapma gösterirse sonuçlar onaylanamamaktadır (Biomérieux Vidas Staph Enterotoksin2-REF 30705-2008).

Kalibrasyon için ihtiyaç duyulan miktarda reaktif buzdolabından alınarak oda sıcaklığına gelmeleri için en az 30 dakika bekletildi. Test edilecek her numune, kontrol ya da standart için bir Vidas Set2 sribi ve bir Vidas Set2 SPR kullanıldı. Standart "S<sub>1</sub>" ile tanımlandı ve iki kere test edildi. Pozitif kontrol "C<sub>1</sub>" ile, negatif kontrol "C<sub>2</sub>" ile tanımlandı. Vorteks tipi karıştırıcı kullanılarak standart, kontroller ve numuneler kullanımdan önce homojenize edildi. Numune kuyucuğuna 500 µl numune ya da kontrol pipetlendi. SPR'ler ve stripler cihaza yerleştirildi. SPR'lerdeki test kodu ile renk etiketlerinin reaktif striplerinin uyup uymadığı kontrol edildi. Test,

kullanıcı kılavuzunda belirtildiği şekilde başlatıldı. Tüm test basamakları, cihaz tarafından otomatik olarak yapıldı. Test, yaklaşık olarak 80 dakika içerisinde tamamlandı. Test tamamlandıktan sonra SPR'ler ve stripler cihazdan çıkartıldı. Kullanılmış SPR'ler ve stripler uygun bir biyozararlı kabına atıldı. Test tamamlandığında sonuçlar cihaz tarafından otomatik olarak analiz edildi.

Test edilen her bir numune için reaktif stribinin okuma küvetindeki floresans iki kez ölçülmektedir. İlk okuma SPR substrat içine girmeden önce, substrat küvetinin arka plan okumasıdır. İkinci okuma, substratın SPR'nin iç kısmında kalan enzimle inkübasyonundan sonra alınmaktadır. RFV değeri, en son sonuçtan arka planın çıkartılması ile hesaplanmaktadır. Bu hesaplama sonuç çıktısında görülmektedir. Her bir numune için elde edilen RFV değeri Vidas tarafından aşağıdaki şekilde değerlendirilmektedir:

$$\text{Test Değeri} = \text{Numune RFV} / \text{Standart RFV}$$

Test değerinin  $<0,13$  olduğu durumlarda değerlendirme "negatif" olarak kabul edilirken test değerinin  $\geq 0,13$  olduğu durumlarda değerlendirme "pozitif" olarak kabul edilmektedir. Eşik değerinden düşük test değerine sahip bir sonuç, numunenin SE içermediğini ya da saptama sınırının altında bir konsantrasyonda içerdiğini göstermektedir. Eşik değerinden büyük ya da eşik değerine eşit bir test değerine sahip bir sonuç, enterotoksin ile kontamine olmuş bir numuneyi belirtmektedir (Biomerieux Vidas Staph Enterotoksin2-REF 30705-2008).

#### **2.4.4. Koloni Sayım Tekniğiyle 30 °C'de Mikroorganizma Sayımı**

##### **Kullanılan Araç ve Gereçler**

- Otoklav (Hirayama, model: HV-85L, seri no: 05035803, 121 °C)
- İnkübatör (Binder, model:ED115, seri no: 05-82601, 30 °C±1)
- Analitik terazi (aeADAM, model: PGV 2502i, seri no:AE43382, tolerans:0,1)
- Çalkalayıcılı su banyosu (GFL, model: 1083, seri no:11668409L)
- Stomacher (IUL, Masticator, seri no: 916/470)
- pH metre (WTW İnoLab pH 730, seri no: 11231554)
- Bunzen beki, steril pipet, spatül, steril stomacher torbası vb. malzemeler
- Vortex (Heidolph, Reax Top, seri no: 030418732)

-Otomatik pipet-1ml (Eppendorf, model: Research 100, tolerans:0.006)

-Steril petri kutusu (15x90 mm), steril pipet ucu, erlenmayer, beher, mezür, cam tüpler vb. laboratuvar malzemeleri

### **Kullanılan Kimyasal ve Biyolojik Maddeler**

-Maximum Recovery Diluent (MRD)

Peptone: 1,0 g

NaCl: 8,5 g

Distile su: 1 litre

Besiyeri su banyosunda ısıtılarak çözündürüldü. Otoklavda 121 °C'de 15 dakika süreyle sterilize edildi. Sterilizasyon sonrası pH 7,0±0,2 olacak şekilde ayarlandı.

- Plate Count Skim Milk Agar (mPCA)

Peptone: 5 g

Yeast extract: 2,5 g

Skim milk powder (inhibitör madde içermeyen): 1,0 g

Glukose: 1 g

Agar-agar: 10,5 g

Distile su: 1 litre

Besiyeri su banyosunda ısıtılarak çözündürüldü. Otoklavda 121 °C'de 15 dakika süreyle sterilize edildi. Sterilizasyon sonrası pH 7,0±0,2 olacak şekilde ayarlandı.

### **Analiz**

10 ml çiğ süt, 90 ml MRD ile homojenize edildi. Hazırlanan 1/10'luk dilüsyondan içerisinde 9 ml MRD bulunan tüplere 1'er ml aktararak beklenen mikroorganizma yoğunluğuna göre seri dilüsyonlar hazırlandı. Her dilüsyondan 1'er ml alınıp paralel olarak steril petrilere aktarıldı. Bu petrilerin üzerine 44-47°C sıcaklıktaki yaklaşık 12-15 ml mPCA döküldü ve besiyeri ile dilüsyonun homojen şekilde karışması sağlandı. Agar katılaştıktan sonra 30°C±1'de 72±3 saat inkübasyona bırakıldı.



## **Sonuç ve Hesaplama**

Petri kapları zayıflatılmış ışık altında incelendi. İğne ucu büyüklüğündeki koloniler de sayıma dâhil edildi. Yayılan koloniler tek bir koloni gibi dikkate alındı. Petri kabının ¼'ünden daha az bölümünde yayılarak gelişen koloniler varsa petri kabının etkilenmeyen kısmındaki koloniler sayıldı ve buna karşılık gelen tüm petri kabındaki kolonilerin sayısı hesaplandı. Petri kabının ¼'ünden fazla bölümünde yayılarak gelişen koloniler varsa sayma işlemi yapılmadı. Mezofilik aerobik koloni sayısı (MAKS)'a ait sonuçlar, 1 ml sütte koloni oluşturan birim olarak (kob/ml) verildi.

### **-Genel Sayım Metodu (Toplam Mikroorganizma veya Tipik Kolonilerin Sayılması)**

İnkubasyon sonunda petrilere koloniler (10-300 arasındakiler) aşağıdaki formüle göre sayıldı.

$$N = \sum C / (V \times 1,1 \times d)$$

N : Koloni sayısı

$\sum C$  : Petrilere sayılan kolonilerin toplam miktarı

V : İnokulum miktarı

d : İlk sayılan petrinin dilüsyon katsayısı

### **-Düşük Sayılarda Sayım Metodu**

Petride 10'dan Az Koloni Varsa:

Petride 4'ten az olmamak üzere 10'dan az koloni varsa mikroorganizma sayıları  $N = \sum C / (V \times 1,1 \times d)$  formülü ile hesaplandı. Petride 1-3 arasında koloni varsa mikroorganizma sayısı  $(4 \times d)$ 'den daha az olarak hesaplandı.

Petride Hiç Koloni Yoksa:

Örnekte veya ilk dilüsyonda hiç koloni yoksa mikroorganizma sayıları  $(1/d)$ 'den az olarak raporlandı.

d : İlk dilüsyon faktörü (sıvı gıdalarda direkt inokulasyonda  $d = 10^0 = 1$ )

## 2.4.5. Somatik Hücre Sayımı

### Kullanılan Araç ve Gereçler

- Işık mikroskobu (Olympus, model: CHK, seri no:1-E 0639)
- Otomatik pipet-10 µl (Brand, 10-100 µl, model: transferpette, tolerans: 0.003)
- Lam
- Milimetrik kağıt
- Su banyosu (GFL, model: 1083, seri no:11668409L)
- Filtre kağıdı

### Kullanılan Kimyasal ve Biyolojik Maddeler

-Boya Çözeltilisi

Metilen mavisi: 0,6 g

% 96'lık etil alkol: 54 ml

1.1.1- trikloretan: 40 ml

Glasiyal asetik asit: 6 ml

Ağız kapaklı şişe içinde bulunan etil alkol ile 1.1.1-trichloroetan karıştırıldı. Karışım su banyosunda 60-70 °C'de ısıtılıp metilen mavisi eklendi. İyi karıştırılarak buzdolabında 12-24 saat bekletildi. Daha sonra glasiyal asetik asit eklendi. Whatman ya da eşdeğeri bir filtre kağıdından süzülerek ağız kapaklı şişede saklandı.

### Analiz

#### -Şablon Lamın Hazırlanması

Milimetrik kağıttan 5x20 mm olacak şekilde şerit kesildi ve milimetrik kısım şablon olarak kullanılacak bir lama alttan yapıştırıldı.

#### -Boyama

Lam üzerine ince bir film tabakası halinde yayılan 10 µl sütün kuruması için beklendi. Süt kuruduktan sonra boyamaya geçildi. Kullanılan boya solüsyonu aynı zamanda tespit işlevi de yaptığı için ayrıca bir tespit işlemi yapılmadı. Lamın üzerini tamamen örtecek kadar boya döküldü. 10 dakika beklendi. Lam dik pozisyona

getirilerek boyanın kendiliğinden akması beklendi. Bu işlemlerden sonra çeşme suyu altında yıkama yapıldı. Yıkanan preparat kurutma kağıdı ile kurutuldu.

### **Sayım**

Somatik hücre sayımı, görüş sahası sayma yöntemi ile yapıldı. Uzun hat boyunca ortadaki 1/3' lük bölgede en az 20 saha sayımı yapıldı. Sayılacak her alan rastgele seçildi.

### **Sonuç ve Hesaplama**

Hesaplamalar çalışma faktörü (ÇF) ile yapıldı. Çalışma faktörünü hesaplamak için öncelikle sayımın yapılacağı objektif (100'lük) için milimetrik lam ile görüş sahası çapı bulundu.

$$\text{ÇF} = (5 \times 20) / \text{Görüş sahası alanı } (\pi \times r^2)$$

Hücre sayısı: Sayılan görüş sahalarındaki ortalama hücre sayısı  $\times$  ÇF  $\times$  100

Somatik hücre sayısı (SHS) ile ilgili sonuçlar (adet/ml) olarak raporlandı.

### 3.BULGULAR

Bu çalışmada 3 farklı çiftlikten 4 mevsim içerisinde temin edilen çiğ sütler, farklı süre ve sıcaklıklarda muhafaza edilerek KPS türlerinin dağılımı ve SE oluşumu incelendi. İşletmenin, mevsimin, inkübasyon sıcaklığının ve inkübasyon süresinin KPSS ve SE oluşumu üzerine etkisi araştırıldı.

Çizelge 3.1'de SHS ve MAKS ile ilgili istatistiksel veriler logaritmik (Log) olarak sunulmuştur.

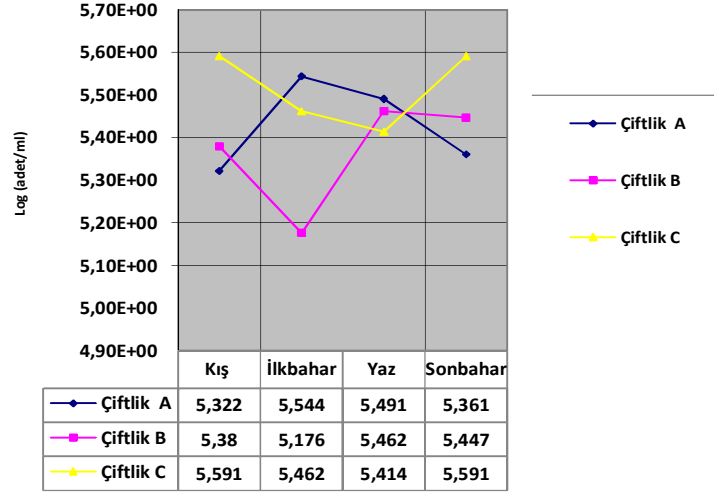
Çizelge 3.1. Somatik Hücre Sayısı ve Mezofilik Aerobik Koloni Sayısıyla İlgili İstatistiksel Veriler.

İşletme	SHS Log (adet/ml)			MAKS Log (kob/ml)		
	Min.	Max.	Ort.	Min.	Max.	Ort.
A	5.322	5.544	5.431	4.698	5.681	5.361
B	5.176	5.462	5.380	4.778	5.690	5.301
C	5.414	5.591	5.531	4.662	5.633	5.397

SHS: Somatik Hücre Sayısı

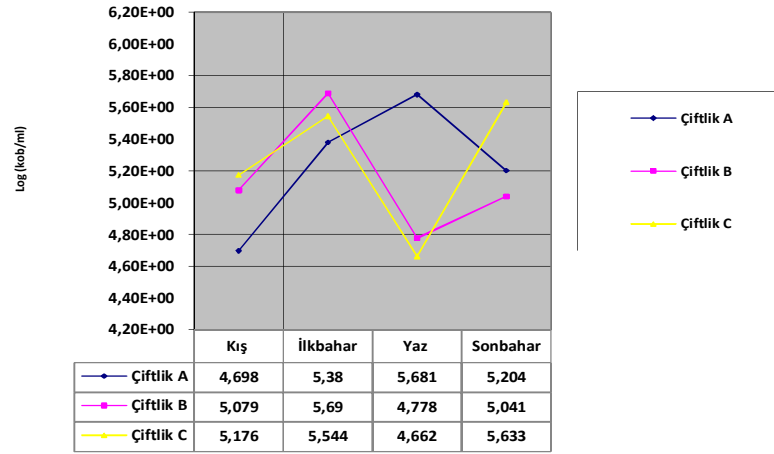
MAKS: Mezofilik Aerobik Koloni Sayısı

Çiftliklere ait mevsimsel SHS verileri Şekil 3.1'de logaritmik olarak görülmektedir.



Şekil 3.1. Çiftliklere Ait Mevsimsel Somatik Hücre Sayısı Verileri.

Çiftliklere ait mevsimsel logaritmik MAKS verileri Şekil 3.2'de sunulmuştur.



Şekil 3.2. Çiftliklere Ait Mevsimsel Mezofilik Aerobik Koloni Sayısı Verileri.

Farklı inkübasyon sıcaklıklarında KPSS(12), KPSS(24) ve KPSS(48)'e ait istatistiksel veriler Çizelge 3.2'de sunulmuştur.

Çizelge 3.2. Farklı İnkübasyon Sıcaklıklarında KPSS(12), KPSS(24) ve KPSS(48)'e Ait İstatistiksel Veriler.

