



T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



## DOKTORA TEZİ

TÜKETİM AMACIYLA PİYASADA BULUNAN ÇİĞ VE PASTÖRİZE  
SÜTLERDE ENTEROTOKSİJENİK STAPHYLOCOCCUS AUREUS VE  
ENTEROTOKSİNLERİNİN ARAŞTIRILMASI

RECEP GEÇKİNLİ

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Seyyal AK

Anabilim Dalı Adı  
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Program Adı  
VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ PROGRAMI

Mart, 2022

## TEZ KABUL VE ONAYI

**Recep GEÇKİNLİ** tarafından, **Prof. Dr. Seyyal AK** danışmanlığında hazırlanan "Tüketim amacıyla piyasada bulunan çiğ ve pastörize sütlerde enterotoksijenik *Staphylococcus aureus* ve enterotoksinlerinin araştırılması" başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından **07/03/2022** tarihinde yapılan sınav sonucunda **oy birliği** ile başarılı bulunarak **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

### Tez Jürisi

	İmza	Sonuç
<b>DANIŞMAN</b>	Prof. Dr. Seyyal AK	<input checked="" type="checkbox"/>
	İ.Ü. Cerrahpaşa	Kabul
	Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	<input type="checkbox"/> Ret
<b>ÜYE</b>	Prof. Dr. Serkan İKİZ	<input checked="" type="checkbox"/>
	İ.Ü. Cerrahpaşa	Kabul
	Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	<input type="checkbox"/> Ret
<b>ÜYE</b>	Doç. Dr. Serkan Kemal	
	BÜYÜKÜNAL	<input checked="" type="checkbox"/>
	İ.Ü. Cerrahpaşa	Kabul
	Besin Hijyeni ve Teknolojisi	<input type="checkbox"/> Ret
	Anabilim Dalı	
<b>ÜYE</b>	Prof. Dr. Ayşin ŞEN	<input checked="" type="checkbox"/>
	Uludağ Üniversitesi	Kabul
	Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	<input type="checkbox"/> Ret
<b>ÜYE</b>	Prof. Dr. Mihriban ÜLGEN	<input checked="" type="checkbox"/>
	Uludağ Üniversitesi	Kabul
	Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	<input type="checkbox"/> Ret

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve bilimsel etik kuralları içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve her türlü hukuki sorumluluğu aldığımı kabul ederim.

Recep GEÇKİNLİ

(İmza)

Bu tez çalışmamı yakın zamanda kaybettiğim ablam Zeynep GEÇKİNLİ'ye ithaf ediyorum...

## **BÜTÇE DESTEKLERİ**

### **TÜKETİM AMACIYLA PİYASADA BULUNAN ÇİĞ VE PASTÖRİZE SÜTLERDE ENTEROTOKSİJENİK STAPHYLOCOCCUS AUREUS VE ENTEROTOKSİNLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon

Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 27343

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bilgi ve önerileriyle bana yol gösteren, desteğini esirgemeyen, motive eden çok değerli danışmanım, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Seyyal AK'a teşekkür ederim.

Doktora eğitimim süresince değerli bilgi ve önerileriyle yardımcı olan Mikrobiyoloji Anabilim dalı hocalarım Prof. Dr. Arzu Funda BAĞCIGİL, Prof. Dr. Serkan İKİZ, Doç. Dr. Kemal METİNER, Doç. Dr. Beren BAŞARAN KAHRAMAN, Doç. Dr. Belgi DİREN SİĞİRCİ'ya tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen, Dr. Baran ÇELİK, Araş. Gör. Barış HALAÇ, Araş. Gör. A. Iğın KEKEÇ ve teknisyenimiz Gülten KARAKUZ'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım için bana gerekli kolaylığı sağlayan Tarım ve Orman Bakanlığı İstanbul Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürü Dr. Yunus BAYRAK ve Müdür Yardımcısı Hüseyin Orhan KARAMAN'a, çalışmalarım esnasında destek, yardım ve önerileri için Moleküler Biyoloji Laboratuvar şefim Ferruh TOMBUL'a, çalışma arkadaşlarım Dr. Serkan EROL, Ethem KARAYILAN, Abbas KIRMIZIBAYRAK, Metin YILDIRIM, Aslıhan DEMİR ve İlyas KELEK'e, ve her zaman yanımda olduğumu hissettiren aileme en samimi duygularıyla şükranlarımı sunarım.

Mart 2022

**Recep GEÇKİNLİ**

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI.....	ii
BEYAN .....	iii
BÜTÇE DESTEKLERİ .....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLO LİSTESİ.....	xi
RESİMLER.....	xii
SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ .....	xiii
ÖZET .....	xv
ABSTRACT .....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE .....	3
2.1. Süt.....	3
2.1.1. Sütün Bileşimi ve Özellikleri .....	3
2.2. Stafilokoklar .....	6
2.2.1.Tarihçe .....	6
2.2.2. Sınıflandırma .....	7
2.2.3. Morfolojik ve Biyokimyasal Nitelikleri .....	7
2.2.4. Virülens ve Patojenite Faktörleri .....	9
2.2.4.1. Hücre Duvarı.....	9
2.2.4.2. Kapsül .....	10
2.2.4.3. Yüzey Proteinleri .....	10
2.2.4.4. Glikokaliks (Slime Factor).....	10
2.2.4.5. Enzimler .....	11
2.2.4.5.1. Katalaz .....	11
2.2.4.5.2. Koagulaz .....	11
2.2.4.5.3. Deoksiribonükleaz (DNaz) .....	12
2.2.4.5.4. Lesitinaz (Fosfolipaz C).....	12
2.2.4.5.5. Lipaz .....	13
2.2.4.5.6. Hyaluronidaz.....	13

2.2.4.5.7. Stafilokinaz (Fibrinolizin).....	13
2.2.4.5.8. Beta laktamaz (Penisilinaz).....	14
2.2.4.5.9. Termonukleaz (TNaz).....	14
2.2.4.6. Toksinler .....	14
2.2.4.6.1. Sitolitik Toksinler .....	15
2.2.4.6.1.1. Hemolizinler .....	15
2.2.4.6.1.1.1. Alfa Hemolizin (Alfa Toksin).....	15
2.2.4.6.1.1.2. Beta Hemolizin (Beta Toksin) .....	15
2.2.4.6.1.1.3. Gama Hemolizin (Gama Toksin).....	16
2.2.4.6.1.1.4. Delta Hemolizin (Delta Toksin) .....	16
2.2.4.6.1.2. Lökosidin (Panton-Valentine Lökosidin) .....	16
2.2.4.6.2. Süperantijenler .....	17
2.2.4.6.2.1. Eksfoliyatif Toksin .....	18
2.2.4.6.2.2. Toksik Şok Sendromu Toksini (TSST-1).....	19
2.2.4.6.2.3. Enterotoksinler.....	19
2.2.4.6.2.3.1. Stafilokokal Enterotoksin A (SEA) .....	23
2.2.4.6.2.3.2. Stafilokokal Enterotoksin B (SEB).....	23
2.2.4.6.2.3.3. Stafilokokal Enterotoksin C (SEC).....	24
2.2.4.6.2.3.4. Stafilokokal Enterotoksin D (SED) .....	24
2.2.4.6.2.3.5. Stafilokokal Enterotoksin E (SEE) .....	25
2.3. Patogenez .....	25
2.4. Stafilokokal Enterotoksinlerin Saptanması.....	26
2.5. <i>S. aureus</i> 'un Süt ve Süt Ürünlerindeki Varlığı.....	27
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>30</b>
3.1. Gereç.....	30
3.1.1. Örnekler.....	30
3.1.2. Besiyerleri.....	39
3.1.2.1. Baird Parker Agar (BPA, Oxoid, CM0961)-Egg Yolk Tellürit Emülsiyon (Oxoid, SR0054) .....	39
3.1.2.2. Mannitol Salt Agar (Oxoid, CM0085) .....	39
3.1.2.3. DNase Agar (Oxoid, CM0321) .....	39
3.1.2.4. Tryptone Soy Agar (TSA, Oxoid, CM0131).....	39
3.1.2.5. Tryptone Soy Broth (TSB, Oxoid, CM0129).....	39
3.1.2.6. Brain Heart Infusion Broth (BHIB, Oxoid, CM0225) .....	40
3.1.3. Kimyasal Maddeler ve Solüsyonlar.....	40

3.1.4.	Lateks Aglutinasyon Test Kiti.....	40
3.1.5.	ELISA Kit.....	40
3.1.6.	Real-time PCR.....	41
3.1.6.1.	Ekstraksiyon .....	41
3.1.6.2.	Forward ve Revers Primerler .....	41
3.1.6.3.	Real-time PCR Kit.....	42
3.1.7.	Standart Suşlar.....	43
3.1.8.	Kullanılan Diğer Gereçler .....	43
3.2.	Yöntem .....	44
3.2.1.	Süt Örneklerinden <i>S. aureus</i> izolasyonu .....	44
3.2.2.	ELISA (Ezyme Linked Immunosorbent Assay).....	44
3.2.2.1.	Protein Yapısındaki Toksinlerin ELISA Tekniği ile Belirlenmesi.....	44
3.2.2.2.	Cut-Off Değerinin Hesaplanması .....	45
3.2.3.	Real-Time PCR .....	45
3.2.3.1.	Genomik DNA Ekstraksiyonu.....	45
3.2.3.2.	DNA Amplifikasyonu .....	46
3.2.3.2.1.	Real-Time PCR Karışımının Hazırlanması .....	46
<b>4.</b>	<b>BULGULAR .....</b>	<b>48</b>
4.1.	İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları.....	48
4.2.	ELISA SEA-SEE Enterotoksin sonuçları.....	50
4.3.	Real-time PCR sonuçları / <i>sea-see</i> Enterotoksinlerinin Sentezinden Sorumlu Genlerin Varlığının saptanması .....	50
<b>5.</b>	<b>TARTIŞMA .....</b>	<b>57</b>
<b>6.</b>	<b>SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>63</b>
<b>7.</b>	<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>64</b>
	<b>İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI .....</b>	<b>78</b>
	<b>ETİK KURUL İZİN YAZISI .....</b>	<b>79</b>
	<b>KURUM İZİNİ YAZILARI.....</b>	<b>80</b>
	<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>81</b>

## ŞEKİLLER

Şekil 2.1 İnek sütünün bileşimi (Üçüncü, 2005) .....	5
Şekil 3.1.Ridascreen Set (ABCDE) Test Kiti Mikro Pleyt .....	40
Şekil 4.1. SEA pozitif numunenin Real-Time PCR analiz sonucu (180 Numaralı Örnek).....	53
Şekil 4.2. SEB pozitif numunenin Real-Time PCR analiz sonucu (108 Numaralı Örnek).....	53
<b>Şekil 4.3.</b> SEC pozitif numunenin Real-Time PCR analiz sonucu (126 Numaralı Örnek).....	54
Şekil 4.4. SED pozitif numunenin Real-Time PCR analiz sonucu (197 Numaralı Örnek).....	54
Şekil 4.5. SEE pozitif numunenin Real-Time PCR analiz sonucu (126 Numaralı Örnek) .....	55



## TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. <i>S. aureus</i> 'un gelişimi ve toksin üretmesi için gerekli olan genel parametreler (Erol & İşeri, 2004).....	8
Tablo 2.2. Stafilokokal enterotoksinlerin genetik yapısı ile emetik ve süperantijenik aktiviteleri (Fisher ve ark. 2018) .....	22
Tablo 2.3. Stafilokokal enterotoksinlerin saptanmasında kullanılan test kitleri (Erol, 2007) ..	26
Tablo 3.1. Süt örneklerinin ilçelere göre dağılımları.....	30
Tablo 3.2. Süt örneklerinin hayvan türlerine göre dağılımları .....	31
Tablo 3.3. Çiğ süt örneklerinin kaynağı, numunenin alındığı tarih, numunenin alındığı yer, ambalaj durumu ve sütün menşei .....	31
Tablo 3.4. Pastörize süt örneklerinin kaynağı, numunenin alındığı tarih, numunenin alındığı yer, ambalaj durumu ve sütün menşei .....	35
Tablo 3.5. Roche MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit İçeriği .....	41
Tablo 3.6. Çalışmada kullanılan primerlerin gen dizilimleri ve ampikon büyüklükleri .....	42
Tablo 3.7. Çalışmada kullanılan cihazlar ve ekipmanlar.....	43
Tablo 3.8. Real-Time PCR Karışımı Bileşimi.....	46
Tablo 3.9. Real-Time PCR Koşulları .....	47
Tablo 4.1. <i>Staphylococcus</i> spp., Koagülaz pozitif stafilokok ve <i>S. aureus</i> izolatlarının süt tipine göre dağılımları .....	50
Tablo 4.2. Saptanan enterotoksin tipleri.....	50
Tablo 4.3. Saptanan enterotoksin gen bölgeleri .....	51
Tablo 4.4. Enterotoksijenik gen bölgeleri ve stafilokokal enterotoksinlerin süt tipine göre dağılımları.....	52
Tablo 4.5. <i>S. aureus</i> izolatlarında Real-Time PCR ile saptanan enterotoksijenik gen bölgeleri ve ELISA sonuçlarına göre sütlerde saptanan enterotoksin tiplerinin karşılaştırılması .....	55

## RESİMLER

Resim 3.1. DNA Ekstraksiyon Cihazı (Magna Pure 96, Roche, Germany).....	46
Resim 3.2. Real-Time PCR Cihazı (Light Cycler 480 II, Roche, Germany) .....	47
Resim 4.1. <i>S. aureus</i> şüpheli kolonilerin Baird Parker Agar'daki görünümü .....	48
Resim 4.2. <i>S. aureus</i> şüpheli kolonilerin mikroskopik görünümü (x100 büyütmede ışık mikroskopunda görüntülendi).....	48
Resim 4.3. Tüp kogülaz testi pozitif reaksiyon görünümü.....	49
Resim 4.4. Lateks aglütinasyon testi görünümü.....	49



## SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ

Semboller/Kısaltmalar	Açıklama
agr	: accessory gene regülatör
ATCC	: American Type Culture Collection
aw	: su aktivitesi
BHIB	: Brain Heart Infusion Broth
bp	: base pair (baz çifti)
BPA	: Baird Parker Agar
CF	: Clumping Factor
CRF	: Coagulase Reacting Factor
CTAB	: Cetyltrimethylammonium Bromide
Da	: Dalton
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNaz	: Deoksiribonükleaz
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
<i>egc</i>	: enterotoxin gene cluster
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ET	: Eksfoliyatif Toksin
EYT	: Egg Yolk Tellurite
g	: gram
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen Peroksit
HCl	: Hidroklorik Asit
kDA	: Kilo Dalton
kob	: koloni oluşturan birim
MGE	: Mobil Genetik Element
ml	: mililitre
µl	: mikrolitre
µm	: mikrometre
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NCBI	: National Center for Biotechnology Information

ng	: nanogram
nm	: nanometre
OD	: Optik Dansite
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PVL	: Panton Valentin Lökosidin
RIA	: Radio Immuno Assay
RNA	: Ribonükleik asit
RNaz	: Ribonükleaz
RPLA	: Reverse Passive Latex Agglutination
rpm	: revolutions per minute (dakikadaki devir sayısı)
RT	: Real-Time
SE	: Stafilokokal Enterotoksin
SaPI	: <i>Staphylococcus aureus</i> Pathogenicity Islands
SEI	: Staphylococcal Enterotoxin Like Toxin
SSSS	: Staphylococcal Scalded Skin Syndrome
TNaz	: Termonükleaz
TSA	: Tryptic Soy Agar
TSE	: Türk Standartları Enstitüsü
TSST	: Toxic Shock Syndrome Toxin
WHO	: World Health Organization

## ÖZET

### [DOKTORA TEZİ]

#### [TÜKETİM AMACIYLA PİYASADA BULUNAN ÇİĞ VE PASTÖRİZE SÜTLERDE ENTEROTOKSİJENİK STAPHYLOCOCCUS AUREUS VE ENTEROTOKSİNLERİNİN ARAŞTIRILMASI ]

[Recep GEÇKİNLİ]

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Mikrobiyoloji Programı

[Danışman : Prof. Dr. Seyyal AK ]

Bu çalışmada, İstanbul ili ve çevresinde tüketime sunulmuş olan çiğ ve pastörize sütlerdeki enterotoksijenik *Staphylococcus aureus* varlığı, ELISA ile tüm sütlerde oluşmuş enterotoksinlerin ve Real-Time PCR ile de stafilokokal enterotoksin genlerinin belirlenmesi amaçlandı. Toplanan 100 çiğ ve 100 pastörize (n=200) süt örneği Egg Yolk Tellurite içeren Baird Parker agara ekildi. Çiğ süt örneklerinin %98'inde *Staphylococcus* spp. ve %48'inde *S. aureus* şüpheli koloniler üredi. Pastörize süt örneklerinin 6'sında *Staphylococcus* spp. ve 1'inde *S. aureus* şüpheli koloniler üredi. İdentifikasyon sonucunda piyasada satılan çiğ süt (n=100) örneklerinin %48 (n=48)'inde *S. aureus* saptandı. Pastörize sütlerde, 6 pastörize süttten izole edilen *Staphylococcus* spp. izolatlarının 2'sinin koagülaz pozitif olduğu, bunların identifikasyon testleri sonucunda 1'inin *S. aureus* olduğu belirlendi. Sonuç olarak piyasada satılan çiğ süt (n=100) örneklerinin 48 (%48)'inde ve pastörize süt (n=100) örneklerinin 1 (%1)'inde *S. aureus* saptandı. Tüm sütlere (n=200) oluşmuş SEA-SEE enterotoksin varlığını belirlemek amacıyla uygulanan ELISA sonucunda, *S. aureus* saptanan 10 (10/48) çiğ süt

örneğinde, Stafilokokal enterotoksin varlığı saptandı. Saptanan enterotoksin tipleri incelendiğinde ilk sırada SEA (10/10), ikinci sırada SEE (7/10) ve üçüncü sırada SEB üretildiği belirlendi. İzolatların hiçbirinin SEC ve SED üretmediği görüldü. Pastörize sütlerde stafilokokal enterotoksin saptanmadı. Real-Time PCR testi ile enterotoksinlerin sentezinden sorumlu *sea-see* enterotoksijenik gen tiplerinden en az biri 45 *S. aureus* izolatında saptandı ve bu genler sadece çiğ süt örneklerinden elde edilen izolatlarda tespit edildi. Pastörize süttten izole edilen *S. aureus* 'da (n=1) ise enterotoksin geni saptanmadı. Çiğ sütlerde izole edilen *S. aureus* izolatlarının %93,8 (45/48)'inde söz konusu genlerden en az bir tanesinin bulunduğu, 3'ünün ise bu genleri taşımadığı tespit edildi. Enterotoksin genlerinin %46,7 (21/45)'sinde tek tip, %33,3 (15/45)'ünde iki, 13,3 (6/45)'ünde üç, %4,4 (2/45)'ünde dört ve %2,2 (1/45)'sinde ise tüm gen bölgelerinin bir arada bulunduğu tespit edildi. İzolatlarda en çok *sec* geni (n=27) saptanmış olup, bunları *sea* (n=19), *seb* (n=15), *sed* (n=14) ve *see* (n=7) genlerinin takip ettiği belirlendi. Real-Time PCR sonuçları (n=45) ile ELISA sonuçları (n=10) birbiriyle karşılaştırıldığında ELISA sonucunda sütlerde saptanan enterotoksin tiplerinin, aynı süttten izole edilen *S. aureus* izolatlarında saptanan enterotoksijenik gen bölgeleri (*sea-see*) ile uyumlu olduğu saptandı. Çiğ süt örneklerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının %77,8 (35/45)'inde bir veya daha fazla enterotoksin gen tipi/tipleri saptanmasına rağmen bu izolatlara ait sütlerde sentezlenmiş enterotoksin belirlenmedi. Sonuç olarak, tüketime sunulmuş çiğ süt ürünlerinde %98 oranında *Staphylococcus* spp. ve % 48 oranında *S. aureus* saptandı ve enterotoksin gen tipi/tiplerini taşıyan, etkenle kontamine olmuş bu ürünlerin de bir kısmında süte salınmış enterotoksin varlığı belirlendi. Bu bulgular, *S. aureus*'un çiğ sütlerde ciddi kirliliğe neden olduğunu ve bunun halk sağlığı açısından risk oluşturduğunu gösterdi. Bu nedenle üretimden tüketime kadar her aşamada çiğ süttün kalite ve güvenliğini sağlamak için kontrol önlemleri ve sürekli izleme programlarının yapılması gerekliliği vurgulandı.

Şubat 2022 , [97] sayfa.

**Anahtar kelimeler:** [Süt, *Staphylococcus ureus*, Enterotoksin, ELISA, Real-Time PCR, *sea-see* genleri ]

## ABSTRACT

[Ph.D. THESIS]

### [INVESTIGATION OF ENTEROTOXIGENIC STAPHYLOCOCCUS AUREUS AND ENTEROTOXINS IN RAW AND PASTEURIZED MILK AVAILABLE IN THE MARKET FOR CONSUMPTION ]

[Recep GEÇKİNLİ]

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Microbiology

Microbiology Program

[Supervisor : Prof. Dr. Seyyal AK ]

In this study, it was aimed to determine the presence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk offered for consumption in and around Istanbul, enterotoxins formed in all milk by ELISA and staphylococcal enterotoxin genes by Real-Time PCR. Collected 100 raw and 100 pasteurized (n=200) milk samples were plated on Baird Parker agar containing Egg Yolk Tellurite. *Staphylococcus* spp. in 98% of raw milk samples and 48% of *S. aureus* suspicious colonies grew. *Staphylococcus* spp. colonies grew in 6 and *S. aureus* suspicious in 1 of pasteurized milk samples. As a result of the identification, *S. aureus* was detected in 48% (n=48) of the raw milk (n=100) samples sold in the market. In pasteurized milk, *Staphylococcus* spp. isolated from 6 pasteurized milk. It was determined that 2 of the isolates were coagulase positive, and 1 of them was *S. aureus* as a result of the identification tests. As a result, *S. aureus* was detected in 48 (48%) of commercially available raw milk (n=100) prefixes and in 1 (1%) of pasteurized milk (n=100) prefixes. Staphylococcal enterotoxin was detected in 10 (10/48) raw milk samples with *S. aureus* as a result of ELISA

applied to all milk (n=200) to determine the presence of SEA-SEE enterotoxin. When the detected enterotoxin types were examined, it was determined that SEA (10/10) was the first, SEE (7/10) was the second, and SEB was the third. It was observed that none of the isolates produced SEC and SED. Staphylococcal enterotoxin was not detected in pasteurized milk. At least one of the *sea-see* enterotoxigenic gene types responsible for the synthesis of enterotoxins was detected in 45 *S. aureus* isolates by Real-Time PCR test, and these genes were detected only in isolates obtained from raw milk samples. Enterotoxin gene was not detected in *S. aureus* (n=1) isolated from pasteurized milk. It was determined that 93.8% (45/48) of *S. aureus* isolates isolated in raw milk had at least one of the aforementioned genes and 3 did not carry these genes. 46.7% (21/45) of enterotoxin genes had one, 33.3% (15/45) had two, 13.3 (6/45) had three, 4.4% (2/45) had four, and 2.2% (1/45) of it had all gene regions together. The most *sec* gene (n=27) was detected in isolates, followed by *sea* (n=19), *seb* (n=15), *sed* (n=14) and *see* (n=7) genes. When Real-Time PCR results (n=45) and ELISA results (n=10) were compared with each other, it was determined that enterotoxin types detected in milk as a result of ELISA were compatible with enterotoxigenic gene regions (*sea-see*) detected in *S. aureus* isolates isolated from the same milk. Although one or more enterotoxin gene type(s) were detected in 77.8% (35/45) of *S. aureus* isolates isolated from raw milk samples, no synthesized enterotoxin was detected in the milk of these isolates. As a result, 98% *Staphylococcus* spp. and 48% of *S. aureus* carriers were observed, and the presence of enterotoxin released into milk was determined in some of these products, which were contaminated with the agent and carried the enterotoxin gene type(s). These findings showed that *S. aureus* causes serious pollution in raw milk and this poses a risk to public health. For this reason, it was emphasized that control measures and continuous monitoring programs should be carried out in order to ensure the quality and safety of raw milk at every stage from production to consumption. |

February 2022, |97| pages.

**Keywords:** | Milk, *Staphylococcus aureus*, Enterotoxin, ELISA, Real-Time PCR, *sea-see* genes|

## 1. GİRİŞ

Süt, insanların bütün hayatında önemli bir yer teşkil etmesinin yanında, içerisinde vücudun ihtiyaç duyduğu hayvansal orijinli protein ve lipitleri, bir süt şekeri olan laktozu, vitamin ve mineralleri yeterli ve dengeli oranda ihtiva eder. Beslenme değeri oldukça yüksek olan süt, aynı zamanda, vücut fonksiyonlarını düzenleyen, kemik ve iskelet sistemini destekleyerek vücut gelişimini sağlayan en temel gıda maddesidir. (İnal T., 1990). Tarım ve Orman Bakanlığı'nın 2017/20 tebliğ numaralı, Çiğ Sütün Arzına Dair Tebliğ'ine göre çiğ süt "bir veya daha fazla inek, keçi, koyun veya mandanın sağılmasıyla elde edilen, 40°C'nin üzerinde ısıtılmamış veya eşdeğer etkiye sahip herhangi işlem görmemiş kolostrum dışındaki meme bezi salgısıdır" olarak tanımlanmıştır (Anonim, Çiğ Sütün Arzına Dair Tebliğ 2017/20).