Sıcaklık (°C)	KPSS(12) Log (kob/ml)				KPSS(24) Log (kob/ml)				KPSS(48) Log (kob/ml)			
	Min.	Ort.	Max.	P	Min.	Ort.	Max.	P	Min.	Ort.	Max.	P
4	1.000	2.181	4.079		1.000	2.112	4.041		1.000	1.826	4.079	
10	1,000	2.366	4.230	P>0.05*	1.000	2.172	4.431	P>0.05*	1.000	1.783	4.414	P>0.05*
22	1.000	2.363	5.113		1.000	2.413	5.949		1.000	1.965	6.113	
							SE+				SE+	

KPSS(12):12 saat inkübasyon sonundaki KPSS  
 KPSS(48):48 saat inkübasyon sonundaki KPSS  
 SE+: SE pozitif

KPSS(24):24 saat inkübasyon sonundaki KPSS  
 \* : Gruplar arasındaki fark önemsiz

Çizelge 3.2'de belirtildiği üzere inkübasyon sıcaklığıyla KPSS(12), KPSS(24) ve KPSS(48) arasındaki ilişki istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (P>0.05).

Çiftliklerin KPSS(12), KPSS(24) ve KPSS(48)'ine ilişkin istatistiksel verileri Çizelge 3.3'te logaritmik olarak verilmiştir.

Çizelge 3.3. Çiftliklere Göre KPSS(12), KPSS(24) ve KPSS(48)'e İlişkin İstatistiksel Veriler.

Çiftlik	KPSS(12)				KPSS(24)				KPSS(48)			
	Min.	Ort.	Max.	P	Min.	Ort.	Max.	P	Min.	Ort.	Max.	P
A	1.000	1.584 <sub>b</sub>	2.903		1.000	1.364 <sub>b</sub>	2.602		1.000	1.108 <sub>b</sub>	1.301	
B	1.000	1.875 <sub>b</sub>	3.278	P<0.01**	1.000	1.743 <sub>b</sub>	3.041	P<0.01**	1.000	1.158 <sub>b</sub>	2.602	P<0.01**
C	2.778	3.450 <sub>a</sub>	5.113		2.778	3.589 <sub>a</sub>	5.949		1.000	3.306 <sub>a</sub>	6.113	
							SE+				SE+	

KPSS(12):12 saat inkübasyon sonundaki KPSS  
 KPSS(48):48 saat inkübasyon sonundaki KPSS  
 a<sub>b</sub>: Aynı sütunda değişik harfler taşıyanlar birbirlerinden farklı

KPSS(24):24 saat inkübasyon sonundaki KPSS  
 \*\* : Gruplar arasındaki fark önemli  
 SE+: SE pozitif

Çizelge 3.3'te belirtildiği üzere sütün alındığı çiftlik ile KPSS(12), KPSS(24) ve KPSS(48) arasında oldukça önemli bir ilişki olduğu belirlenmiştir (P<0.01).

Mevsimlere göre KPSS(12), KPSS(24) ve KPSS(48)'e ait istatistiksel veriler logaritmik olarak Çizelge 3.4'te sunulmuştur.

Çizelge 3.4. Mevsimlere Göre KPSS(12), KPSS(24) ve KPSS(48)'e Ait İstatistiksel Veriler.

Mevsim	KPSS(12)				KPSS(24)				KPSS(48)			
	Min.	Ort.	Max.	P	Min.	Ort.	Max.	P	Min.	Ort.	Max.	P
Kış	1.000	1.643	3.113		1.000	1.631	2.954		1.000	1.356	2.602	
İlkbahar	1.000	2.224	3.770	P>0.05*	1.000	2.244	4.000	P>0.05*	1.000	1.849	3.924	P>0.05*
Yaz	1.000	2.839	5.113		1.000	2.706	5.949		1.000	2.315	6.113	
Sonbahar	1.000	2.507	3.707		1.000	2.349	3.518		1.000	1.912	3.414	

KPSS(12):12 saat inkübasyon sonundaki KPSS  
 KPSS(48):48 saat inkübasyon sonundaki KPSS  
 SE+: SE pozitif

KPSS(24):24 saat inkübasyon sonundaki KPSS  
 \* : Gruplar arasındaki fark önemsiz

Çizelge 3.4'te görüldüğü gibi KPSS(12), KPSS(24) ve KPSS(48)'in sütün temin edildiği mevsime bağlı olarak değişmediği, mevsimin KPSS üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemsiz olduğu belirlenmiştir (P>0.05).



İnkübasyon sürelerine göre KPSS'nin karşılaştırılmasına ilişkin istatistiksel veriler 3.5'te sunulmuştur.

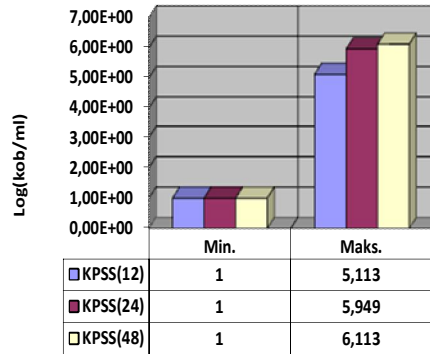
Çizelge 3.5. İnkübasyon Sürelerine Göre KPSS'nin Karşılaştırılmasına İlişkin İstatistiksel Veriler.

İnkübasyon Süresi	P
12 saat - 24 saat	P<0.05 **
12 saat - 48 saat	P<0.01 **
24 saat - 48 saat	P<0.01 **

\*\* : Gruplar arasındaki fark önemli

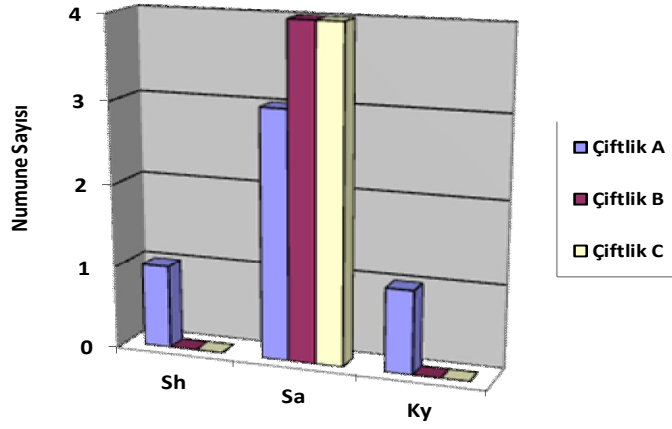
Çizelge 3.5'te belirtildiği gibi 12-24 saat, 12-48 saat ve 24-48 saatlik inkübasyon süresiyle KPSS arasındaki ilişki istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

Şekil 3.3'te minimum ve maksimum KPSS(12), KPSS(24) ve KPSS(48) verileri logaritmik olarak verilmiştir.



Şekil 3.3. 12, 24 ve 48 Saatlik İnkübasyon Sonunda Bulunan Minimum ve Maksimum KPSS.

Şekil 3.4'te çiftliklere göre KPS açısından kontrol numunelerinin sayısı sunulmuştur.



Şekil 3.4. KPS Açısından Kontrol Numunelerinin Sayısı.

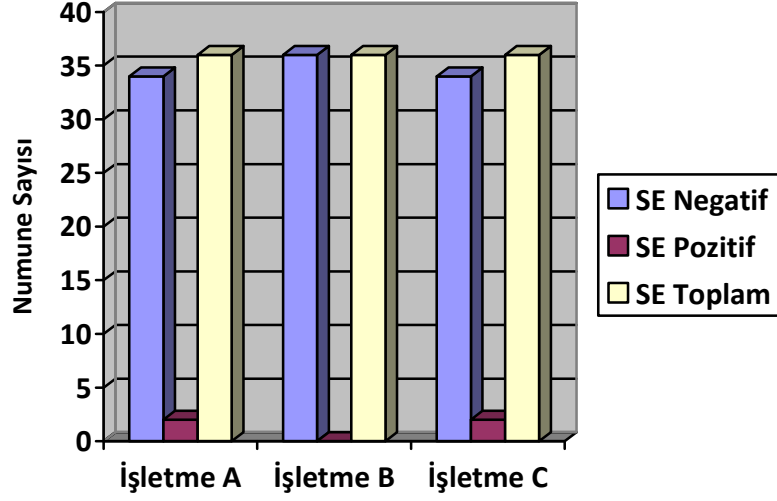
Sh: KPS olarak *S. hyicus* var

Sa: KPS olarak *S. aureus* var

Ky:KPS yok

Çiftliklerden alınan 12 adet kontrol numunesinden 10 tanesinde KPS olarak sadece *S. aureus* bulundu. 1 tanesinde *S. aureus* ve *S. hyicus* birlikte bulunurken 1 tanesinde ise hiç bir KPS tespit edilmedi. Ayrıca KPS olarak tanımlanmış 148 izolattan 144 tanesi *S. aureus* (% 97,3) olarak bulunurken 4 tanesi de *S. hyicus* (% 2,7) olarak tanımlanmıştı.

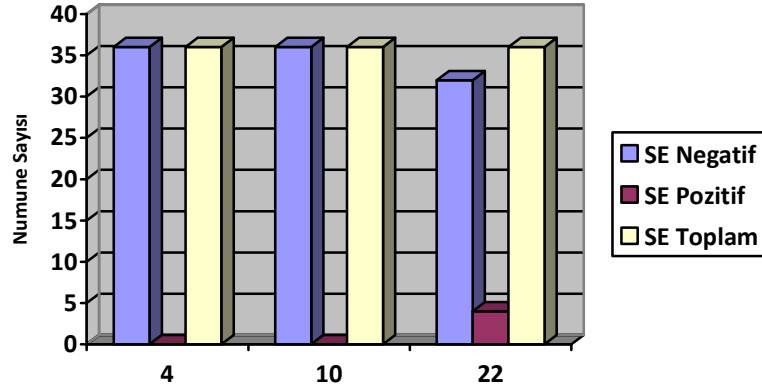
Şekil 3.5'te çiftliklere ilişkin pozitif ve negatif SE analizlerine ait veriler sunulmuştur.



Şekil 3.5. Çiftliklerin Pozitif ve Negatif SE Analizlerine Ait Veriler.

Araştırmada 12 tanesi kontrol grubuna 108 tanesi de deney grubuna ait olmak üzere toplam 120 adet SE analizi yapıldı. Numunelerden 4 tanesi SE pozitif bulundu. SE yönünden pozitif bulunan numunelerden 2'sinde KPS bulunmazken SE oluşumunun koagülaz negatif özellik taşıyan *S. haemolyticus*'tan kaynaklandığı anlaşıldı. SE yönünden pozitif bulunan diğer 2 numunede ise etkenin *S. aureus* olduğu belirlendi.

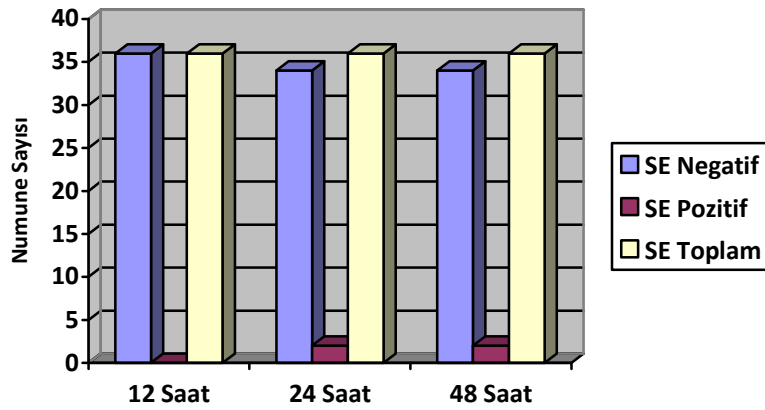
Şekil 3.6'da 4 °C, 10 °C ve 22 °C'de inkübe edilen numunelere ait SE analizleri ile ilgili veriler sunulmuştur.



Şekil 3.6. 4 °C, 10 °C ve 22 °C'de İnkübe Edilen Numunelere Ait SE Analizleriyle İlgili Veriler.

SE yönünden pozitif bulunan numunelerin 22 °C'de inkübe edildiği görüldü. Bunun yanı sıra 4 °C ve 10 °C'de muhafaza edilen numunelerin hiçbirinde SE oluşumu tespit edilmedi.

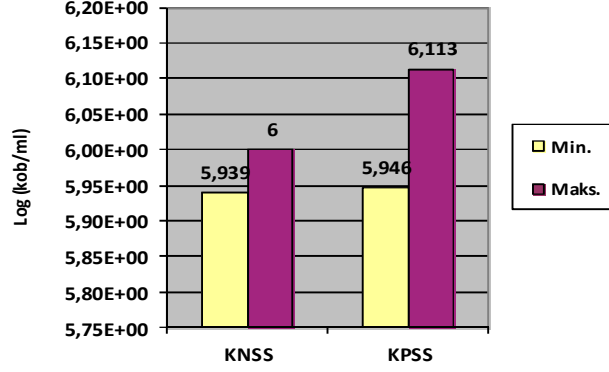
Şekil 3.7'de 12 saat, 24 saat ve 48 saat süreyle inkübe edilen numunelere ait SE analizleri ile ilgili veriler sunulmuştur.



Şekil 3.7. 12, 24 ve 48 Saat İnkübe Edilen Numunelere Ait SE Analizleriyle İlgili Veriler.

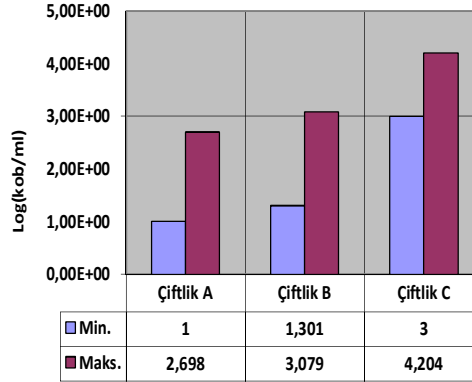
SE yönünden pozitif bulunan numunelerin 24 ve 48 saat inkübe edildiği gözlemlendi. 12 saat inkübe edilen numunelerin hiçbirinde SE oluşumu tespit edilmedi.

Şekil 3.8'de SE pozitif numunelere ait koagülaz negatif stafilokok sayısı (KNSS) ve KPSS verileri logaritmik olarak verilmiştir.



Şekil 3.8. SE Pozitif Numunelere Ait KNSS ve KPSS.

Şekil 3.9'da kontrol numunelerine ait minimum ve maksimum KPSS verileri logaritmik olarak sunulmuştur.



Şekil 3.9. Çiftliklerden Elde Edilen Kontrol Numunelerine Ait Minimum ve Maksimum KPSS.

#### 4. TARTIŞMA

Bu araştırmada farklı süre ve sıcaklıklarda muhafaza edilen çiğ sütlerde KPS türlerinin dağılımı ve SE oluşumu arasındaki ilişki araştırarak inkübasyon süresi, inkübasyon sıcaklığı, çiftlik farklılığı ve mevsimin KPSS üzerine etkileri incelenmiştir.

Araştırmada elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde kontrol numunelerinin ortalama SHS değerleri A çiftliğinde 5.431 log (adet/ml), B çiftliğinde 5.380 log (adet/ml), C çiftliğinde 5.531 log (adet/ml) bulunmuştur. Ortalama MAKS değerleri ise A çiftliğinde 5.361 log (kob/ml), B çiftliğinde 5.301 log (kob/ml), C çiftliğinde 5.397 log (kob/ml) olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.1).

Türkiye'de "Hayvansal Gıdalar İçin Özel Hijyen Kuralları Yönetmeliği Ek-1" (Resmi Gazete-27 Aralık 2011) gereğince çiğ inek sütü için belirlenen yasal limitler SHS için  $\leq 4,0 \times 10^5$  (adet/ml) iken 30 °C'de MAKS için  $\leq 1,0 \times 10^5$  (kob/ml)'dir. Buna göre araştırma kapsamında çiftliklerden alınan tüm numuneler SHS açısından mevzuata uygundur.

Temelli ve Şerbetçioğlu (2011) yaptıkları bir araştırma sonunda ortalama SHS'yi 2005 yılında 96.130 (adet/ml), 2006 yılında 99.650 (adet/ml), 2007 yılında 104.490 (adet/ml) ve 2008 yılında 104.190 (adet/ml) olarak bulduklarını rapor etmişlerdir. Ayrıca 4 yıllık periyot boyunca inek sütlerinin SHS yönünden Türk Gıda Kodeksi ve Avrupa Birliği Komisyonu'nun ilgili tebliğlerinde belirlenen limitlere uygun olduğunu, SHS'nin yıllar arasındaki ve ayrıca farklı yılların aynı mevsim ve ayları arasındaki değişimlerinin istatistiksel olarak önemli olduğunu belirtmişlerdir. Patır ve ark (2010) Elazığ, Samsun, Malatya, Şanlıurfa ve Erzurum illerinden alınan toplam 440 adet çiğ süttten 11 tanesinin  $1,0 \times 10^5$ - $5,0 \times 10^5$  (adet/ml) arasında (% 2,5), 139 tanesinin  $5,0 \times 10^5$ - $1,0 \times 10^6$  (adet/ml) arasında (% 31,6) ve 290 tanesinin ise  $1,0 \times 10^6$  (adet/ml)'den fazla (% 65,9) SHS içerdini dolayısıyla farklı illerden elde edilen çiğ inek sütlerinin % 97,5'inin SHS bakımından Türk Gıda Kodeksi' ne uygun olmadığını bildirmişlerdir. Koç ve ark (2009), 36 süt sığırı işletmesinden temin ettikleri çiğ sütlerde ortalama SHS'yi 743.019 (adet/ml), ortalama MAKS'ı 849.181 (kob/ml) olarak bulduklarını ve bu çalışmada bulunan genel ortalamaların Türk Gıda Kodeksi ve Avrupa Birliği kriterlerine uymadığını belirtmişlerdir. Çoban ve ark

(2007) iki işletmeye ait 150 inekten aldıkları çiğ süt numunelerinde ortalama SHS'yi  $5.3 \times 10^5$  (adet/ml) olarak bulmuş ve bu değerlerin Türkiye ve Avrupa Birliği standartlarının üzerinde olduğunu belirtmiş ayrıca SHS'nin kış mevsiminde, yaz mevsimine göre daha yüksek olduğunu rapor etmiştir. Önal ve Özder (2007) Edirne, Tekirdağ ve Kırklareli illerindeki 8 ayrı süt alım güzergâhından toplanan 36 adet süt örneğinin genel SHS ortalamasını 5,48 log olarak bulduklarını ve bunun tebliğe uygunluk gösterdiğini bildirmişlerdir. Belirtilen illerden alınan süt örneklerinin MAKS ortalamasının  $3,85 \times 10^5$  (kob/ml) olduğunu ve bunun tebliğde belirtilen değerlerin üzerinde olduğunu belirtmişlerdir. Eyduran ve ark (2005) ise SHS'nin yaz mevsiminde kışa göre daha fazla olduğunu bildirmiştir. Topaloğlu ve Güneş (2005) ise mevsim faktörünün SHS üzerine etkisinin önemsiz olduğunu bildirmiştir.

Bu araştırma mevzuata uygunluk yönüyle Temelli ve Şerbetçioğlu (2011) ile Önal ve Özder (2007)'in çalışmalarıyla benzerlik göstermekte iken Patır ve ark (2010), Koç ve ark (2009) ile Çoban ve ark (2007)'nin çalışmalarıyla benzerlik göstermemektedir. Bu durumun, süt kalitelerinin farklılığından ve süt alım bölgeleri ile çiftliklerin seçiminden kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Bu çalışmada çiğ süt numunelerinin temin edildiği çiftliklerin ve ineklerin araştırma süresince hastalıklar ve ilaç kullanımı yönünden kontrol altında tutulması, süt kalitesini etkileyebilecek hastalıklarda tecrit uygulanması ve şüpheli sütlerin araştırma kapsamına dâhil edilmemesinin süt kalitesini etkilediği düşünülmektedir. Analize alınan çiğ sütlerin SHS yönünden yasal limitlere uygun olmasının bu faktörlerle ilişkili olduğu tahmin edilmektedir.

Alınan numune sayısının az olması sebebiyle çiftlik içi ve çiftlikler arası SHS ve MAKS değerleri arasında mevsimsel fark olup olmadığı istatistiksel olarak değerlendirilememiştir.

Elde edilen verilerin istatistiksel metotlara uygulanamaması sebebiyle SE oluşumunun çiftlik, mevsim, sıcaklık ve zamanla direkt olarak ilişkisinin olup olmadığı istatistiksel olarak belirlenememiştir. Fakat SE oluşumuna sebep olan KPSS dikkate alındığında dolaylı olarak değerlendirme yapılabilmektedir.

Araştırmada 4 °C'de muhafaza edilen numunelere ait KPSS(12), KPSS(24) ve KPSS(48)'in kontrol numunelerine ait KPSS'lere kıyasla azaldığı ya da <10 olduğu, hiçbir numunede artış göstermediği belirlenmiştir.

Elde edilen bu veriler, stafilokokal gelişim için gerekli olan en düşük sıcaklığın 7 °C olduğunu belirten Baird-Parker (1990), Erol (2003), Asperger ve Zangerl (2003), Paulin ve ark (2012)'nin bildirimleri ile uyuşmaktadır. UHT sütte stafilokokal üremenin 7 °C'de olduğunu bildiren Medvedova ve ark (2009a)'nın çalışmaları da bu sonuçları desteklemektedir.

Ayrıca 4 °C'de muhafaza edilen örnekler kendi aralarında karşılaştırıldığında süre uzadıkça KPSS'nin genellikle azaldığı; 24 saat inkübasyonun 12 saate kıyasla, 48 saat inkübasyonun da 12 saat ve 24 saate kıyasla KPSS'yi azalttığı görülmüştür. Bu azalmanın sebeplerinin sıcaklığın stafilokokal gelişime uygun olmayacak kadar düşük olması, rekabetçi floranın baskısı ve sekonder metabolitlerin etkisi gibi faktörler olduğu tahmin edilmektedir. Mossel ve Van Netten (1990), Le Loir ve ark (2003) ile Ekici ve ark (2008) da söz konusu faktörlerin stafilokok gelişimini baskıladığını bildirmişlerdir. Janstova ve ark (2012) ise doğal rekabetçi mikrofloranın *S. aureus*'un büyümesini ve SE üretimini inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

Araştırmada 10 °C'de muhafaza edilen numunelere ait KPSS(12)'nin kontrol numunelerine ait KPSS'lere göre genellikle azaldığı, 1 numunede aynı kaldığı ve 1 numunede ise artış gösterdiği görülmüştür. Yine 10 °C'de bekletilen numunelere ait KPSS(24) ve KPSS(48)'in kontrol numunelerine ait KPSS'lere göre genellikle azaldığı sadece 1'er numunede artış gösterdiği belirlenmiştir.

Elde edilen bu veriler, 10 °C'lik sıcaklığın stafilokokal gelişime için nispeten düşük olduğunu fakat gelişime için uygun sıcaklık limitleri içerisinde bulunduğunu göstermektedir. Nitekim Paulin ve ark (2012) stafilokokal gelişime sıcaklık limitlerini 7-48 °C olarak bildirmiş, Medveova ve ark (2009b) ise  $1 \times 10^3$  (kob/ml) düzeyinde *S. aureus* içeren sütün 10 °C'de 140 saat inkübasyon sonunda toksin oluşturabilecek düzeye ulaştığını bildirmiştir. Buna ilaveten yukarıda bahsedilen ve 12 saat, 24 saat ve 48 saat inkübasyon sonunda artış gösterdiği belirtilen 3 numunenin KPSS'leri 4.230 log (kob/ml), 4.397 log (kob/ml) ve 4.380 log (kob/ml) olup başlangıç



KPSS'si de 4.204 log (kob/ml)'dir. Bu numunelerden 2 tanesi 22 °C'de 24 ve 48 saat inkübasyonu takiben SE pozitif bulunmuştur.

Bunun yanı sıra 10 °C'de muhafaza edilen örneklerde süre uzadıkça KPSS'nin genellikle azaldığı; 24 saat inkübasyonun 12 saate kıyasla, 48 saat inkübasyonun da 12 saat ve 24 saate kıyasla KPSS'yi ekseriyetle azalttığı görülmüştür. Bu azalmanın sebeplerinin sıcaklığın stafilokokal gelişim için nispeten düşük olması, başlangıç KPSS'sinin düşük kalması, rekabetçi floranın baskısı ve sekonder metabolitlerin etkisi gibi faktörler olduğu tahmin edilmektedir. Alomar ve ark (2008), Anas ve ark (2008) ile Charlier ve ark (2009) da bahsedilen faktörlerin stafilokok gelişimini inhibe ettiğini belirtmişlerdir.

Araştırmada 22 °C'de muhafaza edilen çiğ süt numunelerine ilişkin KPSS(12), KPSS(24) ve KPSS(48)'in kontrol numunelerine ait KPSS'lere göre değişkenlik gösterdiği; nispeten başlangıçtaki mikroorganizma düzeyinin düşük olduğu durumlarda KPSS(12), KPSS(24) ve KPSS(48)'de azalma, mikroorganizma düzeyinin yüksek olduğu durumlarda ise KPSS(12), KPSS(24) ve KPSS(48)'de artış olduğu gözlenmiştir.

Başlangıç mikroorganizma düzeyinin yüksek olması, rekabetçi floranın azlığı ve 22 °C'lik sıcaklığın hem stafilokok gelişimi hem de SE oluşumu için uygun olması sebebiyle başlangıç KPSS'si 4.204 log (kob/ml) olan numunede 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda SE tespit edildi. Jablonski ve Bohach (2001), *S. aureus* sayısının  $1 \times 10^3$ - $1 \times 10^5$  (kob/g) düzeyine ulaşması halinde toksin oluşabileceğini ve bu durumun tüketici sağlığını tehdit edebileceğini bildirmiş, De Oliveira ve ark (2011) ise *S. aureus*'un  $1 \times 10^3$  (kob/ml) seviyesinin üzerine çıkmasının özellikle çiğ sütlerde SE oluşumu riskini artırdığını rapor etmişlerdir. Medveova ve ark (2009b) ise, sütte  $1 \times 10^3$  (kob/ml) düzeyinde *S. aureus* DI izolatının 21 °C'de 24 saatte toksin oluşturabilecek düzeye ulaştığını,  $1 \times 10^3$  (kob/ml) düzeyinde *S. aureus* 2064 izolatının 21 °C'de 8 saatte  $1 \times 10^6$  (kob/ml) seviyesine, 24 saatte  $1 \times 10^7$  (kob/ml) seviyesine ve 48 saatte  $1 \times 10^8$  (kob/ml) seviyesine ulaştığını bildirmişlerdir.

Ayrıca 22 °C'de muhafaza edilen örnekler kendi aralarında karşılaştırıldığında süre uzadıkça KPSS'nin genellikle azaldığı; 24 saat inkübasyonun 12 saate kıyasla, 48 saat inkübasyonun da 12 ve 24 saate kıyasla KPSS'yi genellikle azalttığı

görülmüştür. Bu azalmanın sebeplerinin başlangıç KPSS'sinin düşük kalması, rekabetçi floranın baskısı ve sekonder metabolitlerin etkisi gibi faktörler olduğu tahmin edilmektedir. Benzer şekilde Le Loir ve ark (2003) ile Ekici ve ark (2008) da bahsedilen faktörlerin önemini rapor etmişlerdir.

Bunun yanı sıra başlangıç KPSS'si  $1.6 \times 10^4$  (kob/ml) olan numune ile ilgili olarak; süre uzadıkça KPSS'nin arttığı; 24 saat bekletmenin 12 saate göre, 48 saat bekletmenin de 12 ve 24 saate göre KPSS'yi artırdığı görülmüştür. Başlangıç KPSS'sinin yüksek olması, rekabetçi floranın azlığı ve sıcaklığın gelişme limitleri dâhilinde olması gibi faktörlerin buna zemin hazırladığı düşünülmektedir. Nitekim bunlardan KPSS(24)'ü 5.949 log (kob/ml) olan numune ile KPSS(48)'i 6.113 log (kob/ml) olan iki numune SE pozitif bulunmuştur. Cowell ve ark (2002) ile Erol ve İşeri (2004) de stafilokokların  $1 \times 10^6$  (kob/g) veya daha yüksek sayıya ulaşmasıyla enterotoksin sentezlendiğini bildirirken Tükel ve Doğan (2000) *S. aureus* sayısı  $1 \times 10^5$  (kob/g) olan gıdaların kesinlikle risk taşıdığını savunmuştur. Ayrıca Janstova ve ark (2012) pastörize ve UHT sütte  $1 \times 10^5$  (kob/ml) limitinin altında SEC toksinleri tespit ettiklerini rapor etmişlerdir. Söz konusu görüşler bu çalışma sonunda elde edilen verilerle uygunluk göstermektedir. Medvedova ve ark (2009b) inkübasyon sıcaklığı 21 °C'den düşük olan sıcaklıklarda da (18 °C, 15 °C, 12°C) inkübasyon süresinin uzamasıyla SE oluşumu tespit etmişlerdir. Janstova ve ark (2012) ise pastörize ve UHT sütte 22 °C de 12 saat inkübasyondan sonra SEA, 15 saat inkübasyondan sonra SEB tespit etmişlerdir.