Çevremizde doğal olarak bulunan mikroorganizmaların süte geçişi kolaylıkla meydana gelebilmektedir. Ayrıca sütteki nötral pH ve içerisindeki lipit, mineraller, laktoz, azot ve sitrik asitin yanında bol miktardaki su onun çeşitli mikroorganizmaların gelişimi açısından elverişli bir ortam olması neticesini doğurur (Ünlütürk ve Turantaş, 1999). Üretiminde hijyenik koşulların sağlanmaması, işlenmesi ve muhafazası sırasında gerekli kontrollerin gerçekleştirilmemesi gibi durumlarda süt ve ürünlerinde mikroorganizmalar kolayca üreyebilmekte, dolayısıyla insan sağlığı açısından tehlike oluşturabilmektedir (Baz ve ark., 2003). Bu anlamda, *Staphylococcus aureus* sütin bozulmasına sebep olan en tehlikeli mikroorganizmalardan biridir. Bu mikroorganizma sadece dış ortamdan değil aynı zamanda meme iltihabı (mastitis) olan bir hayvandan sağılmış süttten de bulaşabilmektedir (Arda ve ark., 1982, Valsangiacomo ve ark., 2000). Çevrede var olan mikroorganizmalar normal şartlarda az miktarda bakteri ihtiva eden süte çok çabuk bir şekilde sirayet ederek onu bozabilmekte ve birtakım potajenler yoluyla insanların çeşitli hastalıklara yakalanmasına yol açabilmektedirler (Baz ve ark., 2003). Bu bağlamda, stafilokokal infeksiyonların başlıca sebebi koagulaz pozitif ve koagulaz negatif stafilokoklar olabilmektedir. Ayrıca *S. aureus* stafilokokal gıda intoksikasyonunun en önde gelen sebebi olma özelliği göstermektedir (Oliver ve ark., 2005; Kılıç, 2007).

Sütün hijyenik kalitesini, sağılan hayvanın sağlıklı olup olmamasından, son ürün haline gelene kadarki geçirdiği süreçler oldukça etkilemektedir. Süt ve süt ürünlerinde bulunan mikroorganizmaların miktarı ve çeşitleri, sağım, işleme ve depolama şartlarının yanı sıra sütün mikrobiyolojik niteliği ve sıcaklık gibi faktörlerle bağlantılı olarak değişkenlik gösterir. Üretim şartlarının kontrolsüz oluşu, süttten kaynaklanan zehirlenmeler ve enfeksiyon tehlikesini artırmaktadır (Sawant ve ark., 2009). Sütün yapısı ve bileşimi stafilocoklar için oldukça uygun olduğundan çok rahat bir şekilde gelişip toksin oluşturabilirler (Asao ve ark., 2003). Türkiye’de süt üretiminin bir kısmını düzensiz küçük aile işletmeleri ve mandıralar sağlamaktadır. İstenilen koşullarda çiğ sütün elde edilmesi, mandıralarda çalışan personelin yeterli hijyen eğitiminin bulunmaması ve gerekli koşulları sağlayan süt toplama merkezlerinin eksikliğinden dolayı güçleşmektedir (Yalçın, 2005).

Subklinik mastitisli hayvanlar, sütlerin stafilocoklar ile kontamine olmasında önemli bir role sahiptir (Da Silva ve ark., 2005; Küplülü, 2002). Ayrıca sağıldıktan sonra oda sıcaklığında gereğinden fazla bekletme, pastörizasyonun yeterli şekilde yapılmaması, pastörizasyondan sonra gerçekleşen kontaminasyon, çalışanların hijyenine ve süt işletmesi dezenfeksiyonuna gerekli özenin gösterilmemesi, sütlerde stafilocokal enterotoksin (SE) oluşma tehlikesini arttırmaktadır. Stafilocokların ısı işlem gibi mikroorganizmaların azaltılmasını hedefleyen işlemlere karşı duyarlılığı oldukça yüksektir. Sütlerde ve kullanılan alet ve ekipmanlarında *S. aureus* ve enterotoksinlerine rastlanması ortam hijyeninin yetersiz olduğunun bir göstergesidir (Soriano ve ark., 2002).

Bu tez çalışmasında, konvansiyonel bakteriyolojik yöntemlerle tüketim amacıyla piyasada bulunan çiğ ve pastörize sütlerdeki *S. aureus* varlığının, ELISA ile sütte oluşmuş enterotoksinlerin ve Real-Time PCR ile de elde edilecek *S. aureus* izolatlarındaki enterotoksijenik gen bölgelerinin saptanması amaçlanmıştır.

## 2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

### 2.1. Süt

Hayvansal bir gıda olan sütün tanımı Türk Standartları Enstitüsü (TSE) tarafından yapılmıştır. TSE'ye göre süt, inek, koyun, keçi ve manda gibi çiftlik hayvanlarının meme bezlerinin bir sekresyonu olup hayvanın yavrusunu beslemede kullanılan, kendine has tat ve kıvamda, içine sonradan yabancı madde katılmamış veya orijinal halinden herhangi bir maddesi eksilmemiş beyaz ya da krem rengindeki sıvıdır (Ünal ve Besler, 2008).

#### 2.1.1. Sütün Bileşimi ve Özellikleri

Normal bir sütün su oranı ortalama %84-%90 arasında değişkenlik gösterir ve ortalama %88 civarındadır. Suyun dışındaki süt bileşenleri arasında yer alan süt şekeri, %37,3 ile sütte miktar olarak ikinci sırada kendine yer bulur. Başka bir şekilde ifade etmek gerekirse, yağ dışındaki kuru maddenin %54'ünü laktoz meydana getirmektedir. Sütteki tatlı aroma laktoz kaynaklıdır. Ayrıca temel bir süt bileşeni olarak beslenmede çok önemli bir yeri vardır. Kalsiyum emilimini ve yağ metabolizmasını düzenler. Asidik bir ortam sağlayarak patojenlerin inhibisyonunu ve yararlı mikroorganizmaların sayısının artmasını sağlar bu sayede bağırsak mikroflorasını olumlu yönde dengeler. Galaktoz, beyin dokusundaki glikolipitlerin temel maddesi olduğundan beyin gelişimi için oldukça önemlidir ve laktozun bileşiminde yer alır (Walters ve Jenness, 1984; Metin, 2001).

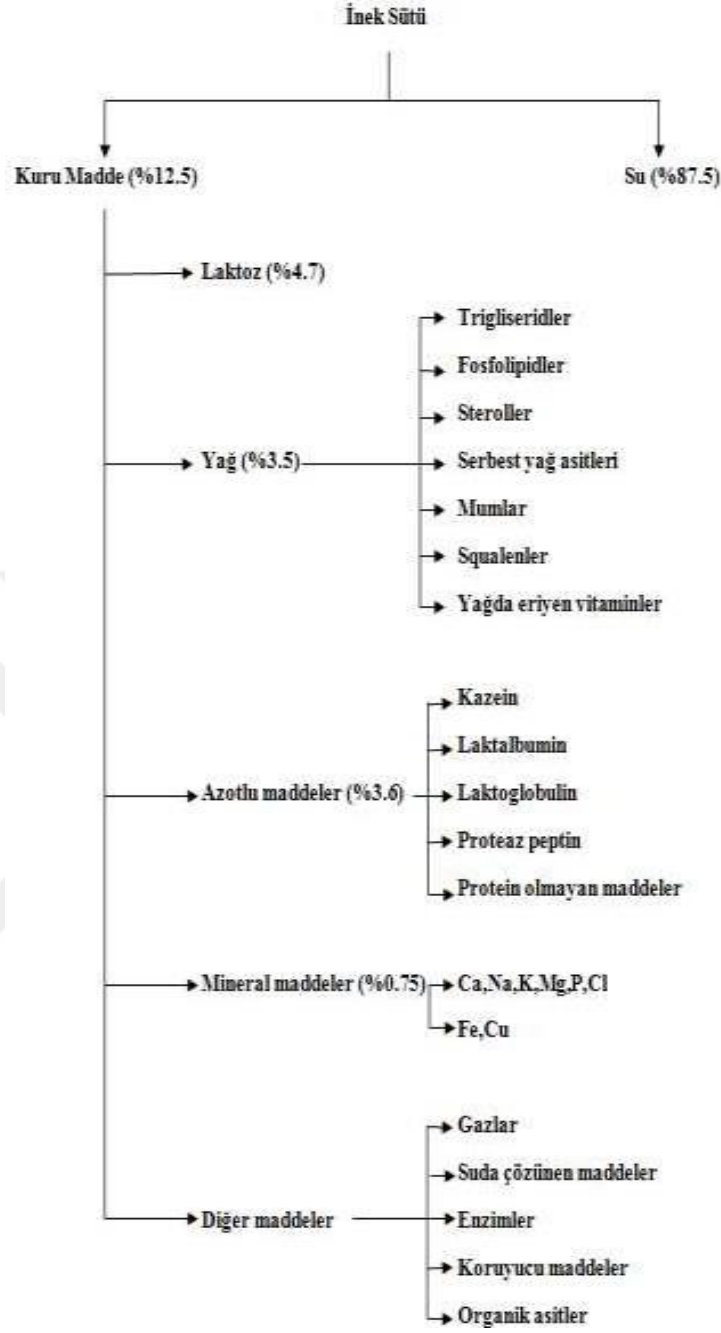
Sütün diğer önemli maddelerinden birisi süt lipidleri olarak adlandırılan süt yağıdır ve sütte ortalama %3,2 oranında yer almaktadır. Süt yağı, sütün fiziksel nitelikleri, aroması ve besin değerleri açısından önemli bir bileşendir, bunun yanında başka hayvan kökenli yağlarla karşılaştırıldığında kolesterol açısından düşük bir orana sahiptir. Süt yağı, sütün kendine has krem rengindeki görüntüsünü oluşturur ayrıca süte lezzet ve tat verir. Bunlara ilaveten vücudun ihtiyacı olan yağ asitleri, yağda çözünen vitaminler ve metabolik enerji için temel bir maddedir (Yetişmeyen, 1997; Üçüncü, 2005).

Kalitesi yüksek olarak bilenen inek sütündeki protein oranı %3,0-3,5 civarındadır. Süt, kazein ve serum proteinlerinin yanı sıra protein olmayan enzimler ve bir miktar da azot içeren karma bir yapıya sahiptir. Sütteki proteinin %80'i kazein (%92 protein, %8 inorganik

maddeler) %20'si serum şeklinde dağılım göstermektedir. Sütün beslenmede önemli bir yere sahip olmasının nedenleri, yapısındaki proteinlerin kolay sindirilebilmesi ve çeşitli aminoasitleri ihtiva etmesi nedeniyle besinsel değerinin yüksek olmasıdır (Duyuk, 2015).

Süt insanın ihtiyaç duyduğu birçok vitamini ihtiva eder. Bunlardan bir kısmı suda eriyen vitaminler diğer kısmı ise süt yağı ile ilişkilendirilen A, D, E, K vitaminleridir. Süt aynı zamanda folat bağlayıcı proteinler ile serum proteini ihtiva etmesi dolayısıyla folat açısından zengin bir kaynaktır (Walstra ve Jennes, 1984; Metin, 2001; Fox, 2003). Sütün içeriğinde bolca yer alan mineral maddeler, kalsiyum, fosfor, magnezyum, potasyum, çinko olarak sıralanabilir. Bununla birlikte içeriğindeki demir oranı yeterli miktarda olmamasından dolayı süt, çocukların büyüme dönemindeki demir ihtiyacını yeterli şekilde karşılayamamaktadır. Sütteki mineral miktarı sütün elde edildiği hayvanın genetik yapısı, fizyolojik ve laktasyon durumunun yanı sıra, çevresel faktörler ve sütün tabii tutulduğu işlemlere göre değişkenlik gösterir (Yetişmeyen, 1997; Miller ve ark., 2000; Baysal, 2004).

Eğer yeni sağılmışsa, sağlıklı bir inek sütünün pH'ı 6,6 ile 6,8 arasındadır. Bu durumda 6,8'in üzerindeki bir pH değeri mastitis olarak adlandırılan meme iltihabı veya ortamı nötr yapan herhangi bir madde varlığının, 6,5'in altındaki bir pH değeri ise mikrobiyal kirlenmenin belirtisi olan aşırı asitlik gelişiminin bir göstergesidir (Tekinşen ve Nizamlıoğlu, 2001; Üçüncü, 2005). Sütün yoğunluğundaki değişkenlik, içerisinde bulunan maddelerden kaynaklanır. Isı düzeyi 20°C olduğunda inek sütünün yoğunluğu 1,028-1,037 g/ml aralığındadır. Süt yağının yoğunluğu 0,93 g/ml'dir ve birbiriyle ters orantılıdır. Yani süt yağının miktarı artarken sütün yoğunluğu azalır. Sütün içerisinde yer alan protein, laktoz ve minerallerin miktarındaki artış sütün yoğunluğunu da arttırmaktadır (Yetişmeyen, 1997).



**Şekil 2.1** İnek sütünün bileşimi (Üçüncü, 2005)

## 2.2. Stafilocoklar

### 2.2.1.Tarihçe

Robert Koch 1878 yılında Stafilocokların tanımını ortaya koymuştur, ancak daha sonra 1884 yılında *Micrococcaceae* familyası içerisinde yer alan ayrı bir soy olarak tanımlanmışlardır (Kılıç, 2007). Bugüne gelindiğinde ise *Bacilli* sınıfında *Bacillales* takımında ve *Staphylococcaceae* familyası içerisinde yer alırlar (Schneewind ve Missiakas, 2008). National Center for Biotechnology Information (NCBI) yaptığı sınıflandırmada *Staphylococcus* cinsi içerisinde 49 tür olduğunu bildirmiştir. Ancak söz konusu türlerin herhangi bir enfeksiyona yol açmadığı dolayısıyla zararsız olduğu iddia edilmektedir (Ektik, 2015). Fakat enzim ve toksinleri vasıtasıyla birçok enfeksiyon ve intoksikasyonlara yol açan bazı türler de bu familya içerisinde bulunmaktadır (Zell ve ark., 2008). Bunlar arasında patojenite bakımından en önemli tür *S. aureus*'tur (Garrity ve ark., 2004). Yapılan çalışmalarda *S. aureus* üzerinde yoğunlaşılmasının nedeni insan ve hayvan kaynaklı hastalıklar ile gıda kökenli enfeksiyonlarda en çok tespit edilen tür olmasından kaynaklanmaktadır (Ektik, 2015).

İskoç bir doktor olan Sir Alexander Ogston ilk olarak *S. aureus*'u 1880 yılında diz eklemi apsesi üzerinde yaptığı bir çalışma esnasında izole etmiş ve mikroskop altında üzüm salkımına benzeyen kümeler şeklinde görüldüğünü bildirmiştir. Kelimenin kökeni Yunancaya uzanmaktadır ve *staphyle* (üzüm salkımı) ve *coccus* (tane) şeklinde karşılık bulmaktadır. Almanya'da Friedrich Julius Rosenbach 1884'te bu bakteriyi saf kültürden izole etmiş ve içerisinde barındırdığı kolonilerin rengine istinaden, Latin dilinde *aurum* kelimesinin altın anlamına gelmesinden dolayı, *S. aureus* ismini vermiştir (Henry, 2013).

Stafilocok kaynaklı enfeksiyonların tedavisi, 1928 senesinde penisilinin Alexander Fleming tarafından tıp dünyasına sunulmasına ilaveten 1940'da Florey ve Chain'in penisilin üretimine başlaması ile daha da ilerlemiştir. Kirby 1944'de *S. aureus* suşlarındaki penisilin direncinin varlığını ortaya koymuştur. 1957'de Evans, bu grupta yer alan bakterilerin glikozu anaerobik olarak fermentasyona uğratabildiklerini keşfetmiş ve onları farklı bir soy ve *Staphylococcus* ismi ile tanımlamıştır. İlerleyen zamanda Winslow *S. epidermidis*'i ikinci bir tür olarak tanımlamıştır. Daha sonra da 1974'de *S. saprophyticus* stafilocoklara eklenen üçüncü bir tür olmuştur. 1980'de 13, 1984'de 20 olan tür sayısı daha sonra yapılan moleküler, biyokimyasal ve immunokimyasal çalışmalarla 25'e dayanmıştır (Şardan, 2000).

### 2.2.2. Sınıflandırma

Bergey'in 1986 yılında basılan, Manuel of Systematic Bacteriology, kitabında *Staphylococcus* ve *Micrococcus* cinsleri, *Stomatococcus* ve *Planococcus* cinsleri ile *Micrococcaceae* ailesinde yer alıyordu. Daha sonra yapılan moleküler filogenetik ve kemotaksonomik analizler sonucunda stafilokok ve mikrokokların birbiriyle çok yakın ilişkisinin bulunmadığı anlaşılmıştır. Bergey'in daha sonraki güncel, Manuel of Systematic Bacteriology, baskısında Stafilokoklar *Firmicutes* şubesi *Bacilli* sınıfı *Bacillales* takımı *Staphylococcaceae* ailesi içinde Genus 1 olarak sınıflandırılmıştır (Koçak Kızanlık, 2019; Becker ve ark., 2015).

Şu zamana kadar *Staphylococcus* olarak adlandırılan grupta, 21 alt türü içeren toplam 45 türün identifiye edildiği bildirilmiştir. Stafilokokların büyük bir kısmı memeli ve kanatlı hayvanların vücut yüzeyi ve mukozalarında yer alır. *S. aureus* insanlar için patojenite bakımından *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus subsp. saprophyticus* ve *S. lugdunensis*'e göre en önemli türdür. Ayrıca daha az oranda *S. auricularis*, *S. capitis subsp. capitis*, *S. capitis subsp. urealyticus*, *S. caprae*, *S. cohnii subsp. cohnii*, *S. cohnii subsp. urealyticus*, *S. hominis subsp. hominis*, *S. hominis subsp. novobiosepticus*, *S. pasteurii*, *S. pettenkoferi*, *S. saccharolyticus*, *S. schleiferi subsp. schleiferi*, *S. simiae*, *S. simulans*, *S. warneri* ve *S. xylosus* da enfeksiyona yol açabilmektedir (Becker ve ark., 2015).

### 2.2.3. Morfolojik ve Biyokimyasal Nitelikleri

*S. aureus* *Micrococcaceae* familyasında yer alır, Gram pozitif özellikli, 0.5 – 1.0 µm çapında, yuvarlak şekilli ve sporsuz bir mikroorganizmadır. *S. aureus*, mikroskop görüntülerinde kok şeklinde, ikili, dörtlü gruplar veya dağınık kümeler olarak ya da üzüm salkımını andıran, kimi zaman da kısa kısa zincirler oluşturan bir mikroorganizmadır (Bremer ve ark., 2004).

Birbirleriyle aynı görünümde olan yuvarlak şekilli koklar, stafilokoklara özgü bir niteliktir. Bazı stafilokoklarda polisakarit yapıda kendini belli eden bir kapsül veya mukoid tabaka olmasına karşın, çoğunlukla kapsülsüz, hareketsiz, anaerob olan *s. saccharolyticus* hariç genellikle fakültatif anaerob mikroorganizmalardır (Çalık, 1998). Stafilokoklar yeni kültürlerde Gram pozitif olarak boyanmalarına rağmen, eski kültürlerde Gram negatif olarak gözlenirler (Leloğlu, 1999). Stafilokokların çoğu, içeriğinde %7,5-10 NaCl içeren basit

besiyerlerinde, 7-47°C ortam sıcaklığında ürerler fakat, 37°C’de ve pH 7-7.5’te optimum üreme gösterirler. Bu mikroorganizmaların oksidaz özelliği negatif, katalaz özelliği pozitif olarak belirtilmiştir (Cengiz, 1999; Bremer ve ark., 2004).

*S. aureus*’lar fakültatif anaerobik özelliklidirler fakat aerobik ortamlarda çok daha iyi gelişip üreyebilirler ve glikozu fermentasyona uğratarak aseton oluşturabilmektedirler (Seo ve Bohach, 2012). Koagülaz enzimi *S. aureus* suşlarının identifiye edilmesinde önemli bir işlev görse de kesin belirleyici bir özelliği yoktur (Erol, 2007). *S. aureus*’un mannitolü fermentasyona uğratması ise identifikasyonunda kullanılan önemli bir ayırıcı özelliktir (Koçak Kızanlık, 2019; Seo ve Bohach, 2012).

Baird Parker agar 1960’lı yıllardan günümüze kadar *S. aureus* için kullanılan en yaygın ve başarılı besiyeri olmuştur. Bu besiyerinin selektif özelliği oldukça iyi olmasıyla birlikte, içeriğinde bulunan lityum klorür ve supplement içindeki tellürit rekabetçi florayı inhibe ederken, yapısında bulunan piruvat ve glisin ile sonradan ilave edilen yumurta sarısı ise mikroorganizmanın gelişimine katkı sağlar. *S. aureus* BPA’da 2 tipik özellik gösterir. Bunlar, tellüritin mikroorganizma tarafından parçalanması sonucu oluşan karakteristik parlak siyah renkte koloniler ve besiyerine ilave edilen yumurta sarısındaki lipovitellinin lesitinaz enzimiyle hidrolizi sonucu kokların etrafında oluşan şeffaf zon şeklindedir. Ancak koagülaz, katalaz, termonükleaz testleri gibi diğer biyokimyasal testlerinde sonuçların doğrulanması açısından önemi büyüktür (Adams ve Moss, 2008).

**Tablo 2.1.** *S. aureus* ’un gelişimi ve toksin üretmesi için gerekli olan genel parametreler (Erol & İşeri, 2004)

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

Ae: Aerob, An: Anaerob

## 2.2.4. Virülens ve Patojenite Faktörleri

*S. aureus* en fazla risk taşıyan ve patojenitesi en yüksek olan stafilocok türüdür. İnfeksiyonun gerçekleşip gerçekleşmemesi konak savunma sistemi ve mikroorganizma virulansının oluşturacağı dengeye göre değişkenlik gösterir. Yüzey proteinleri, hücre duvarının yapısı, kapsül, enzimler ve toksinler stafilocokların patojenitesini belirleyen faktörler arasındadır (Akan, 2006). Hastalık yapıcı etkenin konaktaki hücrelere kanalize olmasına katkıda bulunan etmenler, sitotoksinler ve hemolizin, nükleaz, proteaz, lipaz, hiyaluronidaz ve kolajenazdan ibaret olan enzim bir grubudur. Bu etmenler konakçı hücre ve dokularını mikroorganizmanın çoğalması için uygun hale getirir. *S. aureus* suşlarının bazıları Toksik Şok Sendrom Toksini (TSST-1) ve enterotoksinleri ihtiva eden ekzoproteinleri bir veya birden fazla oranda sentezleyebilirler (Dinges ve ark., 2000).

### 2.2.4.1. Hücre Duvarı

Stafilocokların hücre duvarı 30 ile 60 nm kalınlığında olup tipik Gram pozitif yapı özelliği gösterir. *S. aureus*'un hücre duvarı kalınlığı yerine göre 120 nm'yi aşabilmektedir (Schleifer ve Kroppenstedt, 1990). Hücre duvarının temel yapıtaşlarını, peptidoglikan (%50), fosfat içeren teioik asit (%40) ve proteinler oluşturur. Peptidoglikan bakterinin şeklini veren, ozmotik dengeyi sağlayarak onu lizisten koruyan, N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramik asidin bir peptide kovalent bağlarla bağlantı kurmasıyla meydana gelen bir polimerdir (İnal M., 2014). Bu tabakanın insanda aktivite gösterme şekli Gram negatif bakterilerin endotoksinlerine benzer, diğer bir ifadeyle makrofajlardan sitokin salınımını harekete geçirir ve trombosit agregasyonuna yol açar. Buna ilaveten monositlerden interleukin-1 salınımını tetikleyerek polimorfnükleer lökositlerin infeksiyonun bulunduğu alana toplanmasına, sonuç olarak da apse oluşumuna neden olur (Tünger, 2004; Kutlu, 2006).

Diğer bir önemli hücre duvarı katmanı, yalnız Gram pozitif bakteri duvarında yer alan fosfat içeren teikoik asittir. Teikoik asit, mukozalarda yer alan kendine has reseptörler ile birleşerek stafilocokların konak hücrelerine tutunmasını sağlar (Tünger, 2004; Kutlu, 2006). Proteinler ise adezyon bakımından önem arz eden fibronektin, fibrinojen, laminin ve kollajen içermektedir. Bakteriyel tutunma faaliyeti adezyon proteinlerinin bağlanması ile vuku bulmaktadır. Protein-A, antijenik proteinler içinde üzerinde en çok araştırma yapılmış olandır

ve *S. aureus* suşlarının %90-98'i bu proteini içerir (Schleifer ve Kroppenstedt, 1990; Öncül, 2006).