Bu araştırmada inkübasyon sıcaklığıyla KPSS(12), KPSS(24) ve KPSS(48) arasındaki ilişki istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (Çizelge 3.2).

Bilimsel çalışmalar mikroorganizmaların gelişimini etkileyen en önemli faktörlerden birisinin de sıcaklık olduğunu net bir şekilde ortaya koymaktadır. Fakat bu araştırmada kullanılan materyalin çiğ süt olması daha kompleks bir değerlendirme yapılmasını zorunlu kılmaktadır. Farklı sıcaklık derecelerinin etkisini ortaya koyabilmek için sadece sıcaklık faktörüne ait değişkenlerin olması ve bunun dışındaki faktörlerin etkisinin olmaması gerekmektedir. Dolayısıyla bu çalışmada sıcaklık faktörünü kendi başına ve bağımsız tek bir faktör gibi değerlendirmenin mahzurlu olacağı düşünülmüştür. Doğal olarak çiğ sütün içerisinde çok sayıda ve çok farklı klasifikasyona ait mikroorganizmanın bulunması, alındığı çiftliğe dair pek çok

faktörün ve sürenin etkisi de KPSS'yi ve dolayısıyla SE oluşumunu etkilemektedir. Bu çalışmada görülen istatistiksel farkların multifaktörel etkilerden dolayı sıcaklık ve mevsimden ziyade çiftlik ve inkübasyon süresinden kaynaklandığı görülmüştür.

İnkübasyon süresi 12 saat olan numuneler incelendiğinde genel olarak, başlangıç KPSS'si yüksekse 22 °C'de bekletilen numunelerin KPSS(12)'sinin 4 °C ve 10 °C'de inkübe edilen numunelere kıyasla arttığı anlaşıldı. Benzer şekilde 24 saat süreyle inkübasyona tabi tutulan numuneler incelendiğinde genel olarak, başlangıç KPSS'si yüksek ise 22 °C'de inkübe edilen numunelerin KPSS(24)'ünün 4 °C ve 10 °C'de inkübe edilen numunelere kıyasla arttığı görüldü. Bunun sebeplerinin rekabetçi floranın azlığı, başlangıç KPSS'nin yüksek olması ve 22 °C sıcaklığın 4 °C ile 10 °C'ye nazaran stafilokokal çoğalma için nispeten daha uygun olması gibi faktörler olduğu düşünülmektedir. Başlangıç KPSS'sinin düşük olduğu numunelerde bu durum izlenmedi.

İnkübasyon süresi 48 saat olan numuneler göz önüne alındığında genel olarak, başlangıç KPSS'si yüksek ise 22 °C'de bekletilen numunelerin KPSS(48)'inin 4 °C ve 10 °C'de inkübe edilen numunelere göre arttığı belirlendi. Bu durumun başlangıç KPSS'sinin çoğalma için yeterli düzeye ulaşmış olması, rekabetçi floranın azlığı ve 22 °C sıcaklığın 4 °C ile 10 °C'ye kıyasla stafilokokal çoğalma için nispeten uygun olması gibi sebeplerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Başlangıç KPSS'sinin düşük olduğu numunelerde bu durum görülmedi.

Bu araştırmada 12-24 saat, 12-48 saat ve 24-48 saatlik inkübasyon süresiyle KPSS arasındaki ilişki istatistiksel olarak önemli bulundu (Çizelge 3.5).

Yapılan pek çok bilimsel çalışma bu görüşü desteklemektedir. Janstova ve ark (2012) pastörize ve UHT sütlerle yaptıkları bir çalışmada 22 °C'de 12 saat inkübasyon sonunda SEA, 15 saat inkübasyon sonunda da SEB tespit etmişlerdir. 15 °C'de inkübe edilen pastörize sütte 81 saat, UHT sütte ise 90 saat sonunda SEA saptamışlardır. Medveova ve ark (2009b) ise yaptıkları çalışmada  $1 \times 10^3$  (kob/ml) düzeyinde *S. aureus* içeren sütün toksin oluşturabilecek düzeye ulaşabilmesi için 10 °C'de 140 saat, 12 °C'de 72 saat, 15 °C'de 48 saat ve 21 °C'de 24 saat inkübasyon süresinin geçtiğini bildirmişlerdir.

Bu araştırma sonunda çiğ süt numunelerinin temin edildiği çiftlik ile KPSS(12), KPSS(24) ve KPSS(48) arasında oldukça anlamlı bir ilişki olduğu, çiftliğin KPSS üzerine çok önemli etkisinin bulunduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.3). Çalışma sonunda elde edilen veriler, KPSS'nin ve dolayısıyla SE oluşumunun sütün elde edildiği çiftlik ile ilişkisini ortaya koymuş, çiftlikler arasındaki farkın oldukça önemli olduğunu göstermiştir.

Yapılan araştırmalar işletme faktörünün son derece önem taşıdığını açık bir şekilde ortaya koymuştur. Soriano (2002), gıdaların enterotoksijenik stafilokoklarla kontaminasyonunda personel hijyeniyle ilgili problemlerin yanı sıra işletmelerde kullanılan alet ve ekipmanın temizlik ve dezenfeksiyonuna ilişkin hataların da önemli rol oynadığını dolayısıyla hijyene azami özen gösterilmesi gerektiğini bildirmişlerdir. De Oliveira ve ark (2011) da *S. aureus* varlığının yetersiz hijyen koşulları ile ilgili olduğu görüşünü ifade etmiştir. Santos ve ark (1981) ise yaptıkları bir çalışma sonunda çiğ sütlerde % 46,9 oranında *S. aureus* izole etmişler ve bu durumu mastitisli süt kullanımına ve işletmede sağım hijyenine uyulmamasına bağlamışlardır.

İşletmelerden kontrol grubu olarak alınan toplam 12 adet numunenin 11'inde (% 91,6) KPS bulunmuştur. Bu çalışma sonunda KPS olarak bulunan mikroorganizmalar *S. aureus* olarak tanımlanırken sadece 1 numunede 2 log (kob/ml) düzeyinde *S. hyicus* bulunmuştur. Diğer KPS'lerin bulunmadığı belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak çiftliklerden alınan toplam 12 adet numunenin 10'unda (% 83,3) sadece *S. aureus* bulunurken 1'inde (% 8,3) hem *S. aureus* hem de *S. hyicus* bulunmuştur (Şekil 3.4). Elde edilen 148 izolattan 144'ü *S. aureus* (% 97,3) olarak 4'ü de *S. hyicus* (% 2,2) olarak tanımlanmıştır.

De Oliveira ve ark (2011), 50 adet çiğ sütün 34'ünden (% 68), 20 adet pastörize sütün 6'sından (% 30) *S. aureus* izole etmişlerdir. Bendahou ve ark (2009), 81 adet çiğ süt ve geleneksel süt ürünleri kullanarak elde ettikleri 46 adet KPS izolatından 40 tanesini *S. aureus*, 4 tanesini *S. hyicus*, 2 tanesini de *S. intermedius* olarak tespit etmişlerdir. Bir başka çalışmada Garcia ve ark (2009), çeşitli mandıralardan aldıkları 75 adet süt örneğinin hepsinde *S. aureus*'a rastladıklarını bildirmişlerdir. Rall ve ark (2008) ise klasik kültürel metotlarla 54 adet çiğ süt örneğinden 38 adet *S. aureus* izole etmişlerdir. Bendahou ve ark (2008), 81 adet süt

ve ürünü kullanarak elde ettikleri 100 adet izolatin % 54'ünü KNS, % 40'ını *S. aureus*, % 4'ünü *S. hyicus* ve % 2'sini *S. intermedius* olarak tespit etmişlerdir. Cremonesi ve ark (2006), büyükbaş ve küçükbaş hayvanların sütleri ile yaptıkları çalışmada, 111 örneğin tamamında koagulaz pozitif *S. aureus* saptamışlardır. 95 adet örneğin (% 86) enterotoksinlerden en az birini içerdiği belirtilirken 73 adet büyükbaş sütünden 58'inin (% 79), 38 adet küçükbaş sütünden 37'sinin (% 97) enterotoksin içerdiği bildirilmiştir. Normanna ve ark (2005) İtalya'da yaptıkları bir çalışmada 437 adet çiğ süt örneğinin 168'inde, 102 adet ısıtılmış işlem görmüş süt örneğinin 2'sinde koagulaz pozitif *S. aureus* tespit etmişlerdir. Jorgensen ve ark (2005b), yaptıkları bir çalışmada 220 adet inek sütünün 165'inde (% 75) *S. aureus*, % 22,1'inde SE, 213 keçi sütünün 205'inde (% 96,2) *S. aureus*, % 57,3'ünde SE tespit ettiklerini rapor etmişlerdir. Gran ve ark (2003) çiğ sütlerden % 82 oranında, Chye ve ark (2004) ise % 60'dan yüksek oranda *S. aureus* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Akineden ve ark (2001) tarafından Almanya'da 103 adet süt örneğiyle yapılan bir çalışma sonunda örneklerin hepsinde *S. aureus* bulunmuştur. Araştırmacılar 17 adet örnekte SEI, 21 adet örnekte SEG ve SI, 21 adet örnekte SED ve SEJ, 15 adet örnekte SEC, SEG, SEI ve TSST-1 olduğunu bildirmişlerdir. Umoh ve ark (1990) yapmış oldukları bir çalışma ile 42 adet çiğ inek sütünün 13'ünden (% 31) enterotoksijenik stafilocok izole ettiklerini belirtmişlerdir.

Yücel ve Anıl (2011) ise çiğ süt örneklerinden elde ettikleri 157 izolata ait dağılımı % 40'ı *S. intermedius*, % 35'i *S. aureus*, % 9'u *S. schleiferi*, % 6,4'ü *S. lugdunensis*, % 6,4'ü *S. delphini*, % 3,2'si *S. hyicus* olarak rapor etmişlerdir. Yapılan bir başka çalışmada 80 adet çiğ süt örneğinden 93'ü koagulaz pozitif, 52'si koagulaz negatif olmak üzere 145 stafilocok izolatu tür düzeyinde identifiye edilmiş olup çiğ süt, pastörize süt ve beyaz peynir örneklerinde stafilocokal enterotoksin tespit edilememiştir (Gökmen ve ark 2009). Gündoğan ve ark (2006) ise, 60 adet çiğ süt örneğinin hepsinden (% 100), 60 adet pastörize süt örneğinin 34'ünden (% 56,6), 60 adet dondurma örneğinin 16'sından (% 26,6) olmak üzere toplam 180 örneğin 110'undan (% 61,1) *S. aureus* izole ettiklerini açıklamışlardır. Alışarlı ve Solmaz (2003), yaptıkları bir çalışma sonunda 100 adet çiğ süt örneğinde tespit ettikleri KPS oranını % 43, *S. aureus* oranını ise % 31 olarak rapor etmişlerdir. Evrensel ve ark (2003), yaptıkları çalışmada çiğ süt örneklerindeki KPS düzeyini  $1.9 \times 10^4$  (kob/ml) olarak bildirmişlerdir.

Bu araştırmada KPSS(12), KPSS(24) ve KPSS(48)'in sütün alındığı mevsime bağlı olarak değişmediği, mevsimin KPSS üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemsiz olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.4). Dolayısıyla SE oluşumunun sütün alındığı mevsim ile ilgisinin olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

Rahimi ve ark (2012), 72 adet çiğ sütün örneği ile yaptıkları çalışma sonunda 15 adet örneğin (% 20,8) en az bir çeşit enterotoksin içerdiğini tespit etmişlerdir. Kış, ilkbahar ve yaz aylarında alınan sütün örneklerinde sırasıyla % 16,7, % 29,2 ve % 16,7 oranında enterotoksin saptamışlar ve yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda enterotoksin oluşumu yönüyle mevsimler arasında önemli bir fark olmadığını rapor etmişlerdir.

Araştırmada 12 tanesi kontrol grubuna, 108 tanesi de deney grubuna ait olmak üzere toplam 120 adet SE analizi yapılmıştır. Kontrol grubu olarak alınan numunelerin hiçbirisinde SE bulunamamıştır. Janstova ve ark (2012), pastörize ve UHT sütün aksine çiğ sütte doğal rekabetçi mikroflora sebebiyle *S. aureus*'un gelişiminin ve SE üretiminin inhibe edildiğini bildirmiştir. Küplülü ve ark (2002) da Ankara'da tüketime sunulan pastörize sütünlerde SE varlığı ile ilgili yaptıkları çalışmada 250 adet sütün örneği kullanarak bir tanesi yaz döneminde bir tanesi de kış döneminde olmak üzere toplam iki örnekte SEA olduğunu saptamışlardır.

Farklı süre ve sıcaklıklarda muhafaza edilen deney grubu numunelerine ait SE analizlerinden 4 tanesi pozitif bulunmuştur (Şekil 3.6 ve Şekil 3.7). SE yönünden pozitif bulunan numunelerden 2'sinde KPS bulunamazken SE oluşumunun KNS'lerden olan *S. haemolyticus*'tan kaynaklandığı anlaşılmıştır. SE yönünden pozitif bulunan diğer 2 numunede ise etkenin *S. aureus* olduğu belirlenmiştir. SE yönünden pozitif bulunan numunelerin 22 °C'de 24 ve 48 saat inkübe edilmiş olduğu gözlenmiştir. Hem 12 saat süreyle inkübe edilen numunelerde hem de 4 °C ve 10 °C'de inkübe edilen numunelerde SE tespit edilememiştir (Şekil 3.6 ve Şekil 3.7).

Yılmaz ve Gönülalan (2010), yaptıkları bir çalışmada 60 adet çiğ sütün örneğinin 30'unda *S. aureus*, 37'sinde stafilokokal enterotoksin (19 SEA, 3 SEB, 9 SEC, 6 SED) bulmuşlardır. Bir başka çalışmada (Ertaş 2010) incelenen 100 adet çiğ sütün numunesinin 60'ında *Staphylococcus spp* üremesi tespit edilmiştir. İncelenen 300 adet izolatın 42'sinin (% 14) *S. aureus* olduğu belirlenmiş, belirlenen 42 adet *S.*

*aureus* izolatının incelenmesi sonucunda 31 izolatta (% 73,8) enterotoksin genlerinin varlığı tespit edilmiştir. Söz konusu 42 adet izolata ait çiğ sütlerin ELISA tekniği ile incelenmesi sonucunda ise 28 örnekte (% 66,6) SE varlığı belirlenmiş, *S. aureus* izole edilmeyen çiğ sütlerde SE varlığına rastlanılmamıştır. Çalışmalarda tespit edilen KPS ve SE oranlarının birbirinden farklı olmasının materyal ve metodun yanı sıra işletmeye bağlı faktörlerden kaynaklandığının düşünüldüğü belirtilmiştir.

Süt ürünleriyle ilgili olarak yapılan bazı çalışmalar KPSS ve SE oluşumu hakkında veriler sunmakta ve konuya ışık tutmaktadır.

Seçim ve Uçar (2011) piyasada satılan 80 adet sütlü tatlının 47'sinde KPS tespit ettiklerini, ortalama KPSS dikkate alındığında en düşük değer 0,87 log (kob/g) ile sütlaç numunelerine ait olduğunu, en yüksek değer 3,76 log (kob/g) ile güllaç numunelerine ait olduğu bildirmişlerdir. Deneysel olarak üretilen 24 adet sütlü tatlının 2'sinde KPS saptandığını, en yüksek KPSS'yi 0,98 log (kob/g) ile sufle örneklerinde tespit ettiklerini belirtmişlerdir.

Güner ve ark (2004) sade, kakaolu, limonlu ve çilekli 109 adet dondurma numunesinde ortalama *S. aureus* sayısını  $1,2-1,7 \times 10^3$  (kob/g) tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Ağaoğlu ve Alemdar (2004), 75 adet dondurma örneğinin % 13,3'ünde koagülaz pozitif *S. aureus* saptamışlardır. Mukan ve Evliya (2002), Adana'da tüketime sunulan dondurmalarda yaptıkları incelemede örneklerin hiçbirinde *S. aureus* izole edememişlerdir. Bununla birlikte örneklerin tümünde KNS izole etmişler, bunların *S. epidermidis* olduğunu saptamışlar ve sayılarının ortalama  $2,4 \times 10^5$  (kob/g) olduğunu bildirmişlerdir. Toklu ve Yaygın (2000)'in Antalya'da 69 adet dondurma örneği kullanarak yaptıkları çalışmada örneklerin % 88,4'ünde koliform, % 69,5'inde *E. coli* ve % 49,2'sinde *S. aureus* bulunmuştur. Yücel ve Çıtak (2000), Ankara'da tüketime sunulan 30 adet dondurma örneğinde en düşük ve en yüksek *S. aureus* sayısını  $1,0 \times 10^2-3,0 \times 10^3$  (kob/ml) olarak bulmuşlardır. Erol ve ark (1998), Ankara'da 100 adet dondurmaya mikrobiyolojik yönden inceleyerek örneklerin % 20-30,8'inde  $1 \times 10^2-1 \times 10^4$  (kob/g) düzeyinde KPS bulmuş ve örneklerin % 2'sinde *E. coli* ve *Salmonella* spp izole etmişlerdir. Evrensel ve Güneş (1998), Bursa'da sade dondurmalar üzerine yaptıkları çalışmada, koagülaz pozitif *S. aureus*'u  $1,0 \times 10^2-6,3 \times 10^5$  (kob/g) düzeyinde saptamışlardır. Özcan ve Kural (1997), Bursa il merkezinde yaptıkları bir çalışmada limonlu dondurmalarda ortalama

10,11x10<sup>3</sup> (kob/g), vişneli dondurmalarda ortalama 8,01x10<sup>3</sup> (kob/g), çilekli dondurmalarda ortalama 11,46x10<sup>3</sup> (kob/g) düzeyinde stafilokok bulduklarını belirtmişleridir.

Önganer ve Kırbağ (2009), 30 adet çökelek peyniri ile yaptıkları bir çalışma sonunda *S. aureus* düzeyinin en az 6x10<sup>6</sup> (kob/g), en çok 10.28x10<sup>6</sup> (kob/g) olduğunu bildirmişlerdir. Günşen ve Büyükyörük (2003), Bursa’da 125 adet vakumla paketlenmiş taze kaşar peynirini incelemişler ve örneklerin 4’ünde *S. aureus* tespit etmişlerdir. *S. aureus* düzeyini en yüksek 1.8x10<sup>3</sup> (kob/g), en düşük 1.0x10<sup>2</sup> (kob/g) olarak bildirmişlerdir. Usca ve Erol (1998), 50 adet hellim peynirleriyle yaptıkları çalışmada örneklerin % 26’sında 1x10<sup>3</sup> (kob/g) düzeyinde KPS bulmuşlardır.

Rosec ve ark (1997), Fransa’da yaptıkları bir çalışma sonunda 121 gıda örneğinden 213 *S. aureus* suşu izole etmişlerdir. Çiğ süttten üretilen peynirlerden izole edilen *S. aureus* suşlarının % 15,9’unun enterotoksin ürettiği, diğer gıdalardan izole edilen *S. aureus* suşlarının ise % 43’ünün enterotoksijenik özellikte olduğu belirlenmiştir. Bone ve ark (1989), koyun sütünden yapılmış peynirlerle yaptıkları çalışmada örneklerin hiçbirinde canlı patojen bakteri bulamadıkları halde SEA tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Alişarlı ve ark (2003), puding ve kremalı pastalarla yaptıkları çalışmada pudinglerin % 10’unda, kremalı pastaların % 27’sinde *S. aureus* bulunduğunu, 7 örnekte SEA, 2 örnekte SEC, 2 örnekte SEA ve SEB tespit edildiğini ve enterotoksin üreten *S. aureus*’ların tamamının termonükleaz aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir. Alişarlı ve ark (2002), enterotoksijenik *S. aureus* suşlarının kremalı pastalarda gelişme ve toksin oluşturma yeteneklerini incelemiş ve SEA oluşturan *S. aureus* suşlarının düşük sıcaklıklarda da toksin oluşturabileceğini saptamışlardır. Kısa ve ark (1996), Ankara’da yaptıkları çalışma sonunda sade kremalı pasta örneklerinin % 73,3’ünde -ortalama 6.3x10<sup>2</sup> (kob/g)-, kakaolu ve meyveli kremalı pasta örneklerinin tamamında -ortalama 1.7x10<sup>3</sup> (kob/g)- KPS saptadıklarını belirtmişlerdir. Örneklerin % 5’inde enterotoksin oluşturabilecek düzeyde KPSS bulunduğunu rapor etmişlerdir. Sade kremalı örneklerin 4’ünde (% 36,4), kakaolu kremalı örneklerin 12’sinde (% 22,6) ve meyveli kremalı örneklerin 9’unda (% 28,1) olmak üzere toplam 25 (% 26,0) pastadan izole edilen KPS’lerin enterotoksin oluşturma yeteneğinde olduğunu saptamışlardır.



## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırma sonunda çiğ inek sütlerinin SHS, MAKS, KPSS, SE değerleri hakkında bilgiler elde edilerek çiğ süt kalitesi ve çiftlik hijyeni hakkında yorum yapılabilecek veriler sağlanmıştır. Alınan çiğ süt örneklerinin SHS yönünden yasal limitlere uygun olduğu belirlenmiştir.

Araştırma sonunda çiğ sütlerin temin edildiği çiftlikler arasında önemli farklılıklar bulunmuş, inkübasyon süresinin de önemli olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca araştırmada mevsim faktörünün KPSS ve dolayısıyla SE oluşumu üzerine etkisinin önemsiz olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Türkiye'de önceki yıllarda "Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği" gereğince gıdalarda sadece *S. aureus* sayımı ile ilgili analizler yapılmaktaydı. Genişletilen kapsam çerçevesinde halen "Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği" gereğince KPS sayımı ve SE analizleri yapılmaktadır. Fakat bazı KNS türlerinin de SE oluşturduğu bilinmektedir. Bu araştırmada da SE tespit edilen dört adet numuneden ikisinde etkenin KNS olan *S. haemolyticus*'tan kaynaklandığı belirlenmiştir.

-Çiğ sütlerin temin edildiği çiftlikler arasında önemli farklılıkların bulunmuş olması, işletme faktörünü öne çıkarmaktadır. Dolayısıyla personel hijyeni ve eğitimi, kullanılan alet ve ekipmanların temizliği, işletme yönetim sistemi, tesisin konumu, altyapı ve çevrenin kontrolü, bina tasarımı, temizlik maddesi seçimi, hijyen alanları, evcil hayvan ve bitki kontrolü, haşerelerle mücadele programı, işletme drenaj sistemleri, atık ve çöp kontrolü, üretim süreçlerinin izlenmesi ve kontrolü, gıda güvenliği yönetim sistemlerinin mevcudiyeti gibi işletme hijyenine etki eden tüm faktörlere dikkat edilmelidir.

-İnkübasyon süresinin önemli olduğu sonucunun bulunması, üretimden tüketime/ürün işlemeye kadar geçen sürenin mümkün olduğu kadar kısaltılması gerektiğini ortaya koymaktadır. Süt kalitesine önemli ölçüde katkı sağlayabilmek için çiftlikteki depolama süresi azaltılmalı ve çiftlikten fabrikaya ulaşım periyodu kısaltılmalıdır. Süt ve süt ürünlerinin kalite ve güvenilirliğini kontrol etme hususunda sürecin tamamını kapsayan bütüncü bir yaklaşım ortaya konulmalıdır.

-Bu araştırma sonuçlarının SE oluşturan KNS türlerinin sayımı ile ilgili analizlerin mevzuata dahil edilmesi hususunda katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

-Bu araştırmanın Türkiye'de çiğ sütlerde KPSS ve SE oluşumu ile ilgili akademik çalışma sayısının ve bilimsel verilerin artırılmasına yönelik çabalara destek verebileceği tahmin edilmektedir.

## 6. ÖZET

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

### **Farklı Süre ve Sıcaklıklarda Muhafaza Edilen Çiğ Sütlerde Koagulaz Pozitif *Staphylococcus* Türlerinin Dağılımı ve Stafilokokal Enterotoksin Oluşumu**

**Mustafa İNAL**

**Danışman: Prof. Dr. Gürkan UÇAR**

**Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı**

**DOKTORA TEZİ / KONYA-2014**

Bu araştırmanın amacı, çiğ sütlerin farklı süre ve sıcaklıklarda muhafaza edilmesi ile KPS türlerinin dağılımı ve SE oluşumu arasındaki ilişkinin araştırılmasıdır.

Materyal olarak kullanılan çiğ sütler Konya'da bulunan 3 çiftlikten temin edildi. Farklı süre ve sıcaklıklarda muhafaza edildikten sonra analiz edilmek üzere, her çiftlikten 3 aylık her bir dönemde 10 adet çiğ süt örneği alındı ve böylece bir çiftlikten 4 kez toplam 40 (4x10) adet örnek alındı. Numuneler 4 °C, 10 °C ve 22 °C'de 12, 24 ve 48 saat inkübasyona tabi tutulduktan sonra KPS sayımı analizleri/tür identifikasyonu ve SE analizleri yapıldı.

12 tanesi kontrol grubuna 108 tanesi de deney grubuna ait olmak üzere toplam 120 adet SE analizi yapıldı. Deney grubuna ait analizlerden dört tanesi pozitif bulundu. SE oluşumunun iki numunede *S. haemolyticus*'tan diğer iki numunede ise *S. aureus* 'tan kaynaklandığı belirlendi.

SE tespit edilen numunelerde KPSS, 5.949 log (kob/ml) ve 6.113 log (kob/ml) olarak tespit edildi.

KPS sayısının inkübasyon süreleri ve sütün elde edildiği çiftlik ile ilişkisi istatistiksel olarak önemli bulunurken inkübasyon sıcaklığı ve sütün alındığı mevsim ile ilişkisi istatistiki açıdan önemsiz bulundu.

KPS olarak bulunan mikroorganizmalar *S. aureus* olarak tanımlanırken sadece bir numunede 2 log (kob/ml) düzeyinde *S. hyicus* bulundu. Diğer KPS'lerin bulunmadığı belirlendi.

**Anahtar Sözcükler:** Çiğ Süt; Enterotoksin; Koagulaz; Stafilokok

## 7. SUMMARY

### **Distribution of Coagulase Positive *Staphylococci* and Staphylococcal Enterotoxin Production from Raw Milk Stored at Different Temperatures with Various Periods**

The purpose of this study is to research the relationship between the distribution of KPS and formation of SE in raw milk stored at different temperatures with various periods.

Raw cow's milk were obtained from three milk production enterprises in Konya. From every each business, samples were collected with each quarterly four times a year. For being analyzed, samples after storage at different temperatures with various periods, from each of three months in each period of 10 raw milk samples were taken. So, a total of 40 (4x10) samples were taken four times a year from a business. Therefore, the scope of work within a year in four period (season) 3 from a total of 120 (4x3x10) pieces of raw cow's milk samples was studied. KPS count analysis, species identifications and SE analysis were performed after the samples were incubated for 12 hours, 24 hours and 48 hours at 4 °C, 10 °C and 22 °C.

A total of 120 unit SE analysis were performed that 12 of them belong to control group and 108 of them belong to experimental group. Four of the analysis from the experimental group were positive. The formation of SE was determined because of *S. haemolyticus* in two samples and because of *S. aureus* on the other two samples.

In the samples included SE, KPS counts were found as 5.949 log (cfu/ml) and 6.113 log (cfu/ml).

Statistically, a significant relationship was found between KPSS and incubation period and dairy business that raw milk obtained but a significant relationship was not found between KPSS and incubation temperature and the season that raw milk collected.

Coagulase positive microorganisms were identified as *S. aureus*. In only one sample *S. hyicus* was found as 2 log (cfu/ml). It was determined that the other KPS couldn't found.