#### **2.2.4.2. Kapsül**

Stafilokoklarda hücre duvarının en dış katmanı polisakkarit bir kapsül ile kaplıdır. *S. aureus* 11 adet kapsül serotip ihtiva etmektedir. Bakteriyel infeksiyonların büyük bir çoğunluğu serotip 5 ve serotip 7 ile bağlantılıdır. Mukoid görünümlü koloniler meydana getiren serotip1 ve serotip 2 çok kalın bir kapsül içerir. Kapsül, bakterinin kateter ve benzeri yabancı cisimlere adezyonuna yol açar, ayrıca bakteriyi fagositozdan korur (Tünger, 2004).

#### **2.2.4.3. Yüzey Proteinleri**

Stafilokokların kapsül özelliğindeki polisakkarit maddeleri ve yüzeylerinde yer alan Protein-A mikroorganizmayı fagositozdan koruyarak patojenitenin artmasına neden olurlar (Bilgehan, 1995). Peptidoglikan katmanında yer alan Protein-A, 42 kilodalton molekül ağırlığına sahiptir. Protein-A bir hücre duvarı bileşinidir ve hücre duvarını oluşturan peptidoglikan yapı ile kovalent bağla bağlanmıştır. Protein-A çeşitleri hücreye bağlı, hücre dışı ve ortama salınan olarak üç tiptir. Antikomplementer ve antifagositer etkiler Protein-A'nın en temel özellikleridir. Nasıl oluştuğu tam olarak bilinmemekle birlikte patojen eliminasyonunun, konak polimorfnükleer hücrelerinin antifagositik etkisi yoluyla gerçekleştiği iddia edilmektedir (Sandel ve McKillip, 2004). Stafilokokal Protein-A'nın, antibiyotik duyarlılığını düşürmesi, antifagositik yanıt oluşturması aynı zamanda da nükleaz ve koagülaz aktivitelerinin bulunması nedeniyle önemli bir patojenite kriteri olduğu öne sürülmektedir (Biçer, 2009).

#### **2.2.4.4. Glikokaliks (Slime Factor)**

Glikokaliks, polisakkarit kaplı ve bakteri tarafından meydana getirilen bir yapıdır. Bu tabaka, yapışkan bir özellikte olmasından dolayı "slime" olarak da isimlendirilir. Bakterilerin dokulara yapışarak bağlanması, enfeksiyonun başlangıcının ilk aşamasıdır. *S. aureus*'lar üzerlerinde bulunan reseptörler ile fibrinonektine, fibrinojene veya fibril benzeri tabakalara bağlanırlar. *S. aureus*'ların in vitro ortamlarda hücre yüzeylerine yapışarak biyofilm

oluşturması ve eksopolisakkarit üretimi, fagositoza karşı direnç göstermeye ve antibiyotiklere karşı düşük hassasiyete neden olur (Cucarella ve ark., 2001; Gündoğan ve ark., 2005).

Amorf kapsül yapısında bir glikokaliks materyali olan slaym maddesi %40 karbonhidrat ve %27 protein içerir. Slaym özelliği sayesinde stafilokoklar tıbbi aletlere çok kolay bir şekilde bağlanıp çoğalabilirler. Antijenik yapılarının çok güçlü olmasından dolayı yüksek dozda antikor oluşturabilirler. Slaym pozitif stafilokok suşlarının patojenitesi daha fazladır, fagositoza karşı daha güçlü direnç gösterebilirler ve bakteri içine antibiyotik girişini engelleyebildiklerinden antibiyotiklere büyük oranda direnç gösterirler (Cengiz, 1999).

#### **2.2.4.5. Enzimler**

*S. aureus*, yaşamını sürdürebilmek ve konakçının immun sistemine karşı kendini korumak için birden fazla enzim üretir. Bu enzimler; katalaz, koagulaz, lipaz, hyaluronidaz, lesitinaz (fosfolipaz C), deoksiribonükleaz, termonükleaz, stafilokinaz ve betalaktamaz olarak adlandırılır (Dinges ve ark., 2000; Sandel ve McKillip, 2004).

##### **2.2.4.5.1. Katalaz**

Tüm stafilokoklar tarafından sentezlenen bu enzim, mikroorganizmaların metabolik aktiviteleri neticesinde ortaya çıkan hidrojen peroksiti, yapıtaşları olan hidrojen ve oksijene ayrıştırır. Katalaz enzimi sayesinde bakteriler toksik oksijen radikalleri tarafından elimine edilmeye karşı daha dirençli olurlar (Arda ve ark.,1997; Kutlu, 2006).

##### **2.2.4.5.2. Koagulaz**

Koagulaz enzimi, ısıya karşı dayanıklı, filtrelerden geçebilen, plazmadaki antifagositik faktörü hidrolize ve plazmayı da koagule edebilen, patojen stafilokoklar tarafından sentezi yapılan ve patojeniteyi önemli ölçüde artıran en önemli enzimlerden biridir (Pottumarthy ve ark., 2004). Koagulaz, antijenik özellikli ve protein kaynaklı bir enzimdir, stafilokoklar haricinde *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis* gibi mikroorganizmalar da bu enzimi sentezleyebilmektedir (Koneman ve ark., 1997; Bilgehan, 2000). Stafilokoklar insan veya tavşan plazması ile temas ederlerse belli bir zaman sonra plazma pıhtılaşır. Bu tipteki stafilokoklar fagositoza karşı, koagulaz enzimleri sayesinde,

etraflarını bir fibrin zırhıyla kaplamak suretiyle kendilerini korurlar ve aynı zamanda kan serumunun bakterisit etkisini de engelleyerek infeksiyöz özellik kazanırlar (Koneman ve ark., 1997; Muratoğlu, 2010).

Koagulaz, ekstraselüler bir proenzimdir, *S. aureus* 'larda iki değişik formda bulunur ve bunlar hücreye bağlı koagulaz (Clumping Factor, CF) ve serbest koagulaz olarak tanımlanır. CF, plazmada fibrinojeni parçalayarak fibrine dönüştürmekte ve oluşan bu fibrin hücre yüzeyinde çökeltme oluşturmaktadır. Neticede stafilokoklar aglütinasyon sonucu birbirine bağlanmak suretiyle kümeleşirler. Serbest koagulaz, etkisini ancak ortamda trombine benzeyen faktör (Coagulase-Reacting Factor, CRF) bulunduğunda gösterebilir ve CRF'yi uyararak plazmayı pıhtılaştırır. İmmunolojik yapı ve etki mekanizması açısından serbest koagulaz ve CF birbirinden farklıdır. Plazmanın pıhtılaşması bu antijenlerin farklı enzim tepkimeleri sonucu oluşmaktadır. Bu yüzden lam koagulaz testi CF ve tüp koagulaz testi ise serbest koagulaz tespitinde yoğun olarak kullanılmaktadır (Muratoğlu, 2010).

Koagulazın üretilme şekli stafilokokların sınıflandırmasını belirleyen en önemli biyokimyasal faktördür. Stafilokoklar içerisinde koagulaz pozitif olanlar *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. aureus subsp. anaerobius*, *S. delphini*, *S. schleiferi subsp. coagulans*, *S. lutrae* ve *S. pseudointermedius* 'tur. Enterotoksijenik tipte ve koagulaz pozitif olan stafilokokların bulunduğu grup gıda zehirlenmeleri açısından büyük risk taşımaktadır (Freney ve ark., 1999; Devriese ve ark., 2005; Sasaki ve ark., 2010).

#### **2.2.4.5.3. Deoksiribonükleaz (DNaz)**

Patojenik stafilokokların tespitinde DNaz, koagulazla birlikte patojenitenin belirlenmesi için kullanılan en önemli enzimlerden biridir. DNaz enzimi fosfodiesteraz özelliğinde olup, endo ve ekzo nükleaz aktivitesi gösteren nükleazları 3'-fosfomononukleotidlere parçalarlar. *S. aureus* 'lar DNaz enzimleriyle ortamdaki DNA'ları parçalayarak kolonilerin etrafında bir zon bölgesi oluştururlar (Smith ve ark., 1969; Tükel ve Doğan, 2000; Gündoğan ve ark., 2005).

#### **2.2.4.5.4. Lesitinaz (Fosfolipaz C)**

Bu enzim, daha çok yumurta sarısı ve insan serumunda yer alan lipoproteini ayrıştırır. *S. aureus* 'un en önemli dört özelliği lesitinaz, termonükleaz, koagulaz aktivitesi ve enterotoksin üretimidir. Lesitinaz aktivitesi, yumurta sarısının emülsiyon şeklinde eklendiği besiyerinde *S.*

*aureus* 'un identifikasyonunu kolaylaştırır. Besiyerinde ortaya çıkan lesitinaz, yumurta sarısı emülsiyonundaki lesitini parçalayarak bakteri kolonisinin çevresinde şeffaf bir son oluşturur. Ancak etrafında zon bulunmayan atipik koloni oluşturan *S. aureus* suşları da üreyebilmektedir. Örnek verilecek olursa Baird Parker Agar'da üzüm salkımı şeklinde siyah koloniler oluşturan, fakat lesitinaz aktivitesi göstermediği için zon oluşturmeyen, mukoid yapıda ve enterotoksin H sentezleyen *S. aureus* suşları da izole edilmiştir (Tükel ve Doğan, 2000).

#### **2.2.4.5.5. Lipaz**

Lipaz, *S. aureus* 'un bütün suşları ve Koagulaz Negatif Stafilocoklar'ın ise yaklaşık %30'u tarafından sentezlenir (Cauwelier ve ark., 2004). Bu enzim, organizmada lipid içeren bölgelerde yağları parçalayarak stafilocokların yaşamını sürdürmesini sağlar, aynı zamanda vücut yüzeyindeki dokulara yerleşerek frunkül ve karbonkül infeksiyonlarına neden olur (Tünger, 2004). Lipaz, ekstraselüler bir enzimdir ve logaritmik üreme fazı süresince sentezlenmektedir, ayrıca birçok stafilocok türünün patojenitesinin artmasına yol açmasının yanında plazma ve yağ dokularında etkisini göstererek vücutta hastalık etkeninin yayılmasını sağlar (Sandel ve McKillip, 2004).

#### **2.2.4.5.6. Hyaluronidaz**

Hyaluronidaz enzimi *S. aureus* suşlarının büyük çoğunluğu tarafından üretilir ve çoğunlukla bağ dokudaki hücrelerin bütünlüğünü sağlayan hyaluronik aside etki ederek onu hidrolize uğrattır. Bu şekilde, etken doku içinde çok geniş bir bölgeye yayılma özelliği kazandığı için, yayılma faktörü, olarak da isimlendirilmektedir (Sandel ve McKillip, 2004; Koçak Kızanlık, 2019; Hart ve ark., 2009).

#### **2.2.4.5.7. Stafilokinaz (Fibrinolizin)**

Streptokokların gösterdiği fibrinolitik etkiyi stafilocoklar da benzer şekilde göstermektedir. Stafilocokların ortaya çıkardığı kinazların etkisiyle plazma içerisindeki plazminojen aktive olur ve sonuç olarak plazmin ortaya çıkar (Bilgehan, 2000). Bakteri fibrini eriten proteolitik özellikteki plazmin maddesinin etkisi ile dokular içerisinde yayılım gösterir (Atlı, 2007).

#### 2.2.4.5.8. Beta laktamaz (Penisilinaz)

Tedavide kullanılmaya başlandığında stafilokokların nerdeyse tamamı penisiline duyarlılık gösterdikleri halde, son zamanlarda bu duyarlılığın %5 ve altına indiği bildirilmektedir. Stafilokokların penisiline karşı direnç oluşturmalarına yol açan penisilinaz enzimi kendisini üreten bakteriler tarafından penisilin ve türevlerinin beta laktam halkasında bulunan amid bağlarını hidrolizasyona uğratarak penisiloik asite parçalarlar. Penisilinaz kodlayan gen bölgeleri, plazmidler üzerinde yer aldığından, ortamdaki farklı mikroorganizmalar arasında hızlı bir biçimde aktarılarak yayılma özelliği gösterirler (Bilgehan, 2000; Tünger, 2004).

#### 2.2.4.5.9. Termonukleaz (TNaz)

*S. aureus* izolatlarının tamamı endo ve ekzo nukleolitik niteliklere sahip olup, DNA ve RNA'yı parçalayabilme özelliğindeki ısıya dirençli bir enzim olan termonukleazı sentezlerler. *S. aureus* izolatlarının teşhis edilmesinde termonükleazın üretilmesi bir doğrulayıcılık testi olarak kullanılır (Bergdoll, 1989; Bannerman, 2003). TNaz 100°C'de 1 saat kaynatıldıktan sonra bile enzimatik özelliğini koruduğu için ısıya karşı direnci çok yüksek bir enzimdir (Brakstad ve ark., 1992; Sandel ve McKillip, 2004; Tang ve ark., 2011).

#### 2.2.4.6. Toksinler

*S. aureus*'un sentezlediği birçok toksin, immun sistemi etkileyerek immun yanıtın oluşumunu engeller. Bu toksinler, enfeksiyon bölgesindeki hücrelere etki ederek etkenin gelişimi için besin maddeleri sağlamalarının yanında etkenin konakçı hücrelere bağlanması ve enfeksiyonun geniş alanlara yayılmasında da rol oynarlar. *S. aureus*'ların bazı suşları, hemolizinler, stafilokokal enterotoksinler (SE), Toksik Şok Sendromu Toksin-1, Panton Valentine Lökosidin gibi toksinlerden herhangi birini yada birden fazlasını aynı dönemde sentezleyebilirler (Dinges ve ark., 2000; Huseby ve ark., 2007). Toksinler, agr (accessory gene regulator) bölgesi başta olmak üzere, farklı düzenleyici faktörler aracılığıyla sentezlenmektedir. Yüzey proteinleri hücrelerde çoğunlukla logaritmik fazda üretilmesine rağmen, toksinleri de içeren ekzoproteinlerin birçoğu logaritmik fazın sonu ya da erken durgunluk fazında sentezlenir. Enfeksiyonun ilk aşamalarında, yüzey proteinleri ekstraselüler

matriks proteinleri ile birleşerek bakterinin dokulara bağlanmasını sağladığı sırada ekzoproteinler ile de hastalık etkeni çevre dokulara yayılır (Seo ve Bohach, 2012).

#### **2.2.4.6.1. Sitolitik Toksinler**

Stafilokokların çok miktarda ekstrasellüler toksin üretmesi ve bunların da konak hücre morfolojisini ve/veya fonksiyonunu etkilemesi mümkündür. Stafilokoklar bu toksinleri sayesinde yoğun inflamatuvar yanıt oluşan bölgelerde gelişimlerini sürdürebilirler. Hemolizin ve Lökosidin bunlar arasından en fazla öne çıkanlardır (Biçer, 2009). *S. aureus*'un ürettiği sitolitik toksinler lize ettiği hücrelere göre adlandırılırlar. Kırmızı kan hücrelerini lizise uğratanlar hemolizin, beyaz kan hücrelerini lizise uğratanlar ise lökotoxin olarak isimlendirilmiştir (Otto, 2014).

##### **2.2.4.6.1.1. Hemolizinler**

Hemolizinler arasındaki fark, onların toksisite düzeylerine, hemoliz işlemi için ihtiyaç duydukları ısı derecesine ve zamanına, aynı zamanda da hayvan eritrositleri üzerinde litik etki oluşturup oluşturmamalarına bağlı olarak değişkenlik gösterir. Bu özelliklere göre hemolizinler dört gruba ayrılır (Biçer, 2009).

##### **2.2.4.6.1.1.1. Alfa Hemolizin (Alfa Toksin)**

Alfa Hemolizin, 33 kDa ağırlığında olan ve hücre membranlarını hasara uğratan en etkili proteindir. *S. aureus* suşları için ana hemolizindir. Kodlandığı yer, bakteriyel kromozomlar ve plazmidlerdir. Hemolitik aktivite bakımından tavşan eritrositlerinde oldukça etkilidir. Bu protein monositlere etki etmez ancak insanda bulunan makrofaj ve trombosit hücre membranlarına karşı litik bir etki oluşturur. Sitolitik, hemolitik ve dermonekrotik olarak etki gösterir (Biçer, 2009).

##### **2.2.4.6.1.1.2. Beta Hemolizin (Beta Toksin)**

Beta hemolizin, molekül ağırlığı 35 kDa olup, yağ bakımından zengin hücre membranlarını yıkıma uğratan ve sfingomiyelin üzerine etkisini göstererek kırmızı kan hücreleri olan eritrositleri parçalayan enzimatik özellikteki bir toksindir. Koyun eritrositlerini,

insan ve tavşan eritrositlerinden daha fazla yıkıma uğrattır (Bilgehan, 2000; Dinges ve ark., 2000). Alfa ve Beta hemolizin insanlarda hastalık yapan *S. aureus*' lar tarafından en sık üretilen sitolitik toksinlerdir (Dinges ve ark., 2000).

#### **2.2.4.6.1.1.3. Gama Hemolizin (Gama Toksin)**

Gama toksin ( $\gamma$ -toksin), polipeptit yapıda, 32 kDa molekül ağırlığında ve *S. aureus* 'ların birçoğu tarafından üretilen bir toksindir. Bu toksin, hemolitik ve lökotosik aktivitesi aracılığıyla, nötrofil ve makrofajları etkileyerek birçok memeli eritrositlerini hemolize eder. (Dinges ve ark., 2000; Huseby ve ark., 2007). İnsan, tavşan ve koyun eritrositleri bu toksine duyarlı olmasına rağmen, at ve kuş eritrositleri direnç gösterir (Cengiz, 1999). Her ne kadar nasıl etkilediği bilinmese de stafilokok kaynaklı kemik infeksiyonlarında bu toksine karşı kanda oluşan antikor düzeyindeki yükseklik stafilokokal hastalıklar ile bu toksin arasındaki bağlantıya işaret etmektedir (Bilgehan, 2000).

#### **2.2.4.6.1.1.4. Delta Hemolizin (Delta Toksin)**

Delta hemolizin ( $\delta$ -toksin), polipeptit yapıda, 103 kDa molekül ağırlığına sahip ve hücre membranlarında porlar oluşturan bir toksindir. Delta toksinin geniş bir sitolitik aktivitesi olmasına rağmen etkinlikleri diğer sitolitik toksinlerin düzeyinde değildir, fakat birçok *S. aureus* suşu bu toksini sentezler. Bu toksin, eritrositler, memeli hücreleri ve diğer hücre organelleri yanında, subselüler yapılarında parçalayabilmektedir (Dinges ve ark., 2000). Ayrıyeten, son zamanlarda yapılan çalışmalarda, bu toksinin mast hücre degranülasyonunu tetikleyerek atopik dermatite yol açtığı bildirilmiştir (Otto, 2014). Delta toksinlerin antijenik özelliği yoktur, ayrıca alfa ve beta toksine göre immünolojik yönden farklıdırlar. Bu toksinler koyun, maymun ve tavşan eritrositlerinin yanında insan eritrositlerini de parçalarlar. Ayrıca makrofaj, lökosit, lenfosit ve trombositlere de hasar verirler (Cengiz, 1999).

#### **2.2.4.6.1.2. Lökosidin (Panton-Valentine Lökosidin)**

Panton Valentine Lökosidin, yalnız insan ve tavşanların polimorf çekirdekli lökositleriyle makrofajlarına etki ederek onları parçalarken diğer hücrelere herhangi bir etkisi bulunmamaktadır. Patojen özellikteki stafilokokların büyük bir çoğunluğu tarafından sentezlenen bu toksin, sitotoksik özellikte olmasına rağmen, diğer toksinlerden farklı olarak

hemolitik etki göstermemektedir (Dinges ve ark., 2000). Virulansta önemi büyük olan F (Fast) ve S (Slow) diye tanımlanan ve elektroforetik olarak birbirinden ayrılan iki adet antijenik özellikteki protein komponenti bu toksini meydana getirmektedir. Bu komponentler lökositleri tahrip edip fagositozun gerçekleşmesini engelleyerek patojeniteyi artırırlar. Tek başlarına hareket ettiklerinde bu bileşenler lökositler üzerinde herhangi bir etki oluşturamazlar ama birbirlerine bağlandıklarında lökositlerin hücre membranlarında geçirgenliği arttırarak lökositlerin şişip yuvarlak ve granüler bir form haline gelmesine, hareket yeteneğini kaybetmesine ve sonrasında da yavaşça parçalanmasına neden olurlar (Bilgehan, 2000; Bhatia ve Zahoor, 2007).

Nekrotik doku lezyonlu infeksiyonların oluşmasında lökositinin büyük bir etkisinin olduğu öngörülmektedir. Bu toksini, *S. aureus*'ların %2'si sentezler ama ağır seyreden dermonekrotik dokulardaki lezyonlardan elde edilen izolatlarda %90 oranında bulunmaktadır (Dinges ve ark., 2000). Çeşitli çalışmalarda, bu toksinin primer cilt apseleri, frunküloz, ciddi deri infeksiyonları ile çoğunlukla çocuk ve gençlerde ortaya çıkan nekrotizan pnömoni gibi hastalıklara yol açtığı bildirilmiştir. Yüksek ateş, lökopeni, pleural efüzyon, sepsis ve ölümlerle seyreden nekrotizan pnömonilerde, lökositin pozitif *S. aureus* sıklıkla karşılaşılan bir infeksiyon etkenidir. Mortalite oranının çok yüksek olduğu *S. aureus* pnömonisinin bu çeşidi hızla ilerleme eğilimindedir. Akciğerlerde oluşan yangılı ve nekrotik bir görünüm sebebiyle bu türdeki pnömoniler *S. aureus* kaynaklı hemorajik nekrotizan pnömoni olarak adlandırılmıştır (Kaneko ve Kamio, 2004; Boyle-Vavra ve Daum, 2007; Holzinger ve ark., 2012).

#### 2.2.4.6.2. Süperantijenler

*S. aureus* tarafından sentezi yapılan süperantijenler, diğer ekzoproteinlerde olduğu gibi geç logaritmik dönemde daha fazla oranda üretilir. Bu toksinleri sentezleyen gen bölgeleri plazmidler, bakteriyofajlar veya heterolog genetik elementler vasıtasıyla taşınırlar. Eksfoliyatif toksin, toksik şok sendromu toksini (TSST-1), enterotoksinler ve enterotoksin benzeri toksinler *S. aureus*'un süperantijenik yapılarıdır (Seo ve Bohach, 2012).

### 2.2.4.6.2.1. Eksfoliyatif Toksin

Eksfoliatin veya epidermolitik toksin, eksfoliyatif toksinin bilinen diğer adlarıdır. İnsanlarda veziküler ve eksfoliyatif deri lezyonlarından sorumlu toksindir. Genellikle 5 yaşın altındaki küçük çocuklarda ortaya çıkan ve Staphylococcal Scalded Skin Syndrome (Soyulmuş Deri Sendromu) adı verilen bu enfeksiyonda deride bulunan stratum granulosum katmanında değişik düzeylerde oluşan hasarlar sonucu deride soyulmalar ve epidermiste nekroze olmuş bölgeler görülür. (İnal M., 2014). Antijenik ve yapısal farklılıklarına bakılarak 4 serotipe ayrılmış olan bu toksin, *S. aureus*'lar tarafından sentezlenir. İnsanlardaki enfeksiyonlardan genellikle ETA (Eksfoliyatif Toksin A), ETB (Eksfoliyatif Toksin B) ve ETD (Eksfoliyatif Toksin D) sorumlu tutulmuştur (Mariutti ve ark., 2017).

SSSS (Staphylococcal Scalded Skin Syndrome) vakalarında ETA ve ETB en çok izole edilen serotiplerdir. ETA kromozom ve ETB ise plazmid bağlantılı gen bölgeleri aracılığıyla sentezlenir. Bu toksinlerin proteaz ve esteraz enzimatik özellikleri vasıtasıyla derinin yapısal bütünlüğünü yıkıma uğratma özellikleri bulunmaktadır. Süperantijenik yapıda olan ve proteinlere karşı litik özellik gösteren bu toksinler immünolojik yapı ve biyokimyasal özellikler açısından birbirlerinden ayrılırlar (Koneman ve ark., 1997). Fakat, bu iki toksin de aynı şekilde etki ederler ve deride bulunan stratum granulosum tabakasındaki interselüler yapıları parçalayarak epidermin yapısal bütünlüğünü bozarlar (Takagi, 1990). Genellikle T lenfositlere karşı mitojen etki gösteren ve derideki hücrelere karşı litik özellikleriyle nekrotik alanlar oluşturan bu toksinler, yangısal yanıt oluşturmazlar ve primer neden olarak hücrelerin ölümüne yol açmazlar (Koneman ve ark., 1997; Bilgehan, 2000).