**Key Words:** Coagulase; Enterotoxin; Raw Milk; Staphylococcus

## 8. KAYNAKLAR

1. Ağaoğlu S, Alemdar S. Van'da tüketime sunulan dondurmalarda bazı patojenlerin varlığının araştırılması. YYÜ Vet Fak Derg. 2004; 15(1-2): 59-64.
2. Akineden O, Annemuller C, Hassan AA, Lammler C, Wolter W, Zschock M. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. Clin Diagn Lab Immunol. 2001; 8(5): 959-64.
3. Alışarlı M, Emrullah S, Alemdar S, Akkaya L. Kremalı pastalarda *Staphylococcus aureus* suşlarının gelişme ve enterotoksin oluşturma özellikleri üzerine etki yapan faktörler. Türk J Vet Anim Sci. 2002; 26: 535-542.
4. Alışarlı M, Sancak YC, Akkaya L, Elibol C. Bazı sütlü gıdalarda *Staphylococcus aureus*'un izolasyonu, termonükleaz aktivitesi ve enterotoksijenik özelliklerin araştırılması. Türk J Vet Anim Sci. 2003; 27: 1457-1462.
5. Alışarlı M, Solmaz H. Sağmal ineklerin meme başı derileri ve çiğ sütlerinden izole edilen *Staphylococcus aureus*'ların patojenite özellikleri ile bazı antibiyotiklere duyarlılıkları. Atatürk Üniv Ziraat Fak Derg. 2003; 34 (4): 333-339.
6. Alomar J, Loubiere P, Delbes C, Nouaille S, Montel MC. Effect of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecalis* on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in microfiltered milk. Food Microbiology, 2008; 25(3): 502-8.
7. Ameh JA, Edgbe-Nwiyi T, Zaria LT. Prevalence of bovine mastitis in Maiduguri, Borno State, Nigeria. Veterinarski Arhiv, 1999; 69, (2): 87-95.
8. Anas M, Eddine HJ, Mebrouk K. Antimicrobial activity of *Lactobacillus* isolates from Algerian raw goat's milk against *Staphylococcus aureus*. World J Dairy Food Sci. 2008; 3(2): 39-49.
9. Arbutnott JP, Coleman DC, de Azadevo JS. Staphylococcal toxins in human disease. J App Bacteriol. 1990; 69(19): 101-7.
10. Arda M, Mimbay A, Leloğlu N, Aydın N, Kahraman M, Akay Ö, Ilgaz A, İzgür, M, Diker KS. Özel Mikrobiyoloji. Medisan Yayıncılık, Ankara, 1997; 39-45.
11. Argudin MA, Mendoza MC, Rodicio MR. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. Toxins, 2010; 2(7): 1751-73.
12. 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. Epidemiol Infect. 2003; 130(1): 33-40.
13. Asperger H, Zangerl P. *Staphylococcus aureus*. Encyclopaedia of Dairy Sciences. San Diego, Academic Press. 2003; 2563-9.
14. Atanassova V, Meindl A, Ring C. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham-a comparison of classical culturing detection and RFLP- PCR. Int J Food Microbiol. 2001; 68(1-2): 105-13.
15. Aubry-Damon H, Courvalin P. Bacterial resistance to antimicrobial agents: Selected problems in France, 1996 to 1998. Emerging Infectious Diseases, 1999; 5(3): 315-20.
16. Ayçiçek H, Aydoğan H, Küçükkaaslan A, Baysallar M, Başustaoğlu AC. Assesment of the bacterial contamination on hands of hospital food handlers. Food Control, 2004; 15(4): 253-9.

17. Aygen B. Metisiline dirençli stafilocok ve vankomisine dirençli enterokok enfeksiyonları epidemiyoloji patogenezi ve tanısı. 2008; Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji ve enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı- Kayseri, 96s.
18. Baird-Parker AC. The staphylococci: An introduction. J App. Bacteriol Symp S. 1990; 1-8.
19. Baird RM, Lee WH. Media used in the detection and enumeration of *Staphylococcus aureus*. J Food Prot. 1995; 26(1): 15-24.
20. Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. Int J Food Microbiol. 2000; 61(1): 1-10.
21. Bania J, Dabrowska A, Bystron J, Korzekwa K, Chrzanowka J, Molenda J. Distribution of newly described enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* from food. Int J Food Microbiol. 2006; 108(1): 36-41.
22. Bannerman TL. *Staphylococcus, micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: Manual of clinical microbiology, Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (ed). American Society for Microbiology Press, Washington 2003; 384-404.
23. Barnes LM, Lo MF, Adams MR, Chamberlain AHL. Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. Applied Environmental Microbiology, 1999; 65(10):4543-4548.
24. Bautista L, Gaya P, Medina M, Nunez M. A quantitative study of enterotoxin production by sheep milk *staphylococci*. Applied and Environmental Microbiology, 1988; 54(2): 566-9.
25. Baz E, Gülmez M, Güven A, Sezer Ç, Duman B. Kars ilinde satışı sunulan çiğ süt ve beyaz peynirlerin koliform grubu bakterisi, *E.coli*, *E. coli O157: H7* yönünden incelenmesi. Kafkas Üniv Vet Fak Derg. 2003; 9(2): 165-67.
26. Becker H, Schaller G, Martlbauer G. Nachweis von *Staphylococcus aureus*. Enterotoxinen in Lebensmitteln mit kommerziellen Enzymuntersuchen. Arch Lebensmittelhyg, 1994; 45, 27-32.
27. Belay N, Rasooly A. *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin A production in anaerobic environment. J Food Prot. 2002; 65(1), 199-204.
28. Bendahou A, Lebbadi M, Ennane L, Essadqui FZ, Abid M. Characterization of *Staphylococcus* species isolated from raw milk and milk products (lben and jben) in North Morocco. J Infect Dev Ctries. 2008; 2(3): 218-25.
29. Bendahou A, Abid M, Bouteldoun N, Catelejine D, Lebbadi M. Enterotoxigenic coagulase positive *Staphylococcus* in milk and milk products, lben and jben, in northern Morocco. J Infect Dev Ctries. 2009; 3(3): 169-76.
30. Bennett RW. Staphylococcal enterotoxin and its rapid identification in foods by enzyme-linked immunosorbent assay-based methodology. J Food Prot. 2005; 68(6):1264-70.
31. Bergdoll MS, Lee Wong AC. Staphylococcal intoxications. In: Foodborne Infections and Intoxications, Ed: H. P. Reimann and D. O. Cliver, 523-62. Elsevier: 2006.
32. Bertin ML, Vinski J, Schmitt S, Sabella C, Danziger-Isakov L, McHugh M, Procop GW, Hall G, Gordon SM, Goldfarb. Outbreak of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* colonization and infection in a neonatal intensive care unit epidemiologically linked to a healthcare worker with chronic otitis. Infect Control Hosp Epidemiol. 2006; 27(6):581-585.
33. Bhatia A, Zahoor S. *Staphylococcus aureus* enterotoxins: A review. Journal of Clinical and Diagnostic Research, 2007; 1(3): 188-197.
34. Bhunia AK. *Staphylococcus aureus*. In: Foodborne microbial pathogens- mechanisms and pathogenesis. Berlin, Springer New York, 2008. p.125-34.

35. Biçer AT. Hastane izolatu *Staphylococcus aureus* ve koagulaz negatif *Staphylococcus* suşlarında metisilin direncinin farklı yöntemlerle araştırılması. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı-Uzmanlık Tezi 2009; 80.
36. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 2. Baskı. Bornova-İzmir, Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, 1995; 493-504.
37. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyoloji - Özel Bakterioloji ve Bakteri Enfeksiyonları. 10.baskı. İzmir, Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, 2000; 239-68.
38. Biomerieux. Vitek-2 Sistem Ürün Bilgisi. 24474, 05/2010.
39. Biomerieux. Vitek-2 Sistem Ürün Bilgisi. 410825, 09/2010.
40. Biomerieux. REF 30705-Vidas Staph Enterotoksin II- 12095E-2008/06.
41. Biomerieux Minividas Kullanım Klavuzu 93607-G-tr-2012/04.
42. Biomerieux. Vidas Staph Enterotoksin II 12095 F-tr-2010/09.
43. Bone FJ, Bogie D, Morgan-Jones SC. Staphylococcal food poisoning from sheep milk cheese. Epidemiol Infect. 1989; 103(3): 449-458.
44. Buriti FCA, Cardarelli HR, Saad SMI. Biopreservation by *Lactobacillus paracasei* in coculture with *Streptococcus thermophilus* in potentially probiotic and synbiotic fresh cream cheeses. J Food Prot. 2007; 70(1):228-35.
45. Carey RB, Baselski V, Gilligan PH, Gray L, Humes R, Krisner K, Lovchik J, Mangal J, Mangal CN, Shapro DS, Sharp S, Snyder JW, Weissfeld A, Welc D, York MK. Staphylococcal enterotoksin B. Sentinel laboratory guidelines for suspected agents of bioterrorism. American Society for Microbiology, 2004; 1-10.
46. Cengiz AT. *Staphylococcus*. In: Ustaçelebi Ş, editor. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi; 1999. p.339-46.
47. Charlier C, Even S, Gautier M, Le Loir Y. Acidification is not involved in the early inhibition of *Staphylococcus aureus* growth by *Lactococcus lactis* in milk. International Dairy Journal, 2008; 18(2): 197-203.
48. Charlier C, Cretenet M, Even S, Le Loir Y. Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. International Journal of Food Microbiology, 2009; 131(1): 30-9.
49. Chye FY, Abdullah A, Ayob MK. Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. Food Microbiology, 2004; 21(5): 535-41.
50. Cowell NA, Hansen MT, Langley AJ, Graham TM, Bates JR. Outbreak of staphylococcal enterotoxin food poisoning. Communicable Diseases Intelligence Quarterly Report, 2002; 26(4): 574-5.
51. Crass BA, Bergdoll MS. Involvement of coagulase negative *staphylococci* in toxic shock syndrome. J Clin Microbiol. 1986; 23(1): 43-45.
52. Cremonesi P, Vimercati C, Pisoni G, Castiglioni B, Luzzana M, Ruffo G. Identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and caprine milk. Veterinary Research Communications, 2006; 30(1): 241-3.

53. Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penades JR. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 2001; 183(9): 2888-2896.
54. Çoban Ö, Sabuncuoğlu N, Tüzemen N. Effect of various factors on somatic cell counts in brown Swiss and holstein friesian cows. *Lalahan Hay Araştırma Derg.* 2007; 47(1) 15-20.
55. Da Silva ER, do Carmo LS, da Silva N. Detection of the enterotoxin A, B and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. *Veterinary Microbiology*, 2005; 106 (1-2): 103-7.
56. De La Fuente R, Suarez G, Schleifer KH. *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* subsp. nov., the casual agent of abscess disease of sheep. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1985; 35(1): 99-102.
57. Delbes C, Alomar J, Chougui N, Martin JF, Montel MCH. *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production during the manufacture of uncooked, semihard cheese from cows' raw milk. *J Food Prot.* 2006; 69(9): 2161–2167.
58. De Oliveira LP, Barros LS, Silva VC, Cirqueira MG. Study of *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk consumed in the Reconcavo area of the State of Bahia, Brazil. *J Food Process Technol.* 2011; 2(6): 228-39.
59. Demir M, Kaleli İ, Cevahir N, Mete E. Çeşitli klinik örneklerden soyutlanan *Staphylococcus aureus* suşlarında antibiyotik direnci. *Ankem Derg.* 2003; 17(1): 56-9.
60. Derbentli Ş. Stafilocoklarda antibiyotik direnci: 2003-2004 Türkiye haritası, *Ankem Derg.* 2005; 19(Ek 2): 54-60.
61. Devlet Planlama Teşkilatı Müsteşarlığı İktisadi Sektörler ve Koordinasyon Genel Müdürlüğü. Ulusal Gıda ve Beslenme Stratejisi Çalışma Grubu Raporu, Ankara, 2001, 87.
62. Devriese LA, M. Vancanneyt M, Baele M, Vanechoutte M, De Graef E, Snauwaert C, Cleenwerck I, Dawyndt P, Swings J, Decostere A, Haesebrouck F. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase- positive species from animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005; 55(4): 1569-73.
63. Dinges MM, Orwin MP, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*, 2000; 13(1): 16-34.
64. Doğruer Y. Halk Sağlığı. Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, 2004, 41.
65. Domenech A, Hernandez FJ, Orden JA, Goyache J, Lopez B, Suarez G, Gomez-Lucia E. Effect of six organic acids on staphylococcal growth and enterotoxin production. *Z Lebensm Unters Forsch.* 1992; 194(2): 124-8.
66. Doyle MP, Beuchat LR. *Food microbiology: Fundamentals and frontiers*. Washington: American Society for Microbiology Press, 3<sup>rd</sup> edition, 2007. p.1038.
67. Dündar V, Dündar D. Stafilocok infeksiyonları. In: Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M, editors. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. Ankara: Nobel Tıp Kitabevi; 2002. p.1507-17.
68. Ekici L, Telli R, Yetim H. Gıda kaynaklı enfeksiyon ve intoksikasyon bakterileri-1. *Gıda teknolojileri elektronik dergisi.* 2008; 2: 29-42.
69. Ellis M, Serreli A, Colque-Navarro P, Hedstrom U, Chacko A, Siemkowicz E, Möllby R. Role of staphylococcal enterotoxin A in fatal case of endocarditis. *Journal of Medical Microbiology*, 2003; 52(2): 109-12.



- 70.Eman MZ, Marionette ZN, Gihan MOM. Detection of *Staphylococcus aureus* in bovine milk and its product by real time PCR assay. Global Journal of Biotechnology & Biochemistry, 2011; 6(4): 171-7.
- 71.Erol İ, İşeri Ö. Staphylococcal Enterotoksinler. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 2004; 51: 239-45.
- 72.Erol İ, Küplülü Ö, Sırken B, Çelik TH. Ankara'daki çeşitli pastanelere ait dondurmaların mikrobiyolojik kalitelerinin belirlenmesi. Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences, 1998; 22: 345-52.
- 73.Erol İ, Mutluer B, Vatansver L. A tipi enterotoksin oluşturan *Staphylococcus aureus*'un çiğ köftede üreme ve toksin oluşturma yeteneğinin belirlenmesi. Gıda, 1993; 18(5): 315-8.
- 74.Ertaş N, Gönülalan Z. Kayseri ilinde satılan çiğ sütlerde *Staphylococcus aureus* ve enterotoksinlerinin varlığı üzerine araştırmalar. FÜ Sağ Bil Vet Derg. 2010; 24 (1): 11-5.
- 75.Evrensel SS, Güneş E. Bursa'da tüketilen dondurmaların kimyasal ve mikrobiyolojik kalitesi. Gıda, 1998; 23(4): 261-5.
- 76.Evrensel SS, Temelli S, Anar Ş. Mandıra düzeyindeki işletmelerde beyaz peynir üretiminde kritik kontrol noktalarının belirlenmesi. Türk J Vet Anim Sci. 2003; 27: 29-35.
- 77.Eyduran E, Özdemir T, Yazgan K, Keskin S. Siyah-Alaca inek sütündeki somatik hücre sayısına laktasyon sırası ve dönemin etkisi. YYÜ Vet Fak Derg. 2005; 16(1): 61-5.
- 78.Freeman R, Hudson SJ, Burdess D. Crystal violet reactions of fresh clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from British hospitals. Epidemiol Infect. 1990; 105(3): 493-500.
- 79.Freny J, Kloos WE, Hajek V, Webster JA. Recommended minimal standards for description of new staphylococcal species. International Journal of Systematic Bacteriology, 1999; 49(2): 489-502.
- 80.Fukuda S, Tokuno H, Ogawa H, Sasaki M, Kishimoto T, Kawano J, Shimizu A, Kimura S. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus intermedius* strains isolated from dogs. Zentralblatt für Bacteriologie, Microbiologie und Hygiene Series A, 1984; 258(2-3): 360-7.
- 81.Fujikawa H, Moruzumi S. Modeling *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in milk. Food Microbiology, 2006; 23(3): 260-7.
- 82.Gandra EA, Silva JA, de Macedo MRP, de Araujo MR, Mata MM, da Silva WP. Differentiation between *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* using phenotypical tests and PCR. Alim Nutr Araraquara. 2005; 16(2): 99-103.
- 83.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): 3019-26.
- 84.Gilligan K, Shipley M, Stiles B, Hadfield TL, Sofi İbrahim M. Identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A and B genes by PCR-ELISA. Molekuler and Cellular Probes, 2000(2); 14: 71-8.
- 85.Gonzalez-Fandos E, Otero A, Sierra M, Garcia-Lopez ML, Prieto M Effect of three commercial starters on growth of *Staphylococcus aureus* and enterotoxins (A-D) and thermonuclease production in broth. Int J Food Microbiol. 1994; 24(1-2): 321-7.
- 86.Gordon LA. *Staphylococcus aureus*: A Well-Armed Pathogen. Clinical Infectious Diseases, 1998; 26(5): 1179-81.

- 87.Gökmen M, Torlak E, Çiçek S, Akan İM, İnal M. Süt ve bazı süt ürünlerinin üretim aşamalarında stafilokokların izolasyonu, identifikasyonu ve enterotoksin düzeyinin tespiti. Proje No:TAGEM/GY/08/03/01/142, 2009.
- 88.Graille M, Stura EA, Corper AL, Sutton BJ, Taussig MJ, Charbonnier JB., Silverman GJ. Crystal structure of a *Staphylococcus aureus* protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: Structural basis for recognition of B- cell receptors and superantigen activity. PNAS, 2000; 97(10): 5399-5404.
- 89.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(8): 539-44.
- 90.Guzman-Blanco M, Mejia C, Isturiz R, Alvarez C, Bavestrello L, Gotuzzo E, Labarca, Luna CM, Rodríguez-Noriega E, Salles MJC, Zurita J, Seas C. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America. International Journal of Antimicrobial Agents, 2009; 34: 304-8.
- 91.Gülay Z. Antibiyotik duyarlılık testlerinin yorumu. Toraks Dergisi, 2002; 3(1): 75-88.
- 92.Gülbandılar A. Kütahya yöresinde çeşitli kaynaklardan elde edilen *Staphylococcus aureus* izolatlarının karakterizasyonu. Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 2006.
- 93.Gündoğan N, Çıtak S, Turan E. Slime production, DNase activity and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk, pasteurized milk and ice cream samples. Food Control, 2006; 17(5): 389-92.
- 94.Gündoğan N, Çıtak S, Yücel N, Devren A. A note on the incidence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and chicken samples. Meat Science, 2005; 69(4): 807-10.
- 95.Güner A, Ardiç M, Keleş A. Konya'da Pastanelerde Tüketime Sunulan Dondurmaların Mikrobiyolojik Kalitesi. Vet Bil Derg. 2004; 20(2): 59-64.
- 96.Günşen U, Büyükyörük İ. Determination of bacteriological qualities and Aflatoxin M<sub>1</sub> levels of commercially available fresh kashar cheeses. Türk J Vet Anim Sci. 2003; 27(4): 821-5.
- 97.Gürbüz Ü. Mezbaha Bilgisi ve Pratik Et Muayenesi. Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, 2009.
- 98.Güven K, Mutlu MB, Gülbandılar A, Çakır P. Occurrence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products consumed in Turkey. Journal Food Safety, 2010; 30(1):196-212.
- 99.Haines WC, Harmon LG. Effect of variations in conditions of incubation upon inhibition of *Staphylococcus aureus* by *Pediococcus cerevisiae* and *Streptococcus lactis*. Appl. Microbiol, 1973; 25(2): 169-72.
- 100.Hata E, Katsuda K, Kobayashi H, Nishimori K, Uchida I, Higashide M, Ishikawa E, Sasaki T, Eguchi M. Bacteriological characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from humans and bulk milk. Journal of Dairy Science, 2008; 91(2): 564-9.
- 101.Hennekinne JA, Ostyn A, Guillier F, Gohier M, Messio S, Dragacci S, Kryszewski S, Lombard B. Interlaboratory validation of the Vidas SET 2 kit for the detection of staphylococcal enterotoxins in milk. Journal of AOAC International, 2007a; 90(3): 756-64.
- 102.Hennekinne JA, Guillier F, Perelle S, De Buyser ML, Dragacci S, Kryszewski S, Lombard B. Intralaboratory validation according to the EN ISO 16 140 Standard of the Vidas SET2 detection kit for use in official controls of staphylococcal enterotoxins in milk products. Journal of Applied Microbiology, 2007b; 102(5): 1261-72.

- 103.Henriques AF, Jenkins RE, Burton NF, Cooper RA. The intracellular effects of manuka honey on *Staphylococcus aureus*. European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases, 2010; 29(1): 45-50.
- 104.<http://www.biomerieux.com> Vitek-2 Systems Ürün Bilgisi 410825 (09/2010).
- 105.Ibrahim GF, Baldock AK, Radford DR, Ireland LB. Inhibition of *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin-A production in cheddar cheese produced with variable starter activity. J Food Prot. 1981; 44(4): 263-7.
- 106.Ikeda T, Tamate N, Yamaguchi K, Makino S. Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H. Applied and Environmental Microbiology, 2005; 71(5): 2793-5.
- 107.İşeri Ö, Erol İ. Hindi etinden kaynaklanan başlıca bakteriyel enfeksiyon ve intoksikasyonlar. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 2009; 56: 47-54.
- 108.Jablonski LM, Bohach GA. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ, editors. Food microbiology: Fundamentals and Frontiers. Washington: American Society for Microbiology Press; 1997. p.353-75.
- 109.Jablonski LM, Bohach GA. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ, editors. Food microbiology: Fundamentals and Frontiers. Washington: American Society for Microbiology Press; 2001. p.411-34.
- 110.Janstova B, JR, Necidova L, Janstova B, Vorlova L. *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in different types of milk. Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis, 2012; 5, 103-8.
- 111.Jay JM, Loessner MJ, Golden AD. Staphylococcal gastroenteritis. In: Modern Food Microbiology New York: Springer; 7th edition, 2005. p.545-65.
- 112.Jorgensen HJ, Mork T, Caugant DA, Kearns A, Rorvik LM. Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from Norwegian bulk milk. Applied and Environmental Microbiology, 2005a; 71(12): 8352-61.
- 113.Jorgensen HJ, Mork T, Hogasen HR, Rorvik LM. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. Journal of Applied Microbiology, 2005b; 99(1): 158-66.
- 114.Kısa Ö, Albay A, Erol İ, Sırıken B, Esin N, Gün H, Yurteri A. Kremalı pastalardan izole edilen koagulaz (+) stafilokokların enterotoksin oluşturma özelliklerinin Vidas yöntemiyle belirlenmesi. Ankara Üniv Vet Fak. Derg. 1996; 43: 405-11.
- 115.Kıvanç M, Kunduhoğlu B, Ayaz B. Eskişehir’de tüketilen çiğ sütlerin bakteriyolojik kalitesinin halk sağlığı yönünden incelenmesi. Gıda, 1992; 17(5): 327-33.
- 116.Kim SY, Shin S, Koo HC, Youn JH, Paik HD, Park YH. In vitro antimicrobial effect and in vivo preventive and therapeutic effects of partially purified lantibiotic lacticin NK34 against infection by *Staphylococcus* species isolated from bovine mastitis. Journal of Dairy Science, 2010; 93(8): 3610-5.
- 117.Kloos WE. Systematics and the natural history of *staphylococci* 1. Society for Appl. Bacteriol. Symp, 1990; 19: 25-37.
- 118.Knobloch JK, Horstkotte MA, Rohde H, Mack D. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. Medical Microbiology and immunology, 2002; 191(2): 101-6.

- 119.Koç A, Özdemir Z, Armağan G. Aydın'da bazı süt sığırları işletmelerinde üretilen çiğ süt kalitesi ve etkili olan faktörler üzerine bir araştırma. Pamukkale Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu, Denizli, 21–23 Mayıs 2009.
- 120.Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Philadelphia: Lippincott; Fifth edition, 1997. p.539-65.
- 121.Küçüktekin A, Milci S. Food poisonings by cheese contaminated with *Staphylococcus aureus*. Gıda, 2008; 33(3): 129-35.
- 122.Küplülü Ö, Sarımehtemoğlu B, Kaymaz Ş. Pastörize sütlerde ELISA tekniği ile stafilokokal enterotoksin varlığının belirlenmesi. Türk J Vet Anim Sci. 2002; 26: 631-7.
- 123.Kwon NH, Kim SH, Park KT, Bae WK, Kim JY, Lim JY, Ahn JS, Lyoo KS, Kim JM, Jung WK, Noh KM, Bohach GA, Park YH. Application of extended single-reaction multiplex polymerase chain reaction for toxin typing of *Staphylococcus aureus* isolates in South Korea. Int J Food Microbiol. 2004; 97(2): 137-45.
- 124.Lamprell H, Villard L, Chamba JF, Borges E, Beuquier 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 Med Vet. 2004; 155(2): 92-96.
- 125.Letertre 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(1): 38-43.
- 126.Lina G, Bohach GA, Nair SP, Hiramatsu K, Jouvin-Marche E, Mariuua R. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. JID, 2004; 189: 2334-6.
- 127.Livermore DM. Antibiotic resistance in *Staphylococci*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2000; 16: 3-10.
- 128.Le Loir Y, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genetetics and Molecular Research, 2003; 2(1): 63-76.
- 129.Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. Brock Biology of Microorganisms. San Francisco: Pearson/Benjamin Cummings; Twelfth edition, 2009.
- 130.Mead GC, Dodd CER. Incidence, origin and significance of *staphylococci* on processed poultry. Society for Appl Bacteriol Symp. S, 1990; 69(19): 81-91.
- 131.Medvedova A, Valik L, Studenicova A. The effect of temperature and water activity on the growth of *Staphylococcus aureus*. Czech J Food Sci. 2009a; 27(2): 2-35.
- 132.Medveova A, Valik L, Sirotna Z, Liptakova D. Growth characterisation of *Staphylococcus aureus* in milk: a Quantitative approach, Czech J Food Sci. 2009b; 27(6): 443–53.
- 133.Milci S, Yaygın H. Peynirlerden kaynaklanan *Staphylococcus aureus* zehirlenmesi. Türkiye 9. Gıda Kongresi, 2006; 297-8.
- 134.Muratoğlu K. Gıdalardan izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının toksijenik özellikleri ve antibiyotiklere duyarlılıkları üzerine bir araştırma.İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, 2010.
- 135.Mutluer B, Erol İ, Kaymaz Ş, Akgün S. Enterotoksijenik *Staphylococcus aureus* suşlarının beyaz peynirde üretim ve olgunlaşma sırasındaki üreme ve enterotoksin oluşturma yetenekleri. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 1993; 40(3): 413-26.

136. 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(1-2): 66-72.
137. Moroney SM, Heller LC, Arbuckle J, Talavera M, Widen RH. Staphylococcal cassette chromosome mec and Panton-Valentine Leukocidin characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* clones. *J Clin Microbiol*. 2007; 45(3): 1019-21.
138. Mossel DA, van Netten P. *Staphylococcus aureus* and related *staphylococci* in foods: Ecology, proliferation, toxigenesis, control and monitoring. *Society for Appl Bacteriol Symp S*. 1990; 19: 123-145.
139. Mukan M, Evliya B. Adana piyasasında tüketime sunulan sade-kaymaklı dondurmalarının mikrobiyolojik kalitelerinin tüketici sağlığı açısından değerlendirilmesi. *Gıda*, 2002; 27(6): 489-96.
140. Namıduru M, Karaoğlan İ. Cerrahi yoğun bakım ünitesinde hastane infeksiyonu etkeni olan *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotik dirençleri. *Van Tıp Dergisi*, 2003; 10(3): 72-5.
141. Normanno G, Firinu A, Virgillio S, Mula G, Dambrosio A, Poggiu A, Decastelli L, Mioni R, Scuota S, Bolzoni G, Di Giannatale E, Salinetti AP, La Salandra G, Bartoli M, Zuccon F, Pirino T, Sias S, Parisi A, Quaglia NC, Celano GV. Coagulase-positive *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *Int J Food Microbiol*. 2005; 98(1): 73-9.
142. Oliver SP, Jayaro BM, Almedia Research A. Foodborne pathogenes mastitis milk quality and dairy food safety. *NMC Annual Meeting Proceedings*, 2005; 1-26.
143. Omoe K, Hu DL, Takahashi-Omeo H, Nakane A, Shinagawa K. Identification and charecterization of a new staphylococcal enterotoxin- related putative toksin encoded by two kinds of plasmids. *Infec Immun*. 2003; 71(10): 6088-94.
144. Omoe K, Imanishi K, Hu DL, Kato H, Takahashi-Omeo H, Nakane A, Uchiyama T, Shinagawa K. Biological properties of Staphylococcal enterotoxin-like toxin type R. *Infec Immun*. 2004; 72(6): 3664-7.
145. Omoe K, Ishikawa M, Shimoda Y, Hu DL, Ueda S, Shinagawa K. Detection of *seg*, *seh* and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolated and determination of the enterotoxin productivities of *Staphylococcus aureus* isolates harboring *seg*, *seh* or *sei* genes. *J Clin Microbiol*. 2002; 40(3): 857-62.
146. Orwin PM, Fitzgerald JR., Leung DYM, Gutierrez JA, Bohach GA, Schlievert PM. Characterization of *Staphylococcus aureus* enterotoxin L. *Infec Immun*. 2003; 71(5): 2916-9.
147. Önal AR, Özder M. Trakya'da Özel Bir Süt İşleme Tesisi Tarafından Değerlendirilen Çiğ Sütlerin Somatik Hücre Sayısı ve Bazı Bileşenlerinin Tespiti. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2007; 4(2): 195-9.
148. Öncül AB. Toplumda ve hastanede edinilmiş nazal stafilokok taşıyıcılığında risk faktörleri ve direnç durumlarının karşılaştırılması. Şişli Etfal Eğitim ve Araştırması Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği-Uzmanlık Tezi, 2006; 68.
149. Önganer AN, Kırbağ S. Diyarbakır'da taze olarak tüketilen çökelek peynirlerinin mikrobiyolojik kalitesi. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2009; 25(1-2): 24-33.
150. Özcan T, Kurdal E. Bursa İli merkezinde satılan meyveli dondurmaların kimyasal ve mikrobiyolojik nitelikleri üzerine araştırma. *Gıda*, 1997; 22(3): 217-25.
151. Özkütük A, Özdemir S, Ergon C, Yuluğ N. Askeri personelde metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* burun taşıyıcılığı prevalansı. *Turkish Journal of Infection*, 2003; 17(3): 285-7.