ETC, ilk olarak bir attaki deri enfeksiyonundan izole edilmiştir ve insanlardaki enfeksiyonlarla bağlantısı yoktur. Isıya duyarlı bir toksin olan ETC, fare yavruları ve civcivlerde epidermin iç kısımlarında lezyonlar, deride kabuklanma ve döküntüler oluşturur. ETD'nin SSSS ile arasında bir bağlantı yoktur, bu toksin vücuttaki epitel yapıyı bozarak *S. aureus*'un dokularda daha geniş alanlara yayılımını sağlar ve aynı zamanda %40 oranında ETA, %59 oranında ETB ve %13 oranında ETC ile genetik yapı yönünden benzerlik gösterir. (Ladhani, 2003; Müştak ve Esendal, 2008; Bukowski ve ark., 2010; Mariutti ve ark., 2017).

#### 2.2.4.6.2.2. Toksik Şok Sendromu Toksini (TSST-1)

Bu toksin ilk olarak 1978 yılında bildirilmiş ve toksik şok sendromu vakası izlenen infekte kişilerden izolasyonu yapılan Stafilocoklar tarafından sentezlendiği ileri sürülmüştür. Daha sonra 1981 senesinde maymunlarla yapılan araştırmalarda emetik özelliği olduğu görülmüş ve bu yüzden adı Stafilocokal Enterotoksin F olarak değiştirilmiştir. 1983 senesinde gerçekleştirilen deneylerde tavşanlarda vücut ısısını arttırarak ateş oluşturduğu görüldüğünden Pirojenik Ekzotoksin C olarak isimlendirilmiştir. 1984 yılına gelindiğinde ise kusma aktivitesi için gerekli olan sistein aminoasit yapısını içermemesinden dolayı emetik özelliğinin olmadığı, maymunlarla yapılan ilk araştırmada görülen emetik aktivitenin SEA'dan ileri geldiği öne sürülmüştür. Bu yüzden tekrar isim değişikliğine gidilmiş ve bugünkü ismi olan TSST-1 adını almıştır (Bergdoll ve ark., 1981; Dinges ve ark., 2000; Spaulding ve ark., 2013).

TSST-1, kromozomal yapılı, süperantijen özelliği olan, ısıya karşı dirençli, protein yapısının parçalanmasına karşı dayanıklı, tek polipeptid yapısında olan, 22 kDA moleküler ağırlığında bir ekzotoksindir. Bu toksin yüksek miktarda hidrofobik karakterde aminoasitler içermesine karşın sudaki çözünürlüğü daha fazladır (Dinges ve ark., 2000). TSST-1 aynı zamanda konakçıda T lenfosit artışına ve monositlerden interleukin-1 salınımına neden olmaktadır (Koçak Kızanlık, 2019). Bu toksinin yol açtığı Toksik Şok Sendromu (TSS), deride yaygın kızarıklık ve deri döküntüleri, yüksek ateş, tansiyon düşüklüğü, ve çoklu organ yetmezliği şeklinde ortaya çıkar. Ortaya çıkan şok tablosunun, yumuşak doku enfeksiyonları, ciddi infekte yanıklar, doğum sonrası enfeksiyonlar ve pnömoni ile de bağlantılı olabileceği bildirilmektedir (Silversides ve ark., 2010).

#### 2.2.4.6.2.3. Enterotoksinler

1914 senesinde, Barber tarafından, stafilocok kaynaklı mastitisi olan inek sütünün tüketilmesi sonucu gelişen gastroenterit vakası raporlanmıştır. Sonrasında ise Dack 1930 senesinde, besin kaynaklı zehirlenme olgularının enterotoksijenik stafilocokların ağız yoluyla vücuda alınması neticesinde gerçekleştiğini bildirmiştir (Cengiz, 1999). *S. aureus* başta olmak üzere stafilocokların ürettiği söz konusu bu toksinler *S. epidermidis*, *S. intermedius*, *S. hyicus* ve *S. xylosus* gibi diğer stafilocok türleri tarafından da sentezlenebilmektedir. *S. aureus*'un enfeksiyon oluşturma açısından temel virulans faktörleri Stafilocokal Enterotoksin (SE) ve Stafilocokal enterotoksin benzeri toksin (staphylococcal enterotoxin like toxin-SEI) olarak

bilinmektedir. Enterotoksinler ve enterotoksin benzeri toksinler 19-29 kDa gibi düşük bir molekül ağırlığına sahip, suda çözünen, glikolizasyon özelliği göstermeyen, 168-261 aminoasitten oluşan, tek zincirli ve globuler özellikte protein yapısındaki elementlerdir. *S. aureus* tarafından sentezlenen enterotoksinler, mikroorganizmanın tüm gelişme evreleri boyunca bakteri tarafından oluşturulabilmesine karşın, genellikle logaritmik dönemin ortalarına veya son kısımlarına doğru daha fazla oranda üretilir (Balaban ve Rasooly, 2000; Bhatia ve Zahoor, 2007; Argudin ve ark., 2010; Hu ve Nakane, 2014; Fisher ve ark., 2018).

Enterotoksinlerin izoelektrik noktaları 7-8,6 arasındadır. Lizin, aspartik asit, glutamik asit ve tirozin temel yapıtaşlarını oluşturur. Enterotoksinlerin yüksek ısıya dirençli olmaları (100°C ısıya 30 dakika kadar dayanabilirler), düşük pH değerlerinde bile aktifliklerini koruyabilmeleri ve pepsin, tripsin gibi proteinleri parçalayan enzimlere karşı dirençli olmaları, onları gıda kaynaklı toksikasyonların en önemli sebeplerinden biri haline getirmiştir. Isıtma işlemiyle tahribata uğrasalar bile uzun süreli saklama koşullarında tekrar aktif hale gelebilirler. Enterotoksin tipi, gıda maddesinin türü, pH değeri ve tuz konsantrasyonları enterotoksinlerin ısıya karşı oluşturacakları direnci belirler. SEB'nin ısıtmaya karşı en dayanıklı toksin olduğu belirtilmektedir. Genellikle gıda içerisindeki enterotoksijenik *S. aureus* sayısı  $10^6$  kob/g veya kob/ml civarında olması toksin oluşması için yeterli görülmektedir. (Muratoğlu, 2010).

Enterotoksinlerin birbirlerinden ayrımı antikorlara verdikleri immun cevaplara göre olmaktadır (Cengiz, 1999). Stafilokokal Enterotoksinler, kimyasal ve antijenik nitelikleri baz alınarak alfabetik sıraya göre isimlendirilirler ve emetik özellik gösterirler. Bu toksinlerin, SEA, SEB, SEC, SED, SEE olmak üzere beş ana serotipi vardır. Fakat son zamanlarda, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SEU olarak adlandırılan yeni serotiplerin de bulunduğu bildirilmektedir. Bunların yanında yeni gen bölgelerinin belirlenmesiyle SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SEU serotipleri de enterotoksinler arasına eklenmiştir (Ljevaković-Musladin ve ark., 2022). SEA ile SEU arasında birçok Stafilokokal Enterotoksin tipi serolojik özelliklerine göre tiplendirilip isimlendirilmiştir (Lamprell ve ark., 2004; Ljevaković-Musladin ve ark., 2022). Geçmişten günümüze, 24 ayrı SE ve SEI tiplendirilmiştir. Tiplendirmede esas olarak deney hayvanlarında emetik özellik gösterme göz önünde bulundurulsa da, süperantijenik nitelikte olma, sindirimi sağlayan enzimlere ve ısıya karşı dayanıklı olma ve yapısal özelliklerdeki benzerlikler de dikkate alınır. Herhangi bir toksini Stafilokokal Enterotoksin (SE) olarak

adlandırmak için maymun, fare v.b. gibi primatlara oral olarak veya intraperitoneal yolla verildiğinde kusturucu bir etkinin (emetik faaliyet) görülmesi gereklidir. Sadece yapı olarak benzerlik varsa ve deneylerde emetik faaliyet görülmemişse bu toksinler SEI şeklinde isimlendirilirler (Hennekinne ve ark., 2010; Hu ve Nakane, 2014; Benkerroum, 2018; Fisher ve ark., 2018; Ljevaković-Musladin ve ark., 2022).

Enterotoksin gen bölgeleri açısından incelendiğinde *sea* ve *see*'nin bakteriyofajlar, *sec*'nin patojenite adaları, *sed*'nin plazmidler ve *seb*'nin kromozom, patojenite adaları ve plazmidler vasıtasıyla taşındığı belirtilmektedir. Sonradan eklenen yeni serotiplerden *selx* ve *sely* kromozom aracılığıyla taşınır. *selx* geni, *S. aureus* suşlarının yaklaşık %95'inde bulunabilirken, *sely* daha az sıklıkla görülür ve şimdiye kadar sadece birkaç suшта tespit edilmiştir. Enterotoksin genleri bazen tek başlarına bulunurlar, ancak daha yaygın olarak gruplar halinde, mobil genetik elementler (MGE) olarak adlandırılan çeşitli büyük mobil DNA segmentlerinde bulunurlar. Bu MGE'ler, profajları, plazmitleri, transpozonları, *S. aureus* patojenite adalarını (SaPI) ve enterotoksin gen kümelerini içerir. Enterotoksin gen kümeleri (*egc*), SEG, SEI, SEM, SEN, SEO ve iki psödogeni kodlayan genlere ev sahipliği yapar. Bu küme içindeki silme, çoğaltma ve yeniden birleştirme olayları, onu yeni SE türleri ve varyantlarının oluşturulması için önemli bir merkez haline getirir. MGE'ler, genellikle genom boyutu ve yapısında çarpıcı farklılıklara neden olarak çekirdek genomlar üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Kommensal, klinik ve gıda zehirlenmesi izolatları dahil olmak üzere *S. aureus* izolatlarının yaklaşık %80'i ortalama 5-6 SE genini bir arada taşır (Fisher ve ark., 2018).

Gıdalardaki enterotoksijenik *S. aureus* seviyesi  $10^6$  kob'a eşit veya  $>10^6$  kob/g seviyesinde ise yeterli miktarda toksin oluştuğu söylenebilir. Suş tipi, gıdanın bileşimi, sıcaklık, diğer fiziksel ve kimyasal parametrelerin yanısıra inhibitörlerin mevcudiyeti toksin oluşumunda öne çıkan sebepler olarak görülmektedir. A tipi toksin stafilokokal intoksikasyonların yaklaşık %80'ini oluşturur ve bunu da SEB ve SED tipleri takip eder. Genellikle A, B ve C tipleri ağırlıklı olarak insanlardan, B tipi yumurta ve balıktan, C tipi sığır ve koyunlardan, D tipi ise kanatlılardan elde edilen suşlarda rastlanılmaktadır. A ve D tipinin neden olduğu intoksikasyonlara daha sık rastlanmasının nedeni, bu tiplerin temel kaynağının insan olması, logaritmik üreme döneminde birincil metabolit olarak ortaya çıkmaları, ayrıca A tipi toksinin çevre şartlarının olumsuz olması halinde bile üretilebilmesinden kaynaklanmaktadır. Fakat SEB ve SEC ise ikincil metabolit olarak

oluştuklarından dolayı ancak logaritmik fazın sonlarına doğru üretilebilmektedirler, normal şartlarda da bunun 20 saatten daha az bir inkübasyon süresi içinde meydana gelemediği bildirilmektedir (Erol, 2007). Klasik enterotoksinler stafilokok kaynaklı gıda zehirlenmesi vakalarının %95 gibi büyük bir kısmından sorumludur. (Kwon ve ark., 2004). Sonradan tiplendirilen enterotoksinlerin intoksikasyonlardaki rolleri ise bazılarının emetik özellikte olmamaları ve bazılarının da hala testlerinin devam etmesi nedeniyle net değildir (Lina ve ark., 2004; Vernozy –Rozand ve ark., 2004; Fisher ve ark., 2018; Ljevaković-Musladin ve ark., 2022).

**Tablo 2.2.** Stafilokokal enterotoksinlerin genetik yapısı ile emetik ve süperantijenik aktiviteleri (Fisher ve ark. 2018)

Enterotoksin	Genetik element	Süperantijenik aktivite	Emetik Aktivite		Tip	Filogenetik grup
			Maymun	Fare		
SEA	Profaj	Evet	Evet	Evet	Klasik	SEA
SEB	Kromozom, SaPI, Plazmid (pZA10)	Evet	Evet	Evet	Klasik	SEB
SEC1	SaPI	Evet	Evet	Evet	Klasik	SEB
SEC2	SaPI	Evet	Evet	Evet	Klasik	SEB
SEC3	SaPI	Evet	Evet	Görülmedi	Klasik	SEB
SED	Plazmid (pIB485)	Evet	Evet	Evet	Klasik	SEA
SEE	Profaj	Evet	Evet	Evet	Klasik	SEA
SEG	<i>egc1, egc2, egc3, egc4</i>	Evet	Evet	Evet	Yeni	SEB
SEH	Transpozon (MGEmw2/mssa476 <i>seh/Dseo</i> )	Evet	Evet	Evet	Yeni	SEA
SEI	<i>egc1, egc2, egc3</i>	Evet	<100 µg/kg	Evet	Yeni	SEI
SEJ	Plazmid (pIB485, pF5)	Evet	Görülmedi	Görülmedi	Yeni	SEA
SEK	Profajlar, SaPI1, SaPI3, SaPI5, SAPIbov1	Evet	Evet	Evet	Yeni	SEI
SEL	Profajlar, SaPIin1, SaPIin1, SaPIinw2, SAPIbov1	Evet	Evet	Evet	Yeni	SEI

SEM	<i>egc1, egc2</i>	Evet	Evet	Evet	Yeni	SEI
SEN	<i>egc1, egc2, egc3, egc4</i>	Evet	Evet	Evet	Yeni	SEA
SEO	<i>egc1, egc2, egc3, egc4, Transpozon</i>	Evet	Evet	Evet	Yeni	SEA
SEP	Profaj (Sa3n)	Evet	Evet	Evet	Yeni	SEA
SEQ	Profaj, SaPI1, SaPI3, SaPI5	Evet	Evet	Evet	Yeni	SEI
SER	Plazmid (pIB485, pF5)	Evet	<100 µg/kg	<100	Yeni	SEB
SES	Plazmid (pF5)	Evet	<100 µg/kg	<100	Yeni	SEA
SET	Plazmid (pF5)	Evet	<100 µg/kg	<100	Yeni	SE/X
SEU	<i>egc2, egc3</i>	Evet	Görülmedi	Görülmedi	Yeni	SEB
SE/W (SE/U2)	<i>egc4</i>	Evet	Görülmedi	Görülmedi	Yeni	SEB
SEV	<i>egc4</i>	Evet	Görülmedi	Görülmedi	Yeni	SEI
SE/X	Kromozom	Evet	Görülmedi	Görülmedi	Yeni	SE/X
SE/Y	Kromozom	Test aşamasında	Görülmedi	Evet	Yeni	SE/X

**SaPI:** *Staphylococcus aureus* Pathogenicity Islands (*Staphylococcus aureus* Patojenite Adaları), **egc:** enterotoxin gene cluster (enterotoksin gen kümesi), **MGE:** Mobile Genetic Element (Mobil Genetik Element)

#### 2.2.4.6.2.3.1. Stafilokokal Enterotoksin A (SEA)

SEA'nın molekül ağırlığı 27 kDa olup, diğer enterotoksinlerden farklı olarak logaritmik fazın başlangıç aşamasında da üretilmekte ve ortam şartları elverişli olmasa bile toksisite oluşturabilecek seviyeye erişebilmektedir. Bu yüzden gıda kaynaklı zehirlenmelerin büyük orandaki sebebinin bu toksin olduğu ileri sürülmektedir. Bu toksini *sea* geni kodlar ve bu gen 771 baz çiftinden meydana gelmektedir. 20 ila 100 ng aralığındaki SEA toksik bir etki oluşturur. Bakteriyofajlar aracılığıyla taşınan *sea* gen bölgesinin birbirleri arasındaki nakil işlemi kromozomlar vasıtasıyla gerçekleşir (Erol ve İşeri, 2004; Seo ve Bohach, 2012; Xu ve ark., 2016).

#### 2.2.4.6.2.3.2. Stafilokokal Enterotoksin B (SEB)

Klinik izolatlardan izole edilen *S. aureus*'lardaki *seb* gen bölgesi, kromozomal özellikte olmasına karşın diğer bakteri suşlarında patojenite adaları veya 750 bp uzunluğundaki bir plazmid aracılığıyla taşınır. SEB'yi oluşturacak olan öncü proteinler, 31400 Da molekül ağırlığında ve 267 aminoasit dizisinden oluşurlar. SEB sentezi çoğunlukla logaritmik fazın son aşamalarında tamamlanır. SEB, ısıtmaya ve protein parçalayan enzimlere karşı dayanıklı olup, pH değerindeki değişikliklerden de çok fazla etkilenmez. Fakat ısının düşmesi ve tuz yoğunluğunun artması SEB üretimini baskı altına almaktadır. Diğer enterotoksinlerle

kıyaslandığında toksik etkisi en kuvvetli olan toksindir. Konsantrasyon açısından çok düşük miktarlarda vücuda alınsa bile gıda zehirlenmeleri oluşturmasının yanında egzema gibi cilt hastalıklarına, solunum güçlükleriyle seyreden astım gibi rahatsızlıklara ve ileri aşamalarda çoklu organ yetmezlikleri ve ölüme kadar giden ciddi sonuçlara yol açabilmektedir (Balaban ve Rasooly, 2000; Erol ve İşeri, 2004; Müştak ve Esendal, 2008; Xu ve ark., 2016).

#### **2.2.4.6.2.3.3. Stafilokokal Enterotoksin C (SEC)**

Bu toksinin antijenik olarak birbirlerinden ayrılan 3 farklı alt tipi bulunmaktadır ve bunlar SEC1, SEC2 ve SEC3 olarak isimlendirilirler. Tüm SEC'ler 801 bp uzunluğunda ve 267 aminoasitten oluşan öncü (prekürsör) proteinleri kodlayan ve kromozomlardaki patojenite adaları tarafından taşınan *sec* geni tarafından sentezlenirler. SEC1 ve SEC2 arasındaki benzerlik oranının %97, SEC1 ve SEC3 arasındaki benzerlik oranının %97,9 iken SEC2 ve SEC3 arasındaki benzerlik oranının ise %98 olduğu bildirilmiştir. SEC üretiminin tamamlanması da ileri logaritmik fazda olmaktadır. *S. aureus* tarafından üretilen SEC'ye çoğunlukla süt ve süt mamüllerinde rastlanmasına rağmen peynirlerde daha az oranda SEC tespit edildiği bildirilmektedir (Balaban ve Rasooly, 2000; Erol ve İşeri, 2004; Seo ve Bohach, 2012; Xu ve ark., 2016).

#### **2.2.4.6.2.3.4. Stafilokokal Enterotoksin D (SED)**

Gıda kaynaklı zehirlenme vakalarında SEA'nın ardından en fazla izolasyonu yapılan ikinci toksindir. SED sentezinden sorumlu *sed* geni penisilinaz plazmidi tarafından taşınır. *sed* gen bölgesi aracılığıyla üretilen SED, 26,360 Dalton moleküler ağırlığa sahip, 228 aminoasitten oluşan ve moleküler yapı bakımından diğer stafilokokal enterotoksinler (SE) ile yüksek oranda benzeştikleri belirtilen bir toksindir. SED, logaritmik dönemde de üretilebilmesine rağmen logaritmik dönemden sonraki durağan döneme geçiş aşamasındaki üretimi en yüksek mertebeye ulaşmaktadır. Aynı zamanda tuz konsantrasyonundaki yoğunluğun, SED üretimini inhibisyona uğraticı bir etki gösterdiği belirtilmektedir. (Balaban ve Rasooly, 2000; Seo ve Bohach, 2012; Xu ve ark., 2016).

#### 2.2.4.6.2.3.5. Stafilokokal Enterotoksin E (SEE)

Moleküler ağırlığı 26 kDa olan SEE, bakteriyofajlar vasıtasıyla taşınan ve 771 bp uzunluğunda olan *see* geni tarafından sentezlenmektedir. SEE, SEA ve SED ile genetik yapı olarak benzerlik göstermektedir. Diğer klasik enterotoksinlerle kıyaslandığında, SEE kaynaklı gıda zehirlenme vakalarına daha az oranda rastlanıldığı bildirilmektedir (Erol ve İşeri, 2004; Xu ve ark., 2016; Fisher ve ark., 2018).

### 2.3. Patogenez

Stafilokokal kaynaklı gıda zehirlenmeleri birincil derecede ve yaygın bir şekilde kusmaya yol açar. Emetik yanıt, toksinlerin bağırsaklardaki lokal sinir uçlarını uyarması ve sinirsel impulsların beyindeki subkortikal kusma merkezi isimli bölgeye aktarılması sonucu gerçekleşir (Sutherland ve Varnam, 2002). Stafilokok kaynaklı gıda zehirlenmelerinde kusmadan sonraki en önemli ve yaygın semptomun ishal olduğu bildirilmektedir. Bağırsak epitel hücrelerini hasara uğratan enterotoksinler, bağırsak mukozasında yer alan vili adındaki küçük uzantıları parçalarlar. Stafilokokal enterotoksinlerin kolera toksini veya *E. coli* enterotoksinlerinden farklı olmalarının temel nedeni, intestinal hücreler üzerine direkt etkilerinin bulunmamasıdır (Sutherland ve Varnam, 2002).

Zehirlenme olgularında daha az görülen belirtiler ise, baş ağrısı, genel bitkinlik, zayıf nabız, solunum güçlüğü ve şok olarak tanımlanabilir (Jorgensen ve ark., 2005). Genellikle vücut sıcaklığı normal değerlerin altındadır ve gereğinden fazla su kaybı oluşur. Ağır durumlarda dışkı ve kusmakta kan görülebilir. Enterotoksin zehirlenmelerinde görülen diğer semptomlar abdominal kramplar, terleme, sıtma, bitkinlik ve koma halidir (Gülbandılar, 2015; Bendahou ve ark., 2008).

Stafilokokal enterotoksinlerin etkileri kişilere göre değişkenlik gösterir. Bir popülasyonda aynı oranda toksine maruz kalanların bir kısmında herhangi bir hastalık belirtisi görülmezken, diğer bir kısmında ise hafif seyirli ya da daha ağır seyreden semptomlar ortaya çıkabilir. Risk grubunda olan kronik hastalar ile bebek ve yaşlılarda çok az oranda toksikasyona maruz kalma bile ciddi sağlık sorunlarına yol açabilmektedir. Stafilokok kaynaklı zehirlenmelerde çoğunlukla ölüm riski yoktur. Fakat, bazı vakaların ölüm ile sonuçlandığı da görülmüştür (Ellis ve ark., 2003; İşeri ve Erol, 2009).

SE'ler çocuklarda ve yaşlılarda nadiren ölüme sebep olmaktadır (Berdgoll ve Lee Wong, 2006). Ölüm oranlarının çocuk ve yaşlılarda %0.03 ile %4,4 aralığında değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir. İnsanlar, kediler ve maymunlar SE'ye karşı oldukça hassastır (İnal, M., 2014). SE'lerin yol açtığı diğer hastalıklar, artritis, gıda zehirlenmeleri, toksik şok benzeri sendromlar, alerjik reaksiyonlar ve otoimmün hastalıklar olarak sıralanabilir (Krakauer, 1999; Balaban ve Rasooly, 2000). Bunlara ilaveten, stafilokokal enterotoksinlerin spesifik olmayan T hücre proliferasyonuna neden olan süperantijen fonksiyonlarının da bulunduğu bildirilmiştir (İnal, M., 2014).

#### 2.4. Stafilokokal Enterotoksinlerin Saptanması

Enterotoksinlerin tespit edilmesi, stafilokokal intoksikasyonların tam olarak ortaya çıkarılmasını sağlar. Zehirlenme belirtilerinin ortaya çıkması için 100 gr gıdanın 0,1 ile 10 ng arasında enterotoksin ihtiva etmesi yeterlidir. Bu nedenden dolayı enterotoksinlerin belirlenebilmesi için hassasiyeti yüksek testlere gerek duyulur. Bu testlerden bazıları; Ekstraksiyon - konsantrasyon metodu, RIA (Radio immune Assay), RPLA (Reversed Passive Latex Agglutination), VIDAS ve ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) bulunur ki bunlar içerisinde daha hassas ve duyarlı olanı ELISA olarak kabul edilmektedir. (Letertre ve ark., 2003; Erol, 2007). Çapraz reaksiyonların olma ihtimalinden dolayı bu metotların spesifitelerinin DNA tabanlı yöntemlerden daha zayıf olabileceği ifade edilmektedir (Aitichou ve ark., 2004). Bu çerçevede SE'lerde bulunan genlerin DNA dizinlerinin ortaya çıkarılmasına yönelik PCR teknolojisinin kullanımı ön plana çıkmaktadır (Duyuk, 2015).

**Tablo 2.3.** Stafilokokal enterotoksinlerin saptanmasında kullanılan test kitleri (Erol, 2007)

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

## 2.5. *S. aureus*'un Süt ve Süt Ürünlerindeki Varlığı

Patojen olarak *S. aureus*, dünyanın bir çok bölgesinde gıda zehirlenme vakalarında ikinci veya üçüncü sırada kendine yer bulur. Gıda temelli başka infeksiyon ve intoksikasyonlarla kıyaslandığında stafilokokal intoksikasyonlar daha hafif seyirli ve inkübasyon süreleri daha kısadır. Vakalar genellikle salgınlar şeklinde görülmesine karşın, tek tek sporadik vakalara da rastlanıldığı bildirilmektedir. Söz konusu salgınların, çoğunlukla sindirim sistemini etkileyen enterotoksinlerin öncelikle gıdada oluşumu daha sonra ise bu gıdanın alimenter yolla alınması sonucu gerçekleştiği ileri sürülmektedir (Normanno ve ark., 2005; Morandi ve ark., 2007).

WHO'ya göre gıda zehirlenmesinin tanımı, kontamine gıda veya suyun onu tüketen kişilerde oluşturduğu hastalık olarak yapılmıştır. Günümüze kadar 250'ye yakın gıda zehirlenmesi vakası tespit edilmiş ve dünyadaki en ciddi hastalıklar arasında gösterilen bu zehirlenmelerin üçte ikisine bakterilerin yol açtığı bildirilmiştir. Gıdada görülen stafilokokal enterotoksin varlığı bir stafilokokal gıda zehirlenme göstergesi olarak kabul edilmektedir (Le Loir ve ark., 2003; Kumar ve ark., 2009).

Süt ve süt ürünlerine dayalı stafilokokal gıda zehirlenmeleri açısından ülkeler arasında değişikliklerin görülme sebebi beslenme kültüründeki farklılıklara dayandırılmaktadır (Le Loir ve ark., 2003). Bu anlamda süt ve süt ürünleriyle alakalı stafilokokal gıda zehirlenmeleri 1969-1990 yıllarında İngilterede %8 iken 1975-1982 yıllarında ABD'de bu oran %1,4 olarak ortaya çıkmaktadır (Küçükçetin ve Milci, 2008). Çok peynir tüketen bir ülke olarak bilinen Fransa'ya bakıldığında ise süt ürünlerine dayalı stafilokokal gıda zehirlenmesi oranı 1999-2000 yıllarında % 32 olarak tespit edilmiştir (Le Loir ve ark., 2003).

Gıda temelli salgın olarak, Brezilya'da 1999 senesi Şubat ve Mayıs ayı içerisinde iki olgu kayıtlara geçmiştir. Bunların birincisinde bozulmuş peyniri tüketen 50 kişide 2 saatin içerisinde zehirlenme belirtileri olan diyare, kusma, baş dönmesi, titreme ve baş ağrısı görülmüştür. Çiğ süt tüketen 328 kişinin hastalandığı ikinci salgında ise belirti olarak diyare ve kusma ortaya çıkmıştır. Mikrobiyolojik incelemeler sonucunda, şüpheli peynir örneklerinden *S. aureus* ve çiğ süt örneklerinden de koagulaz negatif stafilokoklar izole edilmiştir. Kontamine olmuş peynirlerin SEA, SEB ve SEC ihtiva ettiği çiğ sütlerin ise SEC ve SED içerdiği görülmüştür. Sonuç olarak, peynir kaynaklı salgına peynirin üretim ve nakliyesinde görevli insanlar yani gıdayla teması olan kişiler, çiğ süt kaynaklı salgına ise mastitisin yol açtığı belirtilmiştir (Do Carmo ve ark., 2002).

Japonya’ da 2000 senesinde, kontamine süt ürünleri kaynaklı 13420 kişinin etkilendiği, stafilokok kaynaklı intoksikasyon sonucu oluşan çok büyük bir salgın kayıtlara geçmiştir. Yapılan incelemeler, yaklaşık olarak 3,7 ng/g SEA tespit edilen yağsız süt tozunun, süt ürünlerinin kontaminasyonuna yol açtığını göstermiştir. Yağsız süt tozunun üretimi esnasında 130 °C’lik ısıtılma uygulandığı fakat, SEA’nın etkinliğini koruduğu bildirilmiş ve bu toksinin 20-100 ng civarında olduğu tespit edilmiştir (Asao ve ark., 2003).

2007 yılında Avusturyadaki okullarda ortaya çıkan ve 1025 çocuğu etkileyen 166 vakanın, aynı firma tarafından okullara verilen süt ürünleri ve yoğurtlardan kaynaklandığı bildirilmiştir. Çocuklarda sabah abdominal kramp, kusma ve halsizlik şikayetleri ortaya çıkması üzerine oğleden sonra süt ürünleri ve yoğurt dağıtımını engellenmiştir. Daha sonra alınan örneklerin laboratuvarında incelenmesi sonucunda bu salgının enterotoksijenik karakterdeki *S. aureus*’dan kaynaklandığı tespit edilmiştir (Schmid ve ark., 2009).

2009 yılı itibarı ile Fransa’da Ekim ve Kasım ayları arasında ortaya çıkan ve kaynağı gıda olan salgın sayısı 6 olarak belirlenmiştir. Bu salgınların sebebinin ise pastörize edilmemiş süt kullanılarak yapılan yumuşak bir peynir çeşidi olduğu ortaya konmuştur. Bu peyniri tüketenlerin büyük çoğunluğunda mide bulantısı, kusma, ishal, abdominal kramp ve ateş gibi sağlık problemleri gözlemlenmiştir. Akabinde alınan numunelerden yapılan incelemelerde koagulaz pozitif stafilokoklar ve bunların PCR testi sonucu da *S. aureus* ve *see* genini ortaya çıkar mıştır. Sonuç olarak da bu salgının sebebinin SEE olduğu belirtilmiştir (Ostyn ve ark., 2010).

Türkiye’ye gelindiğinde gıda zehirlenmeleriyle alakalı ortaya konan resmi raporlar yeterli bir bilgi sunamamaktadır. Fakat yurt dışı kaynaklı raporlarda her üç gıda zehirlenme vakasından birinin *S. aureus* ve enterotoksinleri kaynaklı olduğu ileri sürülmektedir. Mikrobiyolojik infeksiyonlardan kaynaklanan gıda zehirlenme olgularında *S. aureus*’un oranının ABD için %45, Japonya için %25-30 ve Macaristan için %40 olduğu öngörülmektedir (Küçükçetin ve Milci, 2008). Stafilokokal temelli gıda zehirlenmeleri ile ilgili rakamlar ABD bağlamında yılda hastalanan 241.188 kişi içerisinden 1.064 kişinin hastanelik olması ve bunlar arasından da 6 kişinin ölmesi olarak tanımlanmaktadır. Bütün bu sağlık problemlerinin ABD’ne yaklaşık maliyetinin 1,5 milyar dolar civarında olduğu tahmin edilmektedir (Küçükçetin ve Milci 2008; Duyuk, 2015).



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Gereç

##### 3.1.1. Örnekler

Bu çalışmada 2018-2019 tarihleri arasında İstanbul ve ilçelerindeki süt toplama tesisleri, süt satış yerleri ve İstanbul Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü'ne gönderilen 100'ü çiğ ve 100'ü pastörize olmak üzere toplam 200 adet süt örneği toplandı. Toplanan süt örneklerinin ilçelere göre dağılımı Tablo 3.1'de, hayvan türlerine göre dağılımı Tablo 3.2'de verildi. Çalışmada kullanılan süt örneklerinin toplandığı ilçeler, alındığı tarihler, alındığı yerler, sütlerin ambalaj durumları ve menşeleri, çiğ ve pastörize süt olmak üzere ayrı ayrı sırasıyla Tablo 3.3 ve Tablo 3.4'de verildi. Örnekler satış ambalajları bozulmadan, ya da süt toplama tesislerinden steril kaplara alınarak soğuk zincirde laboratuvara getirildi, 1-2 saat içinde analize alındı. Etken izolasyonu ve ELISA için örnekler iki kısma ayrıldı.

**Tablo 3.1.** Süt örneklerinin ilçelere göre dağılımları

İlçeler	Süt Örneği Sayısı
Bahçelievler	47
Bakırköy	36
Bağcılar	32
Fatih	22
Güngören	15
Avcılar	13
Zeytinburnu	10
Mecidiyeköy	8
Esenyurt	8
Küçükçekmece	7
Sultanbeyli	2
<b>Toplam</b>	<b>200</b>

**Tablo 3.2.** Süt örneklerinin hayvan türlerine göre dağılımları

Sütün Alındığı Hayvan Türü	Süt Örneği Sayısı
İnek	177
Manda	14
Keçi	9
<b>Toplam</b>	<b>200</b>

**Tablo 3.3.** Çiğ süt örneklerinin kaynağı, numunenin alındığı tarih, numunenin alındığı yer, ambalaj durumu ve sütün menşei

İlçe	Kaynak		Numunenin Alındığı Tarih	Numunenin Alındığı Yer	Numunenin Ambalaj Durumu	Süt Menşei
	Örnek No					
Bakırköy	12		01.11.2018	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bakırköy	29		30.01.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bakırköy	30		30.01.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Sultanbeyli	31		30.01.2019	Süt Toplama Tesisi	Steril Numune Kabı	İnek
Sultanbeyli	32		30.01.2019	Süt Toplama Tesisi	Steril Numune Kabı	Manda
Bahçelievler	45		10.02.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bağcılar	46		10.02.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bakırköy	47		10.02.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bahçelievler	48		10.02.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bağcılar	49		10.02.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bağcılar	50		10.02.2019	Sokak Sütçüsü	Steril Numune Kabı	İnek
Bağcılar	56		17.02.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bahçelievler	57		17.02.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bahçelievler	58		17.02.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bahçelievler	59		17.02.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek

Bakırköy	60	17.02.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	Manda
Bağcılar	61	17.02.2019	Sokak Sütçüsü	Steril Numune Kabı	İnek
Küçükçekmece	62	17.02.2019	Süt Satış Yeri	Steril Numune Kabı	İnek
Fatih	63	03.03.2019	Süt Toplama Tesisi	Steril Numune Kabı	İnek
Fatih	64	03.03.2019	Süt Toplama Tesisi	Steril Numune Kabı	İnek
Fatih	65	03.03.2019	Süt Toplama Tesisi	Steril Numune Kabı	İnek
Fatih	66	03.03.2019	Süt Satış Yeri	Steril Numune Kabı	İnek
Fatih	67	03.03.2019	Süt Toplama Tesisi	Steril Numune Kabı	İnek
Fatih	68	03.03.2019	Süt Toplama Tesisi	Steril Numune Kabı	İnek
Fatih	69	03.03.2019	Süt Toplama Tesisi	Steril Numune Kabı	İnek
Fatih	70	03.03.2019	Süt Toplama Tesisi	Steril Numune Kabı	İnek
Fatih	71	03.03.2019	Süt Toplama Tesisi	Steril Numune Kabı	İnek
Fatih	72	03.03.2019	Süt Satış Yeri	Steril Numune Kabı	İnek
Bakırköy	73	08.03.2019	İGKLM	Steril Numune Kabı	Manda
Bahçelievler	86	10.03.2019	Sokak Sütçüsü	Steril Numune Kabı	İnek
Bakırköy	87	19.03.2019	İGKLM	Steril Numune Kabı	Manda
Bakırköy	102	24.03.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bahçelievler	103	24.03.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bağcılar	104	24.03.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bakırköy	105	24.03.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bağcılar	106	24.03.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Avçılar	107	21.04.2019	Sokak Sütçüsü	Steril Numune Kabı	İnek
Bahçelievler	108	21.04.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bahçelievler	109	21.04.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bahçelievler	110	21.04.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bahçelievler	111	21.04.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bağcılar	124	28.07.2019	Sokak Sütçüsü	Steril Numune Kabı	İnek
Bağcılar	125	28.07.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek

Bakırköy	126	28.07.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	Manda
Bağcılar	127	28.07.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bahçelievler	128	28.07.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bahçelievler	129	28.07.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bakırköy	130	28.07.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bakırköy	131	28.07.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bakırköy	132	01.08.2019	Sokak Sütçüsü	Steril Numune Kabı	İnek
Bahçelievler	133	04.08.2019	Süt Satış Yeri	Steril Numune Kabı	İnek
Bahçelievler	134	04.08.2019	Sokak Sütçüsü	Steril Numune Kabı	İnek
Bahçelievler	135	04.08.2019	Sokak Sütçüsü	Steril Numune Kabı	İnek
Bahçelievler	136	04.08.2019	Süt Toplama Tesisi	Steril Numune Kabı	İnek
Bahçelievler	137	04.08.2019	Süt Satış Yeri	Steril Numune Kabı	İnek
Bahçelievler	138	04.08.2019	Süt Satış Yeri	Steril Numune Kabı	Manda
Bakırköy	139	04.08.2019	İGKLM	Steril Numune Kabı	Keçi
Bahçelievler	140	04.08.2019	Süt Toplama Tesisi	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bahçelievler	141	04.08.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bakırköy	152	20.08.2019	İGKLM	Steril Numune Kabı	Keçi
Bağcılar	161	08.09.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bahçelievler	162	08.09.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bahçelievler	163	08.09.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bahçelievler	164	08.09.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bağcılar	165	08.09.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bağcılar	166	08.09.2019	Sokak Sütçüsü	Steril Numune Kabı	İnek
Bağcılar	167	08.09.2019	Sokak Sütçüsü	Steril Numune Kabı	İnek
Bağcılar	168	08.09.2019	Sokak Sütçüsü	Steril Numune Kabı	İnek
Bahçelievler	169	08.09.2019	Süt Satış Yeri	Steril Numune Kabı	İnek
Bahçelievler	170	08.09.2019	Süt Satış Yeri	Steril Numune Kabı	Manda

Bahçelievler	171	15.09.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bahçelievler	172	15.09.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bahçelievler	173	15.09.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bağcılar	174	15.09.2019	Süt Toplama Tesisi	Steril Numune Kabı	İnek
Bağcılar	175	15.09.2019	Süt Toplama Tesisi	Steril Numune Kabı	Manda
Bahçelievler	176	15.09.2019	Süt Satış Yeri	Steril Numune Kabı	İnek
Bahçelievler	177	15.09.2019	Süt Satış Yeri	Steril Numune Kabı	Manda
Bahçelievler	178	15.09.2019	Süt Toplama Tesisi	Steril Numune Kabı	İnek
Bahçelievler	179	15.09.2019	Süt Satış Yeri	Steril Numune Kabı	İnek
Bağcılar	180	22.09.2019	Sokak Sütçüsü	Steril Numune Kabı	İnek
Fatih	181	22.09.2019	Süt Toplama Tesisi	Steril Numune Kabı	İnek
Fatih	182	22.09.2019	Süt Toplama Tesisi	Steril Numune Kabı	İnek
Fatih	183	22.09.2019	Süt Toplama Tesisi	Steril Numune Kabı	Manda
Fatih	184	22.09.2019	Süt Toplama Tesisi	Steril Numune Kabı	İnek
Fatih	185	22.09.2019	Süt Toplama Tesisi	Steril Numune Kabı	İnek
Fatih	186	22.09.2019	Süt Toplama Tesisi	Steril Numune Kabı	Manda
Fatih	187	22.09.2019	Süt Toplama Tesisi	Steril Numune Kabı	İnek
Fatih	188	22.09.2019	Süt Toplama Tesisi	Steril Numune Kabı	Manda
Fatih	189	22.09.2019	Süt Toplama Tesisi	Steril Numune Kabı	İnek
Fatih	190	22.09.2019	Süt Toplama Tesisi	Steril Numune Kabı	İnek
Fatih	191	22.09.2019	Süt Toplama Tesisi	Steril Numune Kabı	İnek
Bakırköy	192	06.10.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bakırköy	193	06.10.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Fatih	194	06.10.2019	Süt Toplama Tesisi	Steril Numune Kabı	İnek
Bahçelievler	195	06.10.2019	Süt Satış Yeri	Steril Numune Kabı	İnek
Bahçelievler	196	06.10.2019	Süt Satış Yeri	Steril Numune Kabı	Manda
Bağcılar	197	06.10.2019	Süt Satış Yeri	Steril Numune Kabı	Manda
Bağcılar	198	06.10.2019	Süt Satış Yeri	Steril Numune Kabı	İnek
Bağcılar	199	06.10.2019	Sokak Sütçüsü	Steril Numune Kabı	İnek
Bahçelievler	200	06.10.2019	Süt Satış Yeri	Steril Numune Kabı	İnek

**Tablo 3.4.** Pastörize süt örneklerinin kaynağı, numunenin alındığı tarih, numunenin alındığı yer, ambalaj durumu ve sütün menşei

Kaynak		Numunenin Alındığı Tarih	Numunenin Alındığı Yer	Numunenin Ambalaj Durumu	Süt Menşei
İlçe	Örnek No				
Bakırköy	1	24.10.2018	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bakırköy	2	24.10.2018	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Cam)	İnek
Bakırköy	3	24.10.2018	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Cam)	İnek
Bakırköy	4	24.10.2018	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Cam)	İnek
Bakırköy	5	24.10.2018	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bakırköy	6	24.10.2018	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bakırköy	7	24.10.2018	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Karton)	İnek
Bakırköy	8	01.11.2018	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bakırköy	9	01.11.2018	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bakırköy	10	01.11.2018	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Cam)	İnek
Bakırköy	11	01.11.2018	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Cam)	Keçi
Bahçelievler	13	18.12.2018	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bahçelievler	14	18.12.2018	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Cam)	İnek
Bahçelievler	15	18.12.2018	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Cam)	İnek
Bahçelievler	16	18.12.2018	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Cam)	İnek
Bahçelievler	17	18.12.2018	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Karton)	İnek
Bahçelievler	18	18.12.2018	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Karton)	İnek
Bahçelievler	19	18.12.2018	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Karton)	İnek
Bahçelievler	20	18.12.2018	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Küçükçekmece	21	30.01.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Karton)	İnek
Küçükçekmece	22	30.01.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Karton)	İnek
Küçükçekmece	23	30.01.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Karton)	İnek

Küçükçekmece	24	30.01.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Karton)	İnek
Küçükçekmece	25	30.01.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Küçükçekmece	26	30.01.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Cam)	İnek
Bakırköy	27	30.01.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Cam)	İnek
Bakırköy	28	30.01.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bahçelievler	33	30.01.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Güngören	34	10.02.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Güngören	35	10.02.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Karton)	İnek
Güngören	36	10.02.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Karton)	İnek
Güngören	37	10.02.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Karton)	İnek
Güngören	38	10.02.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Güngören	39	10.02.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Güngören	40	10.02.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Güngören	41	10.02.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Cam)	İnek
Güngören	42	10.02.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Cam)	Keçi
Güngören	43	10.02.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Cam)	İnek
Güngören	44	10.02.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bağcılar	51	17.02.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Karton)	İnek
Bağcılar	52	17.02.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bağcılar	53	17.02.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Cam)	İnek
Bağcılar	54	17.02.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Cam)	Keçi
Bağcılar	55	17.02.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Avcılar	74	10.03.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bakırköy	75	10.03.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Cam)	İnek
Avcılar	76	10.03.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Cam)	İnek

Avcılar	77	10.03.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Avcılar	78	10.03.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Avcılar	79	10.03.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Avcılar	80	10.03.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Karton)	İnek
Avcılar	81	10.03.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Karton)	İnek
Avcılar	82	10.03.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Karton)	İnek
Bakırköy	83	10.03.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Cam)	Keçi
Avcılar	84	10.03.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Cam)	İnek
Avcılar	85	10.03.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Mecidiyeköy	88	24.03.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Karton)	İnek
Mecidiyeköy	89	24.03.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Karton)	İnek
Mecidiyeköy	90	24.03.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Karton)	İnek
Mecidiyeköy	91	24.03.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Karton)	İnek
Mecidiyeköy	92	24.03.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Mecidiyeköy	93	24.03.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Mecidiyeköy	94	24.03.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Mecidiyeköy	95	24.03.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Cam)	İnek
Güngören	96	24.03.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Cam)	İnek
Güngören	97	24.03.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Güngören	98	24.03.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Cam)	İnek
Güngören	99	24.03.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Cam)	İnek
Bakırköy	100	24.03.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Cam)	Keçi
Bakırköy	101	24.03.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bahçelievler	112	16.06.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Karton)	İnek

Bahçelievler	113	16.06.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Karton)	İnek
Bağcılar	114	16.06.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bağcılar	115	16.06.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bağcılar	116	16.06.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bağcılar	117	16.06.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bağcılar	118	16.06.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Bağcılar	119	16.06.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Cam)	İnek
Avcılar	120	16.06.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Cam)	İnek
Avcılar	121	16.06.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Cam)	İnek
Bakırköy	122	16.06.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Cam)	Keçi
Bakırköy	123	16.06.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Zeytinburnu	142	18.08.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Zeytinburnu	143	18.08.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Zeytinburnu	144	18.08.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Zeytinburnu	145	18.08.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Zeytinburnu	146	18.08.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Karton)	İnek
Zeytinburnu	147	18.08.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Karton)	İnek
Zeytinburnu	148	18.08.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Zeytinburnu	149	18.08.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Cam)	Keçi
Zeytinburnu	150	18.08.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Zeytinburnu	151	18.08.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Esenyurt	153	01.09.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Esenyurt	154	01.09.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Esenyurt	155	01.09.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Cam)	İnek

Esenyurt	156	01.09.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek
Esenyurt	157	01.09.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Karton)	İnek
Esenyurt	158	01.09.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Karton)	İnek
Esenyurt	159	01.09.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Cam)	İnek
Esenyurt	160	01.09.2019	Süt Satış Yeri	Orijinal Ambalaj (Plastik)	İnek

### 3.1.2. Besiyerleri

#### 3.1.2.1. Baird Parker Agar (BPA, Oxoid, CM0961)-Egg Yolk Tellürit Emülsiyon (Oxoid, SR0054)

BPA, üretici firma tarafından belirtilen oranlarda hazırlandı. 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. Besiyeri 50°C'ye soğutulduktan sonra Egg Yolk Tellurite emülsiyonu eklendi.

#### 3.1.2.2. Mannitol Salt Agar (Oxoid, CM0085)

Üretici firma tarafından belirtilen oranlarda hazırlandı, pH'sı 7,2'ye ayarlandı, otoklavda sterilize edildi.

#### 3.1.2.3. DNase Agar (Oxoid, CM0321)

Besiyerinden 1 lt distile su içerisine 40 gr ilave edildi, ısıtılarak eritildi. Karışımın pH'ı 7,2'ye ayarlandı. 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilip petrilere döküldü. Besiyeri daha sonra kullanılmak üzere buzdolabına kaldırıldı.

#### 3.1.2.4. Tryptone Soy Agar (TSA, Oxoid, CM0131)

Besiyerinden 1 lt distile su içerisine 40 gr ilave edildi, ısıtılarak eritildi. Karışımın pH'ı 7,2'ye ayarlandı. 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilip petrilere döküldü. Daha sonra kullanılmak üzere buzdolabına kaldırıldı.

#### 3.1.2.5. Tryptone Soy Broth (TSB, Oxoid, CM0129)

Besiyerinden 8 gr, 75 gr NaCl, 1000 ml distile su karıştırıldı. Karışımın pH'ı 7,2'ye ayarlandı. 5 ml lik tüplere dağıtılarak 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. 50°C'ye soğutulup buzdolabına kaldırıldı.

### 3.1.2.6. Brain Heart Infusion Broth (BHIB, Oxoid, CM0225)

Besiyerinden 8 gr, 20 ml gliserin, 80 ml distile su içerisinde ısıtılarak eritildi. Karışımın pH'ı 7,2'ye ayarlandı. 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. 50°C'ye soğutulup buzdolabına kaldırıldı.

### 3.1.3. Kimyasal Maddeler ve Solüsyonlar

%3 Hidrojen Peroksit (%30' luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Riedel de Haen, 18312), Gram Boyama Seti (Kristal Violette (Fluka, 61135), Gram Iodine (Riedel de Haen, 30305), Etanol (Riedel de Haen, 32221), Safranin O Solüsyonu (Riedel de Haen, 32610)), Oksidaz Testi (Liofilchem Oxidase Test Stick, 88029N), İmmersiyon Yağı (Fluka, 56822), Tavşan Plazması (Remel, R21051).

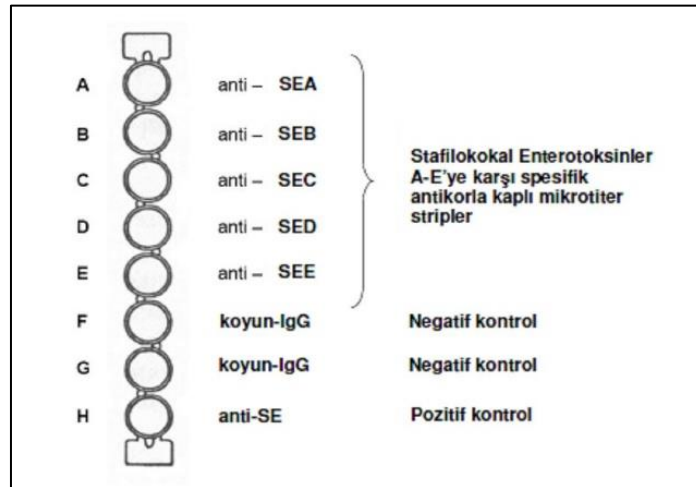
### 3.1.4. Lateks Aglütinasyon Test Kiti

Plasmatec Staphylococcus Latex Test Kit (STE 010)

### 3.1.5. ELISA Kit

*S. aureus* enterotoksinlerinin (A,B,C,D,E) saptanması amacıyla Ridascreen SET A,B,C,D,E (r-biopharm, Germany, R4101) kiti kullanıldı.

Şekil 3.1. Ridascreen Set (ABCDE) Test Kiti Mikro Pleyt



### 3.1.6. Real-time PCR

#### 3.1.6.1. Ekstraksiyon

Roche MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume DNA Ekstraksiyon Kiti (REF 06543588001, Roche, Germany) kullanıldı.

**Tablo 3.5.** Roche MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit İçeriği

Bileşen	Etiket	İçerik/Özellik
<b>Tabla 1</b>		
<b>Reaktif Tabla 1</b>		
Kap 1	Yıkama Solüsyonu I	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Guanidin Hidroklorid</li> <li>• Etanol</li> <li>• Tris HCl Solüsyonu</li> </ul>
Kap 2	Yıkama Solüsyonu I	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Guanidin Hidroklorid</li> <li>• Etanol</li> <li>• Tris HCl Solüsyonu</li> </ul>
Kap 3	Parçalayıcı/Bağlayıcı Solüsyon	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Guanidin Tiyosiyanat</li> <li>• Tris HCl Solüsyonu</li> <li>• Triton X-100</li> </ul>
<b>Tabla 2</b>		
<b>Reaktif Tabla 2</b>		
Kap 1		Boş
Kap 2	Proteinaz K	%2 Proteinaz K, % 50 Gliserol
Kap 3	Yıkama Solüsyonu	Tris HCl Solüsyonu
Kap 4	Yıkama Solüsyonu III	Sodyum Asetat Solüsyonu
<b>Şişe 1</b>	Manyetik Cam Partikülleri	İzopropanol içeren manyetik cam partikülleri

#### 3.1.6.2. Forward ve Revers Primerler

Primerlerin dizaynı, IDT Integrated DNA Technologies tarafından yapıldı. Primerler üretici firmanın belirttiği doğrultuda sulandırılarak stok solüsyonları hazırlandı. Bu stok solüsyonları kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı. Çalışmada kullanılan primerlerin gen dizilimleri, ampikon büyüklükleri ve kaynakları Tablo 3.6'da gösterildi.

**Tablo 3.6.** Çalışmada kullanılan primerlerin gen dizimleri ve amplikon büyüklükleri

Hedef genler	Primer Adı	Gen Dizilimi (5'-3')	Amplikon Büyüklüğü	Kaynak
SEA	Forward	5-AAAATACAGTACCTTTGGAAA-3	92	Demirci et al. (2017)
	Reverse	5-TTTCCTGTAAATAACGTCTTGC-3		
	Prob	FAM-AACGAATAAGAAAAATGTAAGTTCAGGAGTTGGATC-Tamra		
SEB	Forward	5-CGCATCAAACGACAAACGA-3	243	Gayathri & Prakash (2014)
	Reverse	5-CCGTTTCATAAGGCGAGTTG-3		
	Prob	FAM-TGTTCCGGTATTTGAAGATGG-Tamra		
SEC	Forward	5-AATAAAACGGTTGATTCTAAAA-3	80	Demirci et al. (2017)
	Reverse	5-ATCAAAATCGGATTAACATTAT-3		
	Prob	FAM-TAGAAGTCCACCTTACAA-Tamra		
SED	Forward	5-TGATTCTTCTGATGGGTCTAA-3	115	Demirci et al. (2017)
	Reverse	5-GAAGGTGCTCTGTGGATAATG-3		
	Prob	FAM-TATGATTATTTGATGTTAAGGGTGATTTCCCGAA-Tamra		
SEE	Forward	5-ACCGATTGACCGAAGAAAAA-3	264	Varshney et al. (2009)
	Reverse	5-CTTACCGTGGACCCTTCAGA-3		
	Prob	FAM-TGCAAAGAGGCTTGATTGTG-Tamra		

### 3.1.6.3. Real-time PCR Kit

Real-Time PCR analizi için Roche Light Cycler 480 Probes Master Kit (REF 04887301001, Roche, Germany) kullanıldı.

PCR kit içeriği:

- LightCycler 480 Probes Master (2x konsantrasyonda)
- PCR saflığında su

### 3.1.7. Standart Suşlar

Çalışmadaki A (SEA ATCC 13565 FDA 196E), B (SEB ATCC 14458 FDA 243), C (SEC ATCC 19095 137), D (SED ATCC 23235 494), E (ATCC 27664 FRI-326) tipi stafilokokal enterotoksin üreten *S. aureus* suşları Tarım ve Orman Bakanlığı İstanbul Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü'nden temin edildi.

### 3.1.8. Kullanılan Diğer Gereçler

Çalışmada kullanılan cihazlar ve ekipmanlar Tablo 3.7'de özetlendi.

**Tablo 3.7.** Çalışmada kullanılan cihazlar ve ekipmanlar

Cihazlar
<ul style="list-style-type: none"> <li>• DNA Ekstraksiyon Cihazı (Magna Pure 96, Roche)</li> <li>• Real-Time PCR Cihazı (Light Cycler 480 II, Roche)</li> <li>• Biyogüvenlik Kabini (PCR-3A1, Esco)</li> <li>• ELISA Cihazı (ELX 808 IU, Bio-Tek)</li> <li>• Benmari (Kerman)</li> <li>• İnkübatör (DE700, Memmert)</li> <li>• Otoklav (HV-85L, Hirayama)</li> <li>• Mikroskop (DM3000, Leica)</li> <li>• Hassas Terazı (CP224S, Sartorius)</li> <li>• Çalkalayıcı-Isıtıcı Blok (MB102, Bioer)</li> <li>• Soğutmalı Santrifüj (Allegra X-22, Beckman Coulter)</li> <li>• pH Metre (Seven Compact, Mettler-Toledo)</li> <li>• Mikrosantrifüj (Microfuge 16, Beckman Coulter)</li> <li>• Vorteks (I.622.01.001, IsoLab)</li> <li>• Mikroplate Okuyucu-Spektrofotometre (Epoch)</li> <li>• Buzdolabı (5841NFY, Arçelik)</li> <li>• Derin Dondurucu (GSN36AI31, Bosch)</li> </ul>
Ekipmanlar
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Otomatik Pipetler (0.5-10 µl, 10-100 µl, 100-200 µl, 100-1000 µl, Thermo)</li> <li>• 96 kuyucuklu PCR pleyt ve optik kaplayıcı film (Roche)</li> <li>• Filtreli steril pipet uçları (Thermo)</li> <li>• Steril petri, spatül, öze</li> <li>• Steril pudrasız eldiven</li> </ul>

### 3.2. Yöntem

#### 3.2.1. Süt Örneklerinden *S. aureus* izolasyonu

Soğuk koşullar altında (+4°C) laboratuvara getirilen süt örneklerinden 1'er ml alınıp Egg Yolk Tellurite eklenmiş BP agara ekildi. Ekimi yapılan besiyerleri 37°C'de 48 saat aerobik şartlarda inkübe edildi. Bu süre sonunda BP agarda gri-siyah, etrafında hale olan koloniler *S. aureus* şüpheli, zonsuz siyah koloniler *Staphylococcus* spp. şüpheli olarak belirlendi.

Şüpheli kolonilere Gram boyama yapıldı. Mikroskopik morfolojileri Gram pozitif kok olan kolonilere katalaz ve oksidaz testleri uygulandı. Gram pozitif kok olan, katalaz testi pozitif ve oksidaz testi negatif olan *Staphylococcus* spp. şüpheli kolonilerden saf kültürler elde etmek amacıyla TSA'lara ekimler yapıldı. Aerobik ortamda, 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası elde edilen, temel özellikleri (Gram boyanma özelliği, katalaz ve oksidaz özelliği) yönünden kontrol edilen saf kültürler etken identifikasyonu amacıyla kullanıldı.

İdentifikasyon için *S. aureus* şüpheli kolonilere tüp ve lam (lateks) aglütinasyon testi, koagulaz, DNaz aktivitesi, mannitol fermantasyonu testi uygulandı. Testlerin sonuçları pozitif olan koloniler *S. aureus* olarak belirlendi. Elde edilen izolatlar %20 Gliserol içeren TSB'de -20°C saklandı (TS 6582-3 EN ISO 6888-3, 2004).

#### 3.2.2. ELISA (Ezyme Linked Immunosorbent Assay)

##### 3.2.2.1. Protein Yapısındaki Toksinlerin ELISA Tekniği ile Belirlenmesi

Test üretici firmanın talimatları doğrultusunda uygulandı. Yıkama solüsyonu 1/10 oranında sulandırıldı. Her bir süt örneğinden(n=200) 25 ml steril kapaklı tüplere aktarıldı ve 3500 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra tüplerin üzerinde oluşan krema tabakası atıldı ve altta kalan filtrat analizde kullanıldı. Her bir numune için 8 kuyucuklu mikrotiter strip kullanıldı. 12 adet strip 1 pleytte yerleştirildi. Mikrotiter striplerin ilk 7 kuyucuğuna 100 µl numune, son kuyucuğa ise 100 µl pozitif kontrol eklendi. Pleyt manüel olarak yavaşça karıştırıldı ve üzeri kapatılarak 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Mikrotiter pleytinin çukurlarındaki sıvı dikkatlice boşaltılıp kuyucuklara 300 µl yıkama solüsyonu konuldu. Pleyt yavaşça karıştırılarak kuyucukların tamamen yıkanması sağlandı ve daha sonra yıkama solüsyonu döküldü. Yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı. Her bir kuyucuğa 100 µl konjugeyt 1 eklendi ve pleyt manüel olarak yavaşça karıştırıldı, üzeri kapatılarak

37°C’de 1 saat inkübe edildi. Pleytin içindeki sıvı boşaltılıp kuyucuklara 300 µl yıkama solüsyonu konuldu. Yıkama işlemi yapıldı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. Sonrasında, her bir kuyucuğa 100 µl konjugeyt 2 eklendi ve pleyt manüel olarak yavaşça karıştırılıp pleytin üzeri kapatılarak 37°C’de 30 dakika inkübe edildi. Mikrotiter pleytinin çukurlarındaki sıvı dikkatlice boşaltılıp 3 kez yıkama işlemi yapıldı. Her bir kuyucuğa 100 µl Substrat/Kromojen eklendi ve pleyt manüel olarak yavaşça karıştırılıp pleytin üzeri kapatıldı, 37°C’de 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuğa 100 µl sonlandırıcı solüsyon eklendi, pleyt yavaşça manüel olarak karıştırıldı. Pleyt spektrofotometre cihazında 450/620 nm dalga boyunda okundu ve sonuçlar RIDASOFT WIN.NET programına göre değerlendirildi.

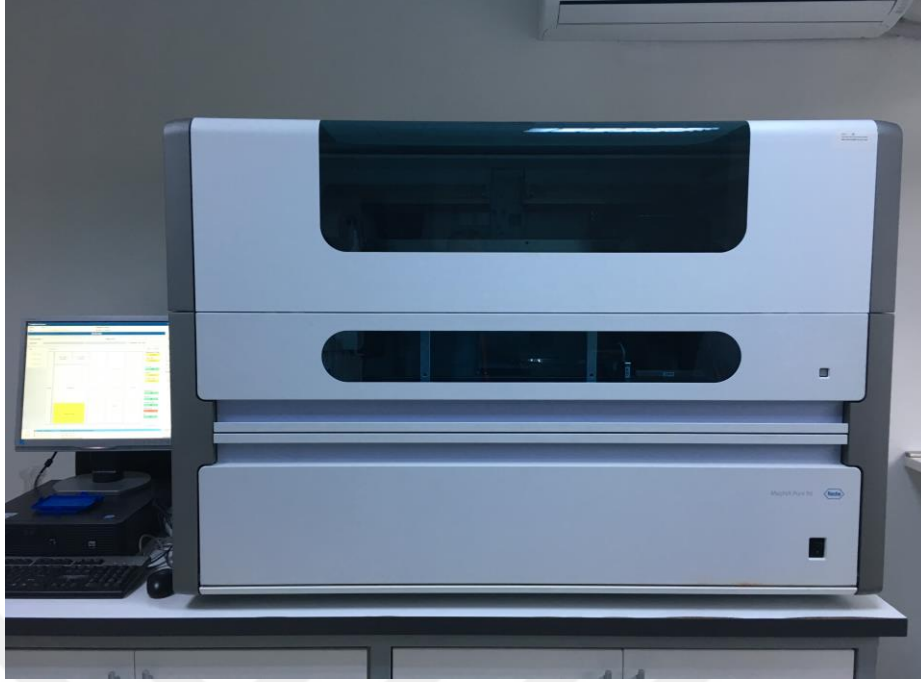
### **3.2.2.2.Cut-Off Değerinin Hesaplanması**

Her bir örnek için ayrı ayrı negatif kontrollerin (F ve G kuyucuklarında bulunan) OD değerlerinin aritmetik ortalaması alındı ve 0,15 ekleyerek her bir örneğin cut-off değeri belirlendi. Programda elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde pozitif kontrol değerinin  $\geq 1,0$  negatif kontrol değerininin  $\leq 0,2$  olmasına dikkat edildi. Bu sonuçlara uymayan değerler hatalı olarak değerlendirildi. Test tekrarlandı. Örneklerin 450/620 nm’deki absorbans değeri her bir örnek için saptanan cut-off değerinin altında ise negatif, eşit veya yüksek ise pozitif olarak değerlendirildi.

### **3.2.3. Real-Time PCR**

#### **3.2.3.1.Genomik DNA Ekstraksiyonu**

DNA ekstraksiyonu, ticari kitte verilen yönteme göre uygulandı. Bu amaçla BPA’daki *S. aureus* kolonilerinden birkaç tane alındı ve BHIB’a ekildi. Aerobik ortamda, 37°C’de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda, elde edilen kültürlerden 200’er µl alındı, tam otomatik DNA ekstraksiyon cihazının kartuşlarına yüklendi ve ekstraksiyon protokolü başlatıldı. DNA izolasyonu tamamlandıktan sonra ekstrakte edilen DNA’ların saflıkları spektrofotometre ile kontrol edildi. Spektrofotometrede 260/280 oranı 1,8 olan saf DNA’lar Real-Time PCR analizinde kullanıldı.



**Resim 3.1.** DNA Ekstraksiyon Cihazı (Magna Pure 96, Roche, Germany)

### 3.2.3.2. DNA Amplifikasyonu

#### 3.2.3.2.1. Real-Time PCR Karışımının Hazırlanması

Toplam hacim her bir örnek için 15  $\mu$ l olacak şekilde PCR karışımı hazırlandı. PCR karışımı hazırlanmasında, her bir örnek için 10  $\mu$ l Master Mix, 0,5'er  $\mu$ l forward ve revers primer, 0,2  $\mu$ l prob ve 3,8  $\mu$ l PCR saflıkta su kullanıldı.

**Tablo 3.8.** Real-Time PCR Karışımı Bileşimi

Bileşen	Miktarı
LightCycler 480 Probes Master Mix	10 $\mu$ l
PCR Saflıkta Su	3,8 $\mu$ l
Forward Primer	0,5 $\mu$ l
Reverse Primer	0,5 $\mu$ l
Prob	0,2 $\mu$ l
<b>TOPLAM</b>	<b>15 <math>\mu</math>l</b>

PCR karışımı her bir kuyucuğa 15  $\mu$ l olarak dağıtıldı ve üzerlerine 5  $\mu$ l elde edilen örnek DNA'sı eklendi. Her çalışmada pozitif kontrol için 5  $\mu$ l referans *S. aureus* suşlarından elde edilen DNA, negatif kontrol için ise RNase-DNase free PCR saflıkta su ilave edildi. Pleytin üzeri optik folyo ile kapatıldı ve santrifüje yerleştirilerek 1500 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Daha sonra pleyt LightCycler 480 II Real-Time PCR cihazına yerleştirildi.



**Resim 3.2.** Real-Time PCR Cihazı (Light Cyclers 480 II, Roche, Germany)

LightCycler 480 II Real-Time PCR cihazına göre optimize edilen ısı değerlerinde Real-Time PCR aşaması tamamlandı. Real-Time PCR döngüleri, sıcaklık ve uygulanan süreler Tablo 3.9’da özetlendi.

**Tablo 3.9.** Real-Time PCR Koşulları

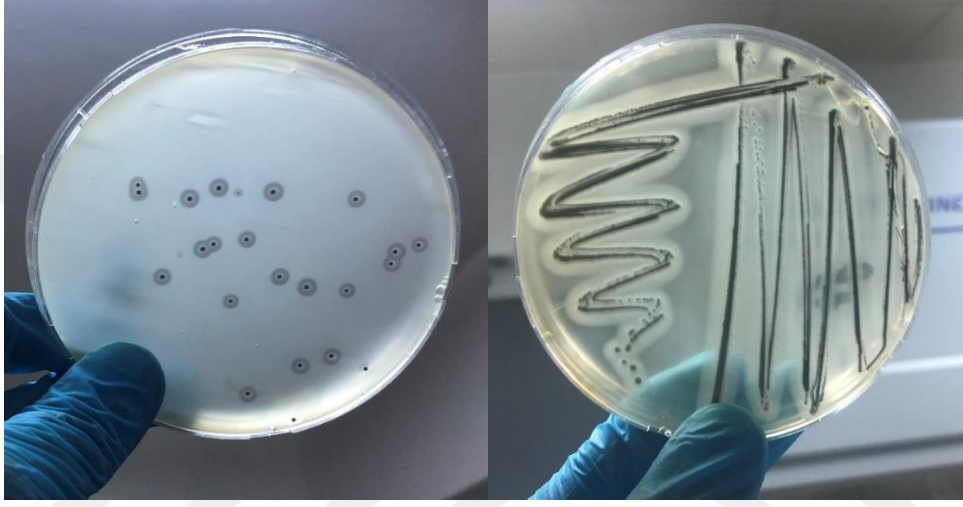
PCR Döngüleri	Sıcaklık	Süre
Başlangıç Denaturasyonu	95°C	10 dk
Denaturasyon	95°C	10 sn
Bağlanma	55°C	30 sn
Uzama	72°C	1 sn
Son Uzama	40°C	10 sn

Optimize edilen ısı değerlerinde amplifikasyon ve probun hidrolizine bağlı floresan artışı kontrol edildi. Floresan artışının görülmesi, *S. aureus* izolatının enterotoksijenik özellikte olduğunu gösterdi ve enterotoksin gen bölgelerinin her toksin tipine göre varlığı belirlendi.

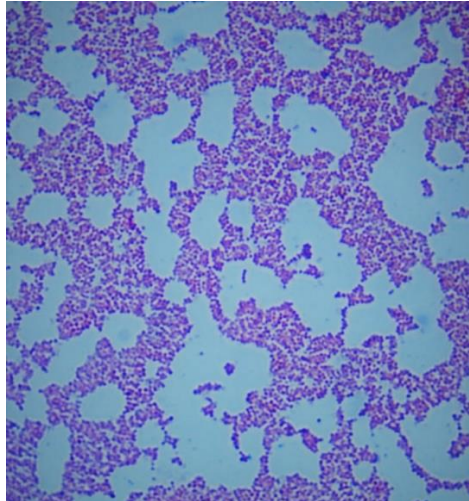
## 4. BULGULAR

### 4.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Çalışmada EYT-BP agara ekimi yapılan 100 çiğ süt örneğinin 98 adedinde *Staphylococcus* spp. ve 48 adedinde *S. aureus* şüpheli koloniler üredi. Pastörize süt örneklerinin (n=100) 6 adedinde *Staphylococcus* spp. ve 1 adedinde *S. aureus* şüpheli koloniler üredi.

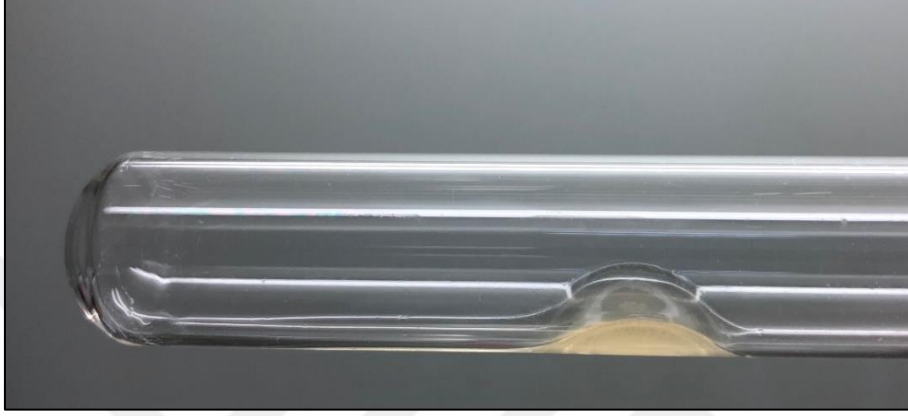


**Resim 4.1.** *S. aureus* şüpheli kolonilerin Baird Parker Agar'daki görünümü

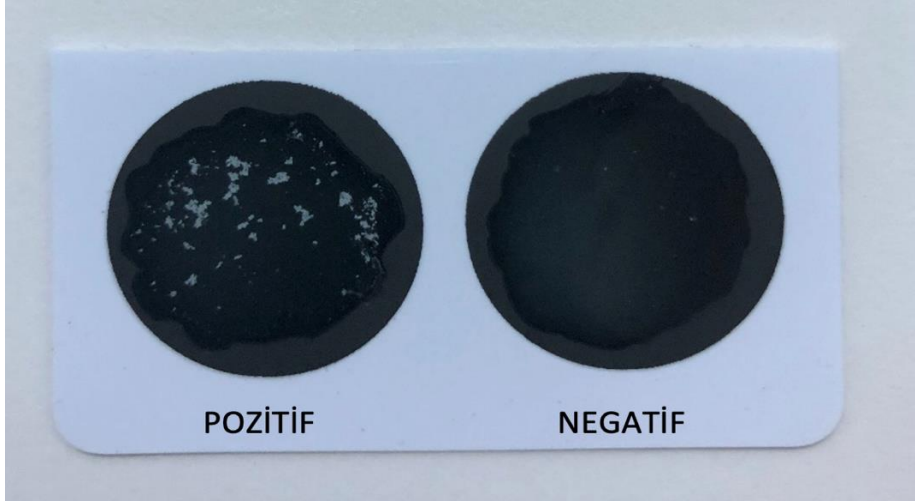


**Resim 4.2.** *S. aureus* şüpheli kolonilerin mikroskopik görünümü (x100 büyütmede ışık mikroskopunda görüntülendi)

İdentifikasyon için *S. aureus* şüpheli kolonilere uygulanan tüp koagülaz ve lateks aglütinasyon testi sonucunda 98 çiğ süttten izole edilen *Staphylococcus* spp. izolatlarının 54'ünün koagülaz pozitif olduğu, bunların identifikasyon testleri sonucunda da 48'inin *S. aureus* olduğu belirlendi.



**Resim 4.3.** Tüp koagülaz testi pozitif reaksiyon görünümü



**Resim 4.4.** Lateks aglütinasyon testi görünümü

Sonuç olarak piyasada satılan çiğ süt (n=100) örneklerinin 48 (%48) adedinde *S. aureus* saptandı. Pastörize sütlerde, 6 pastörize süttten izole edilen *Staphylococcus* spp. izolatlarının 2'sinin koagülaz pozitif olduğu, bunların identifikasyon testleri sonucunda 1 adedinin *S. aureus* olduğu belirlendi. Sonuç olarak piyasada satılan çiğ süt (n=100)

örneklerinin 48 (%48)'inde ve pastörize süt (n=100) örneklerinin 1 (%1) adedinde *S. aureus* saptandı (Tablo 4.1).

**Tablo 4.1.** *Staphylococcus* spp., Koagülaz pozitif stafilocok ve *S. aureus* izolatlarının süt tipine göre dağılımları

Süt Tipi	Örnek Sayısı	<i>Staphylococcus</i> spp. (%)	Koagülaz Pozitif (%)	<i>S. aureus</i> (%)
Çiğ Süt	100	98 (%98)	54 (%54)	48 (%48)
Pastörize Süt	100	6 (%6)	2 (%2)	1 (%1)
<b>Toplam</b>	200	104 (%52)	56 (%28)	49 (%24,5)

#### 4.2. ELISA SEA-SEE Enterotoksin sonuçları

Tüm süt örneklerine uygulanan ELISA sonucunda *S. aureus* saptanan 10 çiğ süt örneğinde Stafilocokal enterotoksin varlığı saptandı. Saptanan enterotoksin tipleri Tablo 4.2'de özetlendi. Pastörize sütlerin hiçbirinde enterotoksin saptanmadı.

**Tablo 4.2.** Saptanan enterotoksin tipleri

Örnek no	STAFİLOKOKAL ENTEROTOKSİN				
	SEA	SEB	SEC	SED	SEE
29	+				
47	+				
50	+				
108	+	+			+
126	+	+			+
130	+	+			+
133	+				+
174	+	+			+
192	+	+			+
198	+	+			+

#### 4.3. Real-time PCR sonuçları / *sea-see* Enterotoksinlerinin Sentezinden Sorumlu Genlerin Varlığının saptanması

Real-Time PCR testi sonucunda *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* enterotoksin gen tiplerinden en az biri 45 *S. aureus* izolatında saptandı ve bu genler sadece çiğ süt örneklerinden elde edilen izolatlarda tespit edildi. Pastörize süttten izole edilen *S. aureus* 'da (n=1) ise enterotoksin geni

saptanmadı. Tespit edilen enterotoksijenik gen bölgeleri ve stafilokokal enterotoksinlerin süt tipine göre dağılımları Tablo 4.3 ve Tablo 4.4’ de verildi. Pozitif örneklerin Real-Time PCR analiz sonuçları Şekil 4.1-4.5’ te gösterildi.

Analizler sonucunda çiğ sütlerde izole edilen *S. aureus* izolatlarının 45 (%93,8;45/48)’ inde söz konusu genlerden en az bir tanesinin bulunduğu, 3’ünün ise bu genleri taşımadığı tespit edildi. Enterotoksin genlerinin 45 izolatın 21 (%46,7)’inde tek tip, 15 (%33,3)’inde iki, 6 (13,3)’sında üç, 2 (%4,4)’sinde dört ve 1 (%2,2)’inde ise tüm gen bölgelerinin bir arada bulunduğu tespit edildi. İzolatlarda en çok *sec* geni (n=27) saptanmış olup, bunları *sea* (n=19), *seb* (n=15), *sed* (n=14) ve *see* (n=7) genlerinin takip ettiği belirlendi.

Real-Time PCR sonuçları (n=45) ile ELISA sonuçları (n=10) birbiriyle karşılaştırıldığında ELISA sonucunda sütlerde saptanan enterotoksin tiplerinin, aynı süttten izole edilen *S. aureus* izolatlarında saptanan enterotoksijenik gen bölgeleri (*sea-see*) ile uyumlu olduğu saptandı Çiğ süt örneklerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının 35 (35/45; %77,8)’inde bir veya daha fazla enterotoksin gen tipi/tipleri saptanmasına rağmen bu izolatlara ait sütlerde sentezlenmiş enterotoksin belirlenmedi.

**Tablo 4.3.** Saptanan enterotoksin gen bölgeleri

İzolat No (süt no)	Süt Tipi	Enterotoksin genleri				
		<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>see</i>
29	Çiğ Süt	+	-	-	-	-
47	Çiğ Süt	+	-	-	-	-
50	Çiğ Süt	+	-	-	-	-
63	Çiğ Süt	+	-	-	+	-
64	Çiğ Süt	+	-	-	-	-
65	Çiğ Süt	-	-	+	-	-
68	Çiğ Süt	+	-	+	+	-
69	Çiğ Süt	+	-	-	-	-
72	Çiğ Süt	-	-	+	+	-
73	Çiğ Süt	+	-	-	+	-
104	Çiğ Süt	-	-	+	+	-
105	Çiğ Süt	-	-	+	-	-
106	Çiğ Süt	-	-	+	+	-
108	Çiğ Süt	+	+	-	-	+
126	Çiğ Süt	+	+	+	-	+
130	Çiğ Süt	+	+	-	-	+
132	Çiğ Süt	-	-	+	+	-
133	Çiğ Süt	+	+	+	+	+
135	Çiğ Süt	-	-	+	-	-
139	Çiğ Süt	-	-	+	+	-
152	Çiğ Süt	-	-	+	-	-
161	Çiğ Süt	-	-	+	-	-
164	Çiğ Süt	-	-	+	-	-
166	Çiğ Süt	-	+	+	-	-
168	Çiğ Süt	-	+	+	-	-
173	Çiğ Süt	-	-	+	+	-

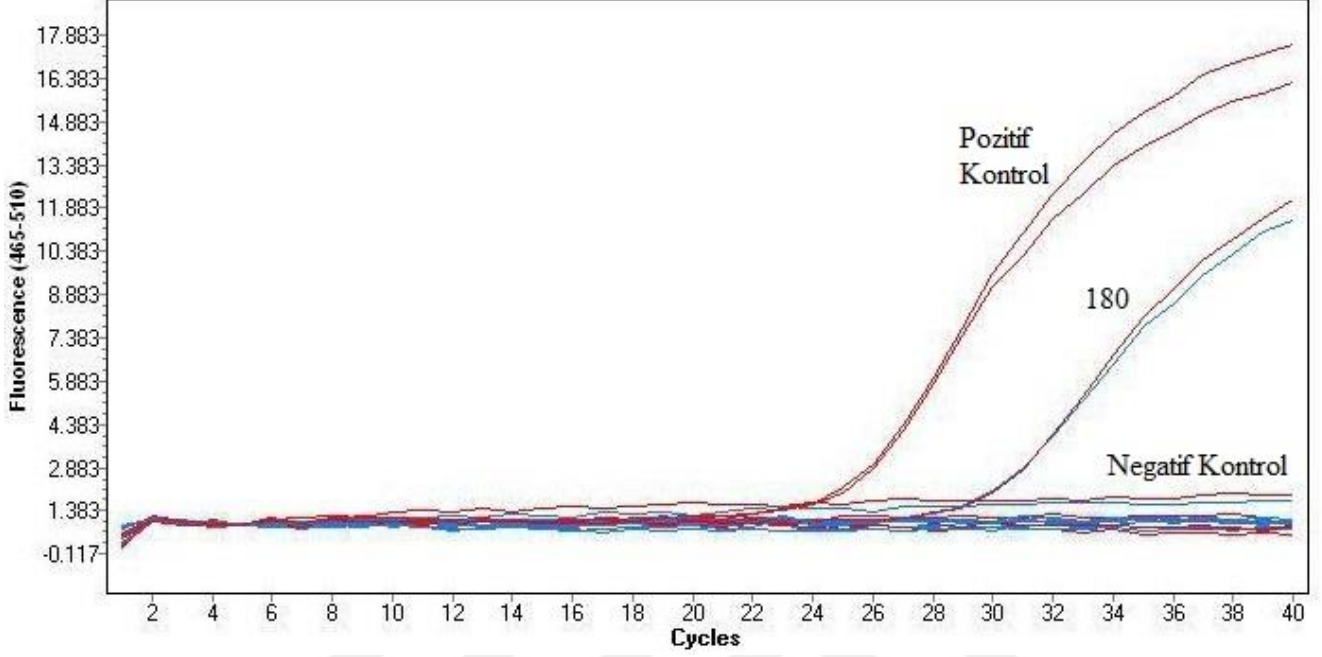
174	Çiğ Süt	+	+	+	-	+
176	Çiğ Süt	+	-	+	-	-
179	Çiğ Süt	-	-	+	+	-
180	Çiğ Süt	+	+	+	-	-
182	Çiğ Süt	-	-	+	+	-
183	Çiğ Süt	-	-	-	+	-
184	Çiğ Süt	-	+	-	-	-
185	Çiğ Süt	-	+	+	-	-
187	Çiğ Süt	-	-	+	-	-
188	Çiğ Süt	-	+	-	-	-
189	Çiğ Süt	-	+	-	-	-
190	Çiğ Süt	+	-	+	-	-
191	Çiğ Süt	-	-	+	-	-
192	Çiğ Süt	+	+	-	-	+
194	Çiğ Süt	-	+	-	-	-
195	Çiğ Süt	-	-	+	-	-
197	Çiğ Süt	-	-	-	+	-
198	Çiğ Süt	+	+	-	-	+
200	Çiğ Süt	+	-	-	-	-

Sarı: sadece *sea* ; Mavi: sadece *seb* ; Yeşil: sadece *sec* ; Pembe: sadece *sed* ; Mor: 2'li gen; Kırmızı: 3'lü gen; Gri: 4'lü gen; Turuncu: 5'li gen

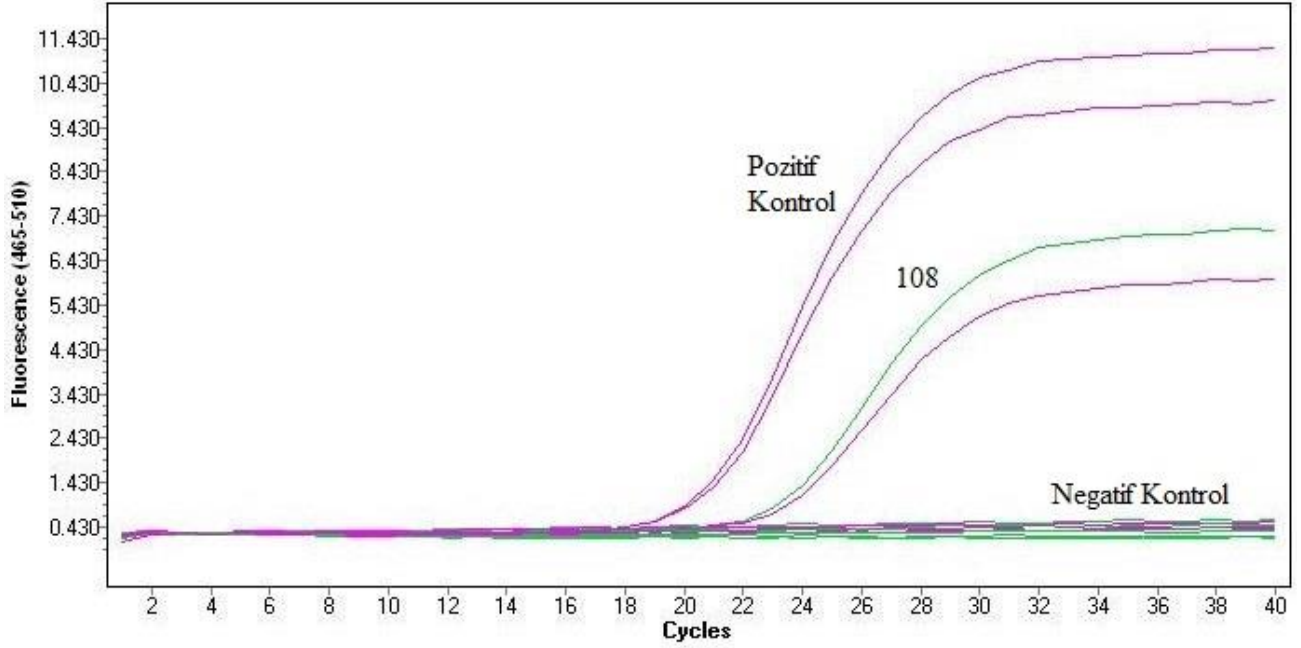
**Tablo 4.4.** Enterotoksijenik gen bölgeleri ve stafilocokal enterotoksinlerin süt tipine göre dağılımları

Süt Tipi	<i>S. aureus</i> izolat Sayısı	Enterotoksijenik Gen Taşıyan İzolat Sayısı	Enterotoksijenik Gen Taşımayan İzolat Sayısı	Enterotoksijenik Gen Bölgeleri
Çiğ Süt	48	45	3	<i>sea</i> (6) <i>seb</i> (4) <i>sec</i> (9) <i>sed</i> (2) <i>sea+sec</i> (2) <i>seb+sec</i> (3) <i>sea+sed</i> (2) <i>sec+sed</i> (8) <i>sea+seb+sec</i> (1) <i>sea+sec+sed</i> (1) <i>sea+seb+see</i> (4) <i>sea+seb+sec+see</i> (2) <i>sea+seb+sec+sed+see</i> (1)
Pastörize Süt	1	-	1	-

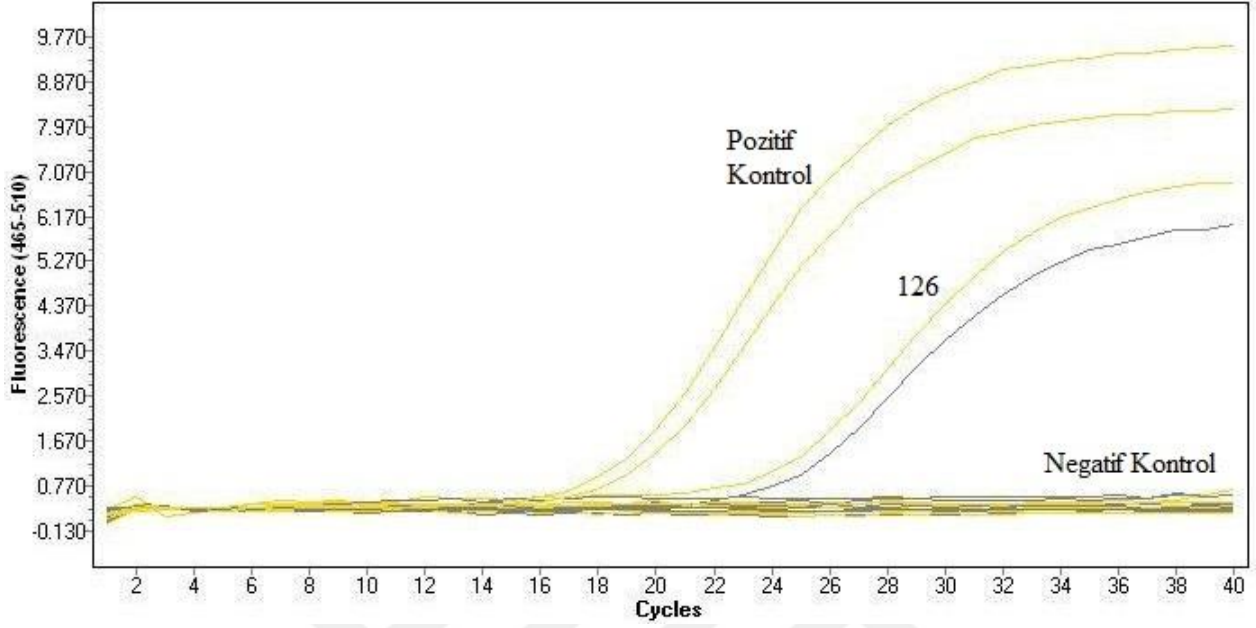
**Şekil 4.1.** SEA pozitif numunenin Real-Time PCR analiz sonucu (180 Numaralı Örnek)



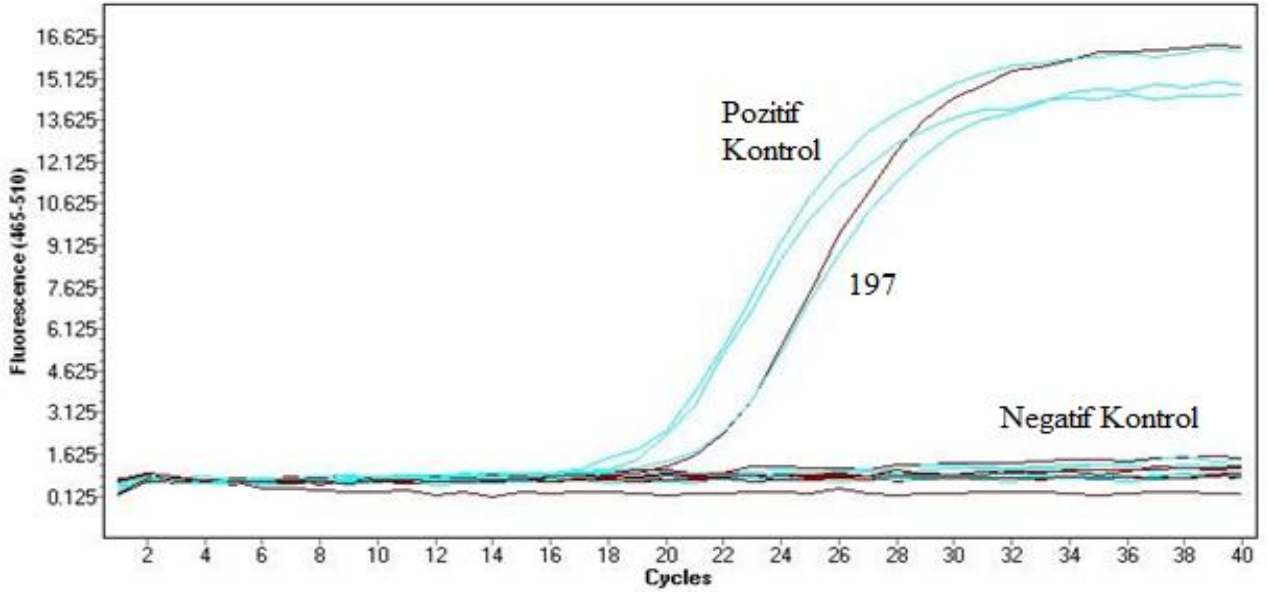
**Şekil 4.2.** SEB pozitif numunenin Real-Time PCR analiz sonucu (108 Numaralı Örnek)



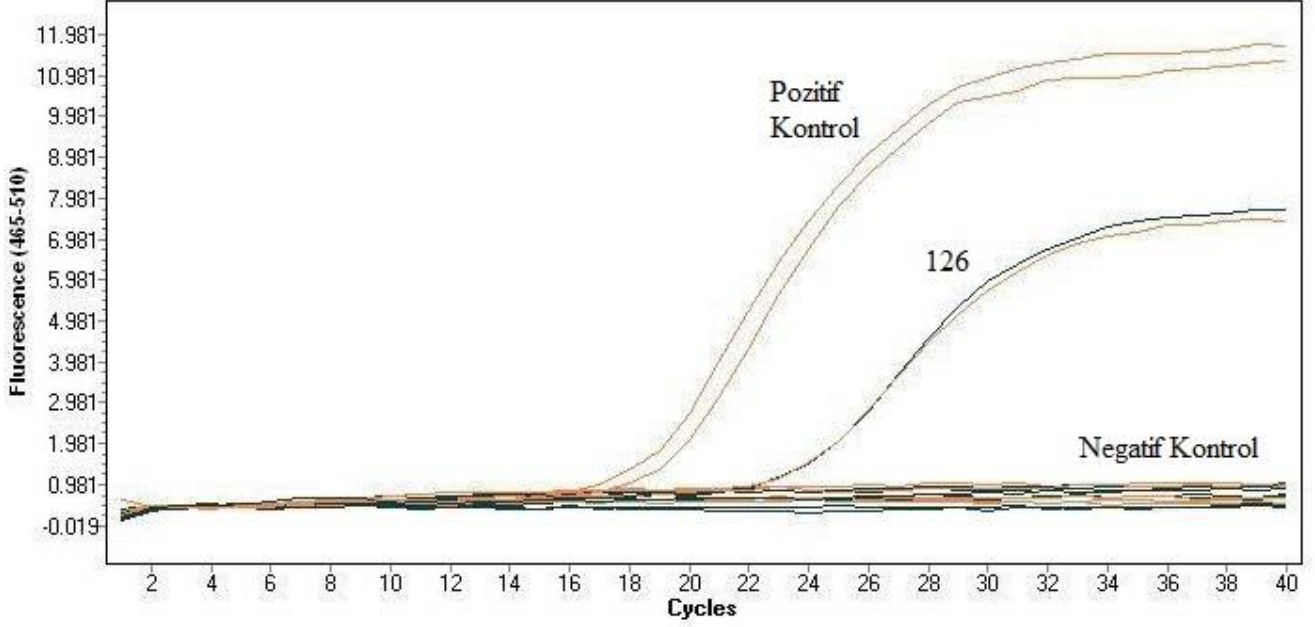
Şekil 4.3. SEC pozitif numunenin Real-Time PCR analiz sonucu (126 Numaralı Örnek)



Şekil 4.4. SED pozitif numunenin Real-Time PCR analiz sonucu (197 Numaralı Örnek)



Şekil 4.5. SEE pozitif numunenin Real-Time PCR analiz sonucu (126 Numaralı Örnek)

Tablo 4.5. *S. aureus* izolatlarında Real-Time PCR ile saptanan enterotoksijenik gen bölgeleri ve ELISA sonuçlarına göre sütlerde saptanan enterotoksin tiplerinin karşılaştırılması

İzolat No	Süt Tipi	Real-Time PCR					ELISA				
		<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>see</i>	SEA	SEB	SEC	SED	SEE
29	Çiğ Süt	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
47	Çiğ Süt	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
50	Çiğ Süt	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
63	Çiğ Süt	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
64	Çiğ Süt	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65	Çiğ Süt	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
68	Çiğ Süt	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
69	Çiğ Süt	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72	Çiğ Süt	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
73	Çiğ Süt	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
104	Çiğ Süt	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
105	Çiğ Süt	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
106	Çiğ Süt	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
108	Çiğ Süt	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+
126	Çiğ Süt	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+
130	Çiğ Süt	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+
132	Çiğ Süt	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
133	Çiğ Süt	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
135	Çiğ Süt	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
139	Çiğ Süt	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
152	Çiğ Süt	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
161	Çiğ Süt	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
164	Çiğ Süt	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
166	Çiğ Süt	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
168	Çiğ Süt	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-

173	Çiğ Süt	-	-	+	+	-	-	-	-	-
174	Çiğ Süt	+	+	+	-	+	+	+	-	+
176	Çiğ Süt	+	-	+	-	-	-	-	-	-
179	Çiğ Süt	-	-	+	+	-	-	-	-	-
180	Çiğ Süt	+	+	+	-	-	-	-	-	-
182	Çiğ Süt	-	-	+	+	-	-	-	-	-
183	Çiğ Süt	-	-	-	+	-	-	-	-	-
184	Çiğ Süt	-	+	-	-	-	-	-	-	-
185	Çiğ Süt	-	+	+	-	-	-	-	-	-
187	Çiğ Süt	-	-	+	-	-	-	-	-	-
188	Çiğ Süt	-	+	-	-	-	-	-	-	-
189	Çiğ Süt	-	+	-	-	-	-	-	-	-
190	Çiğ Süt	+	-	+	-	-	-	-	-	-
191	Çiğ Süt	-	-	+	-	-	-	-	-	-
192	Çiğ Süt	+	+	-	-	+	+	+	-	+
194	Çiğ Süt	-	+	-	-	-	-	-	-	-
195	Çiğ Süt	-	-	+	-	-	-	-	-	-
197	Çiğ Süt	-	-	-	+	-	-	-	-	-
198	Çiğ Süt	+	+	-	-	+	+	+	-	+
200	Çiğ Süt	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>TOPLAM</b>		<b>19</b>	<b>15</b>	<b>27</b>	<b>14</b>	<b>7</b>	<b>10</b>	<b>6</b>	<b>-</b>	<b>7</b>

## 5. TARTIŞMA

Stafilokokal gıda zehirlenmesi, gıda kaynaklı hastalıkların içinde ilk sıralarda yer almaktadır. Stafilocokal gıda zehirlenmeleri enterotoksijenik stafilocokların gıdanın 100 gramında 100 ng ya da daha yüksek miktarda enterotoksin sentezlemesi ile şekillendiği bildirilmiştir. Gıdalarda enterotoksijenik stafilocokların en az  $10^6$  kob/g (veya ml) düzeyindeki hücre popülasyonuna sahip olduğu şartlarda sentezlendiği bildirilmiştir. Süt ve süt ürünlerinden özellikle çiğ sütlerden *S. aureus* enterotoksijenik suşları sıklıkla izole edildiğinden Stafilocokal gıda zehirlenmesi yönünden halk sağlığında önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Kwon ve ark., 2004).

Çeşitli ülkelerde çiğ süt örneklerinde *S. aureus* prevalansları ile ilgili yapılan çalışmalarda, çiğ sütlerin değişik oranlarda *S. aureus* ile kontamine olduklarını saptamışlardır. Bu çalışmalara örnek olarak; Jorgensen ve ark. (2005) Norveç’ te çiğ inek ve keçi sütleri (n=433) ile süt ürünlerinin (n=82) de bulunduğu 515 adet örneği incelemişler, çiğ sığır (%75) ve keçi (%96,2) sütünde saptanan *S. aureus* prevalansının çok yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Adwan ve ark. (2005), Kuzey Filistin’de 250 çiğ süt ile yaptıkları bir çalışmada çiğ sütlerin %48’inin *S. aureus* ile kontamine olduğunu belirtmişlerdir. Vasil ve ark. (2007), Slovakya’da çiftliklerden 1275 adet koyun sütü toplamışlar ve bunlardan 125 adet *Staphylococcus* spp. izole ettiklerini bildirmişlerdir. Al-Ashmawy ve ark. (2016), Mısır’da satışta toplanan çiğ süt ve süt ürünlerinde metisiline dirençli *S. aureus*’un prevalansını, tüm süt ve süt ürünlerinde %53 (106/200) oranında saptamışlardır. Korpysa ve ark. (2011), Polonya’da yaptıkları bir çalışmada 237 adet çiğ süt örneğini incelemişler ve 77 tanesinin (%32,5) *S. aureus* ile kontamine olduğunu belirtmişlerdir. Kou ve ark. (2021), Çin’in kuzeyinde dört bölgeden topladıkları 144 perakende çiğ süt örneğinden %43,1 oranında *S. aureus* izole etmişlerdir. Araştırmacılar *S. aureus*’un, genellikle mastitis veya insan taşıyıcılarıyla ilişkili birçok çiğ süt kaynağını kontamine edebileceğini vurgulamışlar, sağımda ya da daha sonra uygun gıda işleme yöntemlerinin izlenmemesi ile bitmiş ürünün kirlenmesine yol açabileceğini bildirmişlerdir.

Türkiye’ de de günümüze kadar çiğ süt örnekleri ve gıdalarda birçok çalışma yapılmış, araştırmacılar değişen oranlarda *S. aureus* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Ertaş ve ark. (2010), Kayseri’de toplanan çiğ süt örneklerinin %42’sinden, Yılmaz ve Gönülalan (2010) Kayseri’de piyasada satılan çiğ sütlerde (n:60) %50 oranında, Gücükoğlu ve ark. (2012), Samsun’da

yaptıkları bir çalışmada 60 adet çiğ süt örneğinden %75 (45/60) oranında, Keyvan ve ark. (2020), Burdur'da 120 çiğ süt örneğinin 69'undan *S. aureus* izole etmişlerdir. Demirci ve ark. (2017) ise diğer çalışmaların aksine İstanbul Gıda Kontrol Laboratuvarı'na gelen süt, süt ürünleri, et ve et ürünlerini içeren 3650 farklı gıda örneğinden 36 (%0,98) *S. aureus* suşunun izole edildiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada piyasada satılan çiğ süt (n=100) örneklerinin %48'inde ve pastörize süt (n=100) örneklerinin %1'inde *S. aureus* izole edilmiştir. Satışa sunulmuş olan çiğ sütte saptanan yüzdelik oranın oldukça yüksek olduğu, çiğ sütün *S. aureus* kontaminasyonunu tüketici sağlığına zarar vermemek için en aza indirmek gerekliliğini ortaya koymuştur. Fırsatçı patojen karaktere sahip olan etken mastitis veya insan tarafından oluşturulan kontaminasyonlarla çiğ süt kaynağını kontamine ettiği düşünülmüştür.

Çiğ sütlerde enterotoksin varlığının belirlenmesi amacıyla birçok araştırma yapılmıştır. Jorgensen ve ark. (2005), Norveç'te *S. aureus* ile kontamine olduğunu saptadıkları sığır ve keçi çiğ sütlerinde, sığır orijinli çiğ sütlerin %22,1'inin ve keçi orijinli çiğ sütlerin de %57,3'ünün enterotoksin içerdiğini belirtmişlerdir. Rahimi ve ark. (2012), İran İsfahan'da stafilokokal enterotoksin varlığını araştırmak amacıyla tüketime sunulacak çiğ sütleri içeren 12 adet süt tankından farklı dönemlerde aldıkları 72 adet çiğ sütleri ELISA yöntemiyle incelemiş, %20,8 (15/72)'inin enterotoksin içerdiğini saptamışlardır. Sütlerde en çok 12 örnekle SEA %16,7'sinde tespit edilmiş ve bunu sırasıyla 9 örnekle SED (%12,5) ve 6 örnekle SEC (%8,3) izlemiştir. Hiçbir örnekte SEB ve SEE tespit etmediklerini bildirmişlerdir.

Türkiye'de bu konuda yapılan birçok çalışmaya örnek olarak, Ertaş ve ark. (2010), Kayseri'de %42 (42/100) oranında *S. aureus* izole edilmiş kontamine sütlerin %66,6'sının (28/42) enterotoksin içerdiğini bildirmişlerdir. Yılmaz ve Gönülalan (2010), Kayseri'de piyasada satılan çiğ sütlerde %50 oranında *S. aureus* izole ettiklerini ve sütlerin stafilokokal enterotoksin yönünden %61,7'sinin pozitif olduğunu belirtmişlerdir. Keyvan ve ark. (2020), Burdur'da topladıkları çiğ süt örneklerinden %57,5 (69/120) oranında *S. aureus* izole edildiğini ve izolasyonu olan sütlerin sadece 2'sinde enterotoksin saptadıklarını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada tüm çiğ süt örneklerine uygulanan ELISA sonucunda %10 oranında stafilokokal enterotoksin varlığı saptanmıştır. *S. aureus* izole edilen çiğ süt örneklerinin ise

%20,8'inin Stafilokokal enterotoksin ürettiği belirlenmiştir. Enterotoksin saptanan izolatlar incelendiğinde SEA (10/10)'nın tüm izolatlar tarafından sentezlendiği ve ilk sırada olduğu görülürken, ikinci sırada SEE (7/10) ve üçüncü sırada SEB (6/10)'nin bulunduğu, hiçbir izolatın ise SEC ve SED üretmediği belirlenmiştir. Gıdalarda enterotoksin oluşturma özelliğine sahip *S. aureus*'un SE tiplerini sentezleme sürelerinde SEA'nın en erken (üremenin erken logaritmik fazında) olduğu dikkate alındığında, sütlerde saptanan *S. aureus* varlığının izolatların süreye bağlı olarak enterotoksin salgılayabileceğini düşündürmüştür. Pastörize sütlerin hiçbirinde SE saptanmamış olması, pastörizasyon aşamasında bakterilerin (bir süt hariç) tamamen elimine olduğunu ve daha sonraki aşamalarda uygun ambalajlama teknikleriyle kontamine olmalarının önüne geçildiğini göstermiştir.

Birçok çalışmada gıdalardan izole edilen *S. aureus* izolatlarında SEA-SEE üretiminden sorumlu genlerin (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*) varlığı araştırılmıştır. Bu çalışmalarda tüketime sunulan çiğ süt ürünlerinde değişen oranlarda *S. aureus* kontaminasyonu olduğunu, izolatların değişen oranlarda enterotoksin geni taşıdığını, ayrıca mastitisli sütlerin de kaynak oluşturduğunu bildirmişlerdir (Adwan ve ark. (2005); Vasil ve ark. (2007); Korpysa ve ark. (2011); Neder ve ark. (2011); Rahimi ve ark. (2012); Santos ve ark. (2014); Riva ve ark. (2015); Pajic ve ark. (2016); Papadopulos ve ark. (2019)).

Jorgensen ve ark (2005), Norveç'te çiğ inek ve keçi sütlerinin sırasıyla %75 ve %96,2 oranında *S. aureus* ile kontamine olduğunu, sığır orijinli izolatların %22,1'inin ve keçi orijinli izolatların %57,3'ünün enterotoksin geni içerdiğini ve en çok *sec* genine sahip olduklarını saptamışlardır. Zouharova ve Rysanek (2008), Çek Cumhuriyeti'nde 440 tank sütü örneğinden izole ettikleri %15,9 *S. aureus* (70/440) izolatında SE üretimine karşılık gelen genleri %55,7 (39/70) oranında saptamışlardır. Stafilokokal enterotoksin genlerinin oranlarının %27,1 *sea*, %10 *seb*, %4,3 *seh*, %2,9 *sed*, %2,9 *sej* ve %1,4 *sec* olduğunu belirtmişlerdir. Mansour ve ark. (2017), Mısır'da yaptıkları bir çalışmada 33'ü inek ve 58'i manda olmak üzere toplam 141 çiğ süt örneği toplamışlar ve bunlarda *S. aureus* kontaminasyonu ve enterotoksin gen bölgelerinin varlığını incelemişlerdir. Bu 141 örneğin 23'ünün *S. aureus* ile kontamine olduğunu ve 6 izolatta ise enterotoksijenik gen bölgesi bulunduğunu belirtmişlerdir. *see* 6 izolatın tamamında bulunurken, 2 izolatta *seb*, 2 izolatta *sec* ve 3 izolatta ise *seb* ve *sec* enterotoksin sentezleyen gen bölgesi bulunduğunu bildirmişlerdir.

Baz ve ark. (2021), Mısır'da çeşitli klinik örneklerden elde ettikleri *S. aureus* izolatlarında stafilocok enterotoksinlerini kodlayan beş genin (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* ve *see*) %39,1 oranında bulunduğunu, izolatların %32,6'sında *sea*'nin en baskın toksin geni olduğunu, izolatların %4,3'ünde *seb* ve izolatların %2,1'inde de *sea* ve *seb*'nin birlikte saptandığını, *sec*, *sed* ve *see*'nin ise hiçbir izolatta tespit edilmediğini bildirmişlerdir. Çalışmalar arasında enterotoksin kodlayan genlerin prevalansındaki farklılıkların, izolatların kökeni, araştırma yerleri, farklı ülkelerdeki hijyen kuralları ve tanı yöntemleri gibi çeşitli faktörlerden kaynaklanabileceğini vurgulamışlardır.

Kou ve ark. (2021), Çin'in kuzeyinde dört bölgeden topladıkları 144 perakende çiğ süt örneğinden %43,1 oranında *S. aureus* izole ettiklerini, izolatların %12,9'unun en az bir virülans geni taşıdığını saptamışlar ve *S. aureus*'un kuzey Xinjiang'da çiğ sütte ciddi kirliliğe neden olduğunu ve bunun halk sağlığı üzerinde olumsuz bir etkisi bulunduğunu vurgulamışlardır.

Türkiye'de de gıdalarda, çiğ sütlerde ve süt ürünlerinde SE üretimine karşılık gelen genleri saptamaya yönelik birçok çalışma yapılmıştır. Boynukara ve ark. (2008), Van'da subklinik mastitisli 480 inekten izole ettikleri 106 *S. aureus* izolatının %25,5 (27/106) enterotoksijenik tipte olduğunu, 25 izolatın *sea*, 2 izolatın ise *seb* geni taşıdığını, hiçbir izolatta *sec* ve *sed*'ye rastlamadıklarını bildirmişler, elde ettikleri sonucu subklinik mastitisli sütlerde *sea*'nin diğer enterotoksin genlerine oranla daha fazla bulunduğu şeklinde yorumlamışlardır. Ertaş ve ark. (2010), Kayseri'de inceledikleri çiğ süt örneklerinden (n=100) %42 oranında *S. aureus* ve kontamine sütlerin de %66,6'sının (28/42) enterotoksin içerdiğini saptadıkları araştırmalarında izolatların %73,8'inin SE üretimine karşılık gelen genleri içerdiklerini 12'sinin (%38,7) *sea*, 2'sinin (%6,5) *seb*, 5'inin (%16,1) *sec*, 10'unun (%32,3) *sed* ve 2'sinin (%6,5) *sea* ve *sed* gen bölgesine sahip olduğunu bildirmişler ve *S. aureus*'ların ilgili gen bölgelerine sahip olmalarına rağmen süte enterotoksin salgılamayabileceği sonucuna varmışlardır. Gücükoğlu ve ark. (2012), Samsun'da yaptıkları bir çalışmada 60 adet çiğ süt örneğinin 45 tanesinden (%75) *S. aureus* izole etmişler, bu izolatların %13,7'sinin enterotoksin sentezleyen gen bölgelerine sahip olduklarını, bu genlerin %71,4'ünün *sea* %14,2'sinin *seb* ve %14,2'sinin *sea+seb* olduğunu belirtmişler, ürünlerin halk sağlığı için potansiyel olarak tehlikeli olduğunu vurgulamışlardır. Demirci ve ark. (2017), İstanbul Gıda Kontrol Laboratuvarı'na gelen süt, süt ürünleri, et ve et ürünlerini içeren 3650 farklı gıda örneğinden 36 (%0,98) *S. aureus* suşunun izole edildiğini ve bu suşların 14'ünün (%0,38)

enterotoksinjenik gen bölgesine sahip olduklarını, süt örneklerinden izole edilen 3 suştaki enterotoksijenik gen bölgelerinin 1 *sea*, 1 *sec* ve 1 *sea+sec+sed* olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmaya dahil edilen tüm ürünlerden izole edilen *S. aureus* izolatlarında en çok tespit edilen enterotoksijenik gen tipinin %19,4 ile *sea* (n=7) olduğunu ve kontamine ürünlerin başında da sütün geldiğini vurgulamışlardır.

Bu çalışmada Real-Time PCR testi sonucunda sadece çiğ süt örneklerinden elde edilen izolatlarda %93,8 (45/48) *sea-see* enterotoksin gen tiplerinden en az biri belirlenmiştir. Enterotoksin genlerinin %46,7 (21/45)'sinde tek tip, %33,3 (15/45)'ünde iki, 13,3 (6/45)'ünde üç, %4,4 (4/45)'ünde dört ve %2,2 (1/45)'sinde ise tüm gen bölgelerinin bir arada bulunduğu tespit edilmiştir. İzolatlarda en çok *sec* geni (n=27) saptanmış olup, bunları *sea* (n=19), *seb* (n=15), *sed* (n=14) ve *see* (n=7) genlerinin takip ettiği belirlenmiştir. Sonuçta sütlerde saptanan enterotoksin tiplerinin, aynı süttten izole edilen *S. aureus* izolatlarında saptanan enterotoksijenik gen bölgeleri (*sea-see*) ile uyumlu olduğu görülmüş, çiğ süt örneklerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının %77,8 (35/45)'inde bir veya daha fazla enterotoksin gen tipi/tipleri saptanmasına rağmen bu izolatlara ait sütlerde sentezlenmiş enterotoksin belirlenmemiştir. Bu durum, *S. aureus*'un hangi aşamada olursa olsun özellikle çiğ sütleri kontamine etmesinin olası bir gıda zehirlenmesi için potansiyel bir kaynak olduğunu, enterotoksin gen tiplerinin varlığının, enterotoksin saptanmasa bile daha sonraki sürelerde aktif hale gelebileceğini düşündürmüştür.

Yapılan çalışmalarda araştırmacılar (Küplülü (2002); Gündoğan ve ark. (2005); Küçükçetin ve Milci (2008)) pastörize sütlerin de gıda zehirlenmelerinde önemli olduğunu, *S. aureus* ile kontamine olan sütte pastörizasyon öncesi enterotoksin üretilebileceğini, pastörizasyonla *S. aureus*'un öldürebileceğini ancak oluşmuş enterotoksinlerin yok edilemeyeceğini vurgulamışlar, pastörizasyon öncesi ve sonrası sütün potansiyel tehdidini de ortaya koymuşlardır.

Bu çalışmada pastörize sütlerde bir süt dışında *S. aureus* izole edilmemiş ve sütlerde oluşmuş enterotoksin ve etkende enterotoksin genleri saptanmamıştır. Bu verilerin iyi bir sonuç olduğu, ancak bu sütün başka bir işlem aşamasında (örneğin dondurma üretimi) kontamine olabileceği, bu nedenle, üretimden tüketime kadar her bir aşamada hijyen koşullarına uyulması gerekliliği düşünülmüştür.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, bu çalışmada tüketime sunulmuş çiğ sütlerde %98 *Staphylococcus* spp. ve %48 *S. aureus* tespit edildi. Çiğ sütlerden izole edilen izolatların %93,8'i gibi yüksek bir oranının enterotoksin gen tipi/tiplerini taşıdığı ve etkenle kontamine olmuş bu sütlerin bir kısmının da süte salınmış halde enterotoksin içerdiği belirlendi. Bu değerler çiğ süt ve süt ürünlerinin enterotoksin üreten *S. aureus*'un önemli rezervuarı olduğunu düşündürmüştür. Bu sonuç aynı zamanda çiğ sütün potansiyel tehdidini de ortaya koymakta, kontrol amacıyla izleme programları ve önleyici tedbirlerin uygulanması gerektiğini göstermektedir. Ek olarak, hayvan sahipleri, üreticiler, ya da bakıcılar ve aynı zamanda tüketicilerin de eğitimi ve bilgilendirilmesi gerekliliği önem arz etmektedir. Bu nedenle, özellikle enterotoksin üreten *S. aureus* 'lar yönünden çiğ süt tüketiminin neden olduğu gıda zehirlenmesi riskini azaltmak için, ilgili kurumlar, çiğ sütün mikrobiyolojik analizlerini düzenli olarak yapmalı ve özellikle ürünlerin toplama, taşıma ve satış yönetimini kontrol altında tutarak standardize edilmelidirler.

## 7. KAYNAKLAR

- Adams M.R., Moss M.O. (2008): Food microbiology Third Edition. Cambridge, RSC Publishing, 252-256.
- Adwan, G. M., Abu-Shanab, B., & Adwan, K. (2006). Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in raw milk in the North of Palestine. *Turkish Journal of Biology*, 29(4), 229-232.
- Aitichou, M., Henkens, R. , Sultana, A. M. , Ulrich, R. G. , & Ibrahim, M. S. (2004). Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A and B genes with PCR-EIA and a hand-held electrochemical sensor. *Molecular and cellular probes*, 18(6), 373-377.
- Akan, M. (2006). *Staphylococcus* infeksiyonları. *Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar)*. Ed. Nejat Aydın, Jale Paracıkoğlu. İlke Emek Yayınları, Ankara, Bölüm, 2, 6-9.
- Al-Ashmawy, M. A., Sallam, K. I., Abd-Elghany, S. M., Elhadidy, M., & Tamura, T. (2016). Prevalence, molecular characterization, and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products. *Foodborne Pathogens and Disease*, 13(3), 156-162.
- Anonim (2017). Çiğ Sütün Arazına Dair Tebliğ 2017/20.
- Arda, M., Aydın, N., Ilgaz, A., Minbay, A., Kahraman, M., İzgür, M., Leloğlu, N., Akay, Ö., Diker, K.S., (1997). “Özel Mikrobiyoloji” *Medisan Yayın Serisi Ankara*, No:26, 4. Baskı, 39-44.
- Arda M., Minbay A., Aydın N. (1982). Özel Mikrobiyoloji. Ankara Ankara Üniversitesi Basımevi; 96-106.
- Argudín, M. Á., Mendoza, M. C., & Rodicio, M. R. (2010). Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*, 2(7), 1751-1773.
- Asao, T., Kumeda, Y., Kawai, T., Shibata, T., Oda, H., Haruki, K., ... & Kozaki, S. (2003). An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiology and infection*, 130(1), 33.

Atlı, O. (2007). *Klinik örneklerden izole edilen staphylococcus aureus suşlarının antibiyotik duyarlılığının incelenmesi* (Doctoral dissertation, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı).

Balaban, N., & Rasooly, A. (2000). Staphylococcal enterotoxins. *International journal of food microbiology*, 61(1), 1-10.

Bannerman, T.L. (2003). *Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase-Positive Cocci That Grow Aerobically*. İçinde *Manual of Clinical Microbiology*, Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Pfaller, M.A., Tenover, R.H. (ed.), Vol: 8, ASM press, Washington, U.S.A., 384-404.

Baysal A. (2004). Beslenme. *Ankara, Hatiboğlu Yayınları, Bölüm II Besinler, Süt*, 10. Baskı, 268-275.

Baz, A. A., Bakhiet, E. K., Abdul-Raouf, U., & Abdelkhalek, A. (2021). Prevalence of enterotoxin genes (SEA to SEE) and antibacterial resistant pattern of Staphylococcus aureus isolated from clinical specimens in Assiut city of Egypt. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 22(1), 1-12.

Baz, E., Güven, A., Sezer, Ç., & Duman, B. (2003). Kars ilinde satışı sunulan çiğ süt ve taze beyaz peynirlerin koliform grubu bakteri, E. coli ve E. coli O157: H7 yönünden incelenmesi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 9(2), 165-167.

Becker, K., Skov, R. L., & von Eiff, C. (2015). Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase-positive cocci. *Manual of clinical microbiology*, 354-382.

Bendahou, A., Lebbadi, M., Ennane, L., Essadqui, F. Z., & Abid, M. (2008). Characterization of Staphylococcus species isolated from raw milk and milk products (lben and jben) in North Morocco. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 2(03), 218-225.

Benkerroum, N. (2018). Staphylococcal enterotoxins and enterotoxin-like toxins with special reference to dairy products: An overview. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(12), 1943-1970.

- Bergdoll, M.S. (1989). *Staphylococcus aureus*. İçinde Doyle, M. P., Dekker, M. (eds.) *Foodborne bacterial pathogens*, New York, 463-523.
- Bergdoll, M. S., & Lee Wong, A. C. (2006). Staphylococcal intoxications. 523-562. *Foodborne Infections and Intoxications, Academic Press, Elsevier Inc., San Diego, California*.
- Bergdoll, M., Reiser, R., Crass, B., Robbins, R., & Davis, J. (1981). A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic-shock-syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. *The Lancet*, 317(8228), 1017-1021.
- Bhatia, A., & Zahoor, S. (2007). *Staphylococcus aureus* enterotoxins: a review. *J Clin Diagn Res*, 1(3), 188-97.
- Biçer A.T. (2009). Hastane izolatu *Staphylococcus aureus* ve koagülaz negatif staphylococcus suşlarında metisilin direncinin farklı yöntemlerle araştırılması. *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Uzmanlık Tezi, Adana*.
- Bilgehan, H. (1995). Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 2. Baskı, İzmir: Barış yayınları, Fakülteler Kitabevi, 493-504.
- Bilgehan, H. (2000). Klinik Mikrobiyoloji, Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. 10. Baskı. Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, 239-268.
- Boyle-Vavra, S., & Daum, R. S. (2007). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Pantón–Valentine leukocidin. *Laboratory investigation*, 87(1), 3-9.
- Boynukara, B., Gulhan, T., Alisarli, M., Gurturk, K., & Solmaz, H. (2008). Classical enterotoxigenic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Van, Turkey. *International journal of food microbiology*, 125(2), 209-211.
- Brakstad, O. G., Aasbakk, K., & Maeland, J. A. (1992). Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. *Journal of clinical microbiology*, 30(7), 1654-1660.

- Bremer, P. J., Fletcher, G. C., & Osborne, C. (2004). *Staphylococcus aureus*. *New Zealand Instit.*
- Bukowski, M., Wladyka, B., & Dubin, G. (2010). Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins*, 2(5), 1148-1165.
- Cauwelier, B., Gordts, B., Descheemaeker, P., & Van Landuyt, H. (2004). Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin (30 µg) for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 23(5), 389-392.
- Cengiz, A. T. (1999). *Staphylococcus*. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Güneş Kitabevi, 339-349.
- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, Í., & Penadés, J. R. (2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal of bacteriology*, 183(9), 2888-2896.
- Çalık, Z. (1998). *Koagülaz olumlu ve olumsuz stafilocok suşlarında metisilin direnci ve çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıkları* (Doctoral dissertation, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniveristesesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı 15: 556-572).
- Da Silva, E. R., do Carmo, L. S., & Da Silva, N. (2005). Detection of the enterotoxins A, B, and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. *Veterinary microbiology*, 106(1-2), 103-107.
- Demirci, M., Tombul, F., Yiğın, A., & Altun, S. K. (2017). Investigation of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A to E via real-time PCR from various food samples in Turkey. *Pak Vet J*, 37(1), 100-104.
- Devriese, L.A., et al. (2005). *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(4), 1569-1573.
- Dinges, M. M., Orwin, P. M., & Schlievert, P. M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology reviews*, 13(1), 16-34.

- Do Carmo, L. S., Dias, R. S., Linardi, V. R., de Sena, M. J., dos Santos, D. A., de Faria, M. E., ... & Heneine, L. G. (2002). Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiology*, 19(1), 9-14.
- Duyuk, G. (2015). *Çiğ sütlerde staphylococcus aureus ve stafilokokal enterotoksin varlığının belirlenmesi* (Master's thesis, Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü).
- Ektik, N. (2015). Balıkesir ilinde süt ve süt ürünlerindeki metisilin dirençli staphylococcus aureus' un prevalansı ve antibiyotik dirençliliği. Balıkesir Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin Hijyeni ve Teknolojisi Yüksek Lisans Tezi.
- Ellis, M., Serreli, A., Colque-Navarro, P., Hedstrom, U., Chacko, A., Siemkowicz, E., & Möllby, R. (2003). Role of staphylococcal enterotoxin A in a fatal case of endocarditis. *Journal of medical microbiology*, 52(2), 109-112.
- Erol, İ. (2007). Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi Ders Kitabı. *Pozitif Matbaacılık Ltd. Şti*, 135-144.
- Erol İ. & İşeri, Ö. (2004). Stafilokokal enterotoksinler. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 51(3), 239-249.
- Ertaş, N., & Gönülalan, Z. (2010). Kayseri ilinde satılan çiğ sütlerde *Staphylococcus aureus* ve enterotoksinlerinin varlığı üzerine araştırmalar. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 24(1), 11-15.
- Fisher, E. L., Otto, M., & Cheung, G. Y. (2018). Basis of virulence in enterotoxin-mediated staphylococcal food poisoning. *Frontiers in microbiology*, 9, 436.
- Fox, P. F. (2003). Milk proteins: general and historical aspects. In *Advanced dairy chemistry—1 proteins* (pp. 1-48). Springer, Boston, MA.
- Freney, J., Kloos, W. E., Hajek, V., Webster, J. A., Bes, M., Brun, Y., & Vernozy-Rozand, C. (1999). Recommended minimal standards for description of new staphylococcal species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(2), 489-502.

- Garrity, G. M., Bell, J. A., & Lilburn, T. G. (2004). Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology. *New York*.
- Gayathri, D., & Prakash, M. S. (2014). Evaluation of developed multiplex PCR technique of staphylococcus aureus for specificity and its efficiency on food samples. *J. Biol. Engg. Res. & Rev*, 1(2), 13-19.
- Gücüköğlü, A., Onur Kevenk, T., Uyanik, T., Çadirci, Ö., Terzi, G., & Alişarlı, M. (2012). Detection of enterotoxigenic Staphylococcus aureus in raw milk and dairy products by multiplex PCR. *Journal of Food Science*, 77(11), M620-M623.
- Gülbandılar, A