152. Patır B, Can ÖP, Gürses M. Farklı illerden toplanan çiğ inek sütlerinde somatik hücre sayıları. FÜ Sağ Bil Vet Derg. 2010; 24(2): 87-91.
153. Paulin S, Horn B, Hudson JA. Factors influencing staphylococcal enterotoxin production in dairy products. Publications Logistics Officer Ministry for Primary Industries Wellington 2012/07.
154. Pezzlo M. Identification of commonly isolated aerobic gram positive bacteria. In: Igenberg HD editor. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington: American Society for Microbiology Press; 1st edition, 1992. p.1.20.1-1.20.12.
155. Pottumarthy S, Schapiro JM, Prentice JL, Houze YB, Swanzy SR, Fang FC, Cookson BT. Clinical isolates of *Staphylococcus intermedius* masquerading as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2004; 42(12): 5881-4.
156. Rall VLM, Vieira FP, Rall R, Vieitis RL, Fernandes Jr A, Candeias JMG, Cardoso KFG, Araujo Jr JP. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. Veterinary Microbiology, 2008; 132: 408-13.
157. Rahimi E, Mommtaz H, Shakerian A, Kavyani HR. The detection of classical enterotoxins of *Staphylococcus aureus* in raw cow milk using the ELISA method. Turk J Vet Anim Sci. 2012; 36(3): 319-22.
158. Rilla N, Martinez B, Rodriguez A. Inhibition of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain in Afuega'l Pitu cheese by the nisin Z-producing strain *Lactococcus lactis subsp lactis IPLA 729*. J Food Prot. 2004; 67(5):928-33.
159. Rooijackers SHM, Van Wamel WJB, Ruyken M, Van Kessel KPM, Van Strijp JAG. Anti-opsonic properties of staphylokinase. Microbes and Infection, 2005; 7: 476-84.
160. Rosec JP, Guiraud JP, Dalet C, Richard N. Enterotoxin production by *staphylococci* isolated from foods in France. Int J Food Microbiol. 1997; 35(3): 213-21.
161. Ross TL, Merz WG, Farkosh M, Carroll KC. Comparison of an Automated Repetitive Sequence-Based PCR Microbial Typing System to Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Analysis of Outbreaks of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2005; 43(11):5642-5647.
162. Sandel MK, Mc Killip JL. Virulence and recovery of *Staphylococcus aureus* relevant to the food industry using improvements on traditional approaches. Food Control, 2004; 15(1): 5-10.
163. Santos EC, Genigeorgis C, Farver TB. Prevalence of *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk used for commercial manufacturing of Brazilian Minas cheese. J Food Prot. 1981; 44(3): 172-6.
164. Sawant AA, Gillespie BE, Oliver SP. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk. Veterinary Microbiology, 2009; 134(1-2): 73-81.
165. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. Foodborne illness acquired in the United States-Major pathogens. Emerging Infectious Diseases; 2011; 17(1): 7-15.
166. Schlievert PM, Tripp TJ, Peterson ML. Reemergence of staphylococcal toxic shock syndrome in Minneapolis-St. Paul, Minnesota, during the 2000-2003 surveillance period. J Clin Microbiol. 2004; 42(6): 2875-6.
167. Schleifer KH, Kroppenstedt RM. Chemical and molecular classification of *staphylococci*. Society for Appl Bacteriol Symp S. 1990; 69(19): 9-24.

- 168.Seçim Y, Uçar G. Konya il merkezinde tüketime sunulan ve deneysel olarak üretilen bazı sütlü tatlıların kimyasal ve mikrobiyolojik kalitesi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2011.
- 169.Seo S, Bohach GA. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle MP, Beuchat LR editors. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. Washington: American Society for Microbiology Press; 3<sup>rd</sup> edition, 2007. p.493-518.
- 170.Sharma NK, Rees CED, Dodd CER. Development of a single-reaction multiplex PCR toxin typing assay for *Staphylococcus aureus* strains. Applied and Environmental Microbiology, 2000; 66(4): 1347-53.
- 171.Sheldrake RF, Hoare RJT, Hutchinson JAE. Post-milking iodine teat skin disinfectants:1. Bactericidal efficacy. Journal of Dairy Research, 1980; 47(1): 19-26.
- 172.Shutt CK, Pounder JI, Page SR, Schaecher BJ, Woods GL. Clinical evaluation of the DiversiLab microbial typing system using repetitive-sequence-based PCR for characterization of *Staphylococcus aureus* strains. J Clin Microbiol. 2005; 43(3):1187-92.
- 173.Sipahi OR, Pullukçu H, Aydemir Ş, Taşbakan M, Tunger A, Arda B, Yamazhan T, Ulusoy S. Mikrobiyolojik kanıtlı hastane kökenli *Staphylococcus aureus* bakteremilerinde direnç paternleri: 2001-2005 yıllarının değerlendirilmesi. Ankem Derg. 2007; 21(1): 1-4.
- 174.Soriano JM, Font G, Molto JC, Manes J. Enterotoxigenic *staphylococci* and their toxins in restaurant foods. Trends in Food Science & Technology, 2002; 13(2): 60-7.
- 175.Stevens DL, Ma Y, Salmi DB, McIndoo E, Wallace RJ, Bryant AE. Impact of antibiotics on expression of virulence-associated exotoxin genes in methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. JID, 2007; 195(2): 202-211.
- 176.Stewart CM, Cole MB, Schaffner DW. Managing the risk of staphylococcal food poisoning from cream-filled baked goods to meet a food safety objective. J Food Prot. 2003; 66(7): 1310-25.
- 177.Stewart CM. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. In: Foodborne Microorganisms of Public Health Significance. Hocking AD editor. Australian Institute of Food Science and Technology, Waterloo: New South Wales Branch, 6<sup>th</sup> edition, 2003. p.359-79.
- 178.Sutherland J, Varnam A. Enterotoxin-producing *Staphylococcus*, *Shigella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In: CW Blackburn, PJ McClure, editors. Foodborne Pathogens: Hazards, Risk Analysis and Control. Washington: CRC press; 2002. p.384-415.
- 179.Şardan YÇ. Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* infeksiyonlarının epidemiyolojisi ve kontrolü. Hastane İnfeksiyon Dergisi, 2000; 4: 205-207.
- 180.Takagi Y, Futamura S, Asada Y. Action site of exfoliative toxin on keratinocytes. Journal of Investigative Dermatology, 1990; 94: 582.
- 181.Takashi S, Sae T, Yoshikazu T, Arihito S, Masayuki O, Shintaro H, Tetsuji K, Tsuneo F, Keiichi H. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive *staphylococci*. J Clin Microbiol. 2010; 48(3): 765-9.
- 182.Tanır G, Göl N. Antibiyotik direnci. Klimik Dergisi, 1999; 12(2): 47-54.
- 183.Tekinşen OC, Tekinşen KK. Süt ve Süt Ürünleri Temel Bilgiler Teknoloji Kalite Kontrolü. Konya, Selçuk Üniversitesi Basımevi, 2005; 30-1.
- 184.Temelli S, Şerbetçioğlu T. Bir süt işletmesinde işlenen inek sütlerinde somatik hücre sayısının dört yıllık periyottaki değişiminin incelenmesi. Uludag Univ J Fac Vet Med. 2011; 301: 1-7.

- 185.Toklu GŞ, Yaygın H. Antalya piyasasında satılan dondurmaların hijyenik kalitesi. İn: Demirci M. editor. Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri. VI. Süt ve süt ürünleri sempozyumu. Tebliğler Kitabı. Tekirdağ: 2000, 532-39.
- 186.Tomi NS, Kranke B, Aberer E. Staphylococcal toxins in patients with psoriasis, atopic dermatitis, and erythroderma, and in healthy control subjects. Journal of the American Academy of Dermatology, 2005; 53(1): 67-72.
- 187.Tompkin RB, Ambrosino JM, Stozek SK. Effect of pH, sodium chloride and sodium nitrate on enterotoxin A production. Appl Microbiol. 1973; 26(6): 833-7.
- 188.Tondo EC, Guimaraes, MCM, Henriques JAP, Ayub MAZ. Assessing and analysing contamination of a dairy products processing plant by *Staphylococcus aureus* using antibiotic resistance and PFGE. Canadian Journal of Microbiology, 2000; 46(12): 1108-14.
- 189.Topaloğlu N, Güneş H. İngiltere'de yetiştirilen Siyah-Alaca sığırların süt verimi özellikleri üzerinde araştırmalar. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2005; 31(1): 99-119.
- 190.Tremaine MT, Brockman DK, Betley MJ Staphylococcal enterotoxin A gene (sea) expression is not affected by the accessory gene regulator (agr). Infec Immun. 1993; 61(1):356-359.
- 191.Tsai W, Li I. SPR-based immunosensor for determining staphylococcal enterotoxin A. Sensors and Actuators B: Chemical, 2009; 136(1): 8-12.
- 192.Tunail N. Mikrobiyal enfeksiyonlar ve intoksikasyonlar-Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Sim Matbaacılık, Ankara, 2000; 82-88.
- 193.Tükel Ç, Doğan HB. Gıda mikrobiyolojisi ve uygulamaları. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara: Sim Matbaacılık Ltd.Şti. Genişletilmiş 2. Baskı, 2000; 14: 522.
- 194.Tünger A. *Staphylococcus aureus*: Mikrobiyoloji, Patogenez ve Epidemiyoloji. İn: Önemli ve Sorunlu Gram-Pozitif Bakteri enfeksiyonları. ed: Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2006; 9-38.
- 195.Umoh VJ, Adesiyun AA, Comwalk NE. Enterotoxigenicity of *staphylococci* isolated from raw milk obtained from settled and nomadic herds around Zaria, Nigeria. Rev Elev Med Vet Pays Trop. 1990; 43(1): 43-7.
- 196.Usca A, Erol İ. Hellim peynirinin mikrobiyolojik kalitesi. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 1998; 45: 97-103.
- 197.Uyar MF, Tengilimoğlu MM. *Staphylococcus Aureus* in Food Poisoning. Beslenme ve Diyet Dergisi, 2012; 40(1): 96-103.
- 198.Ünal N. Subklinik mastitisli inek sütlerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* izolatlarında bazı toksin genleri ve metisilin direnç geninin araştırılması. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 2013; 60: 21-6.
- 199.Qi Y, Miller KJ. Effect of low water activity on staphylococcal enterotoxin A and B biosynthesis. J Food Prot. 2000; 63(4): 473-8.
- 200.Waldvogel FA: *Staphylococcus aureus*. İn: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Mandell, Douglas and Bennet's Principles and Practice of Infectious Diseases. Philadelphia: Churchill Livingstone, 5th edition, 2000. p.2069-89.
- 201.Wisell KT. Regulation of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. Karolinska University Press, Stockholm/Sweden, 2000. p.59



- 202.Valero A, Perez-Rodriguez F, Carrasco E, Fuentes-Alventosa J M, Garcia-Gimeno RM, Zurera G. Modelling the growth boundaries of *Staphylococcus aureus*: Effect of temperature, pH and water activity. Int J Food Microbiol. 2009; 133(1-2): 186-94.
- 203.Vasconcelos NG, de Souza da Cunha MLR. Staphylococcal enterotoxins: Molecular aspects and detection methods. J Public Health Epidemiol. 2010; 2(3): 29-42.
- 204.Vernozy-Rozand C, Mazuy-Cruchaudet C, Bavai C, Richard Y. Comparison of three immunological methods for detecting staphylococcal enterotoxins from food. Letters in Appl Microbiol. 2004; 39(6): 490-4.
- 205.Von Specht M, Gardella N, Tagliaferri P, Gutkind G, and Mollerach M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in community-acquired meningitis. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2006, 25(4): 267-9.
- 206.Yalçın C. Türkiye'nin Avrupa Birliği'ne Entegrasyon Sürecinde Süt Hijyen Kriterleri ve Önemi. Veteriner Hekimler Derneği Dergisi, 2005; 76 (3-4): 17-21.
- 207.Yılmaz S, Gönülalan Z. Kayseri bölgesinde tüketime sunulan çiğ sütlerde *Staphylococcus aureus* ve enterotoksin varlığının araştırılması. Sağlık Bilimleri Dergisi, 2010; 19(1): 26-33.
- 208.Yüce A. Antibiyotik ilaçlara direnç kazanma mekanizmaları. Klimik Dergisi, 2001; 14(2): 41-6.
- 209.Yücel N, Çıtak S. Dondurma örneklerinde bazı mikroorganizmaların varlığı üzerine bir araştırma. Türk Hij Den Biyol Derg. 2000; 57(3): 165-70.
- 210.Yücel N, Anıl Y. Çiğ süt ve peynir örneklerinden *Staphylococcus aureus* ve koagulaz negatif stafilocokların identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılığı. Türk Hij Den Biyol Derg. 2011; 68 (2): 73-8.
- 211.Yücel AE, Yücel A. Superantigens. Türkiye Klinikleri J Med Sci. 1996; 16: 1-7.
- 212.Zakary EM, Nassif MZ, Mohammed GMO. Detection of *Staphylococcus aureus* in bovine milk and its product by Real Time PCR Assay. Global J Biotech & Biochem. 2011; 6 (4):171-177.

## 9. EKLER

### Ek-A Etik Kurul Kararı



T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
VETERİNER FAKÜLTESİ  
ETİK KURUL (SÜVFEK) KARARLARI



Toplantı Tarihi	07.11.2012	Toplantı Sayısı	2012/14	Karar Sayısı	2012/074
<p>Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi ABD Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mustafa NİZAMLIOĞLU tarafından sunulan “Farklı Sürelerde Farklı Sıcaklıklarda Muhafaza Edilen Çiğ Sütlerde Koagülaz Pozitif Staphylococcus Türlerinin Dağılımı ve Staphylococcal Enterotoksin Oluşumu” isimli tez projesi değerlendirilmiştir.</p> <p>Projede, Konya’da faaliyet gösteren üç farklı üretim işletmesinden süt örneklerinin alınacağı, süt örneklerinde kimyasal ve mikrobiyolojik analizlerin yapılacağı bildirilmektedir.</p> <p>Başvuruda, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurul Yönergesi ilkelerine uyulduğuna, projenin araştırma etiği açısından “Uygun olduğuna” oy birliği ile karar verilmiştir.</p>					
RAPORLU					
Prof. Dr. Mehmet MADEN Başkan		Doç. Dr. Uğur USLU Başkan Yardımcısı			
Prof. Dr. Sadettin TİPİRDAMAZ Üye		Prof. Dr. Mustafa ACAROĞLU Konya Doğayı ve Hayvanları Koruma Derneği Üyesi			
	İZİNLI				
Prof. Dr. Fatma İNAL Raportör Üye	Doç. Dr. Yasemin ÖZNURLU Üye		Hüseyin AYDIN Sivil Üye		

## 10. ÖZGEÇMİŞ

1970 yılında Konya'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Konya'da tamamladı. 1994 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden mezun oldu. Askerlik görevini 1996 yılında tamamladı. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'na bağlı olarak Kars/Sarıkamış İlçe Tarım Müdürlüğünde veteriner hekim olarak görev yaptı. Halen Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Konya Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü Mikrobiyoloji Biriminde veteriner hekim olarak çalışmaktadır. Evli ve iki çocuk babasıdır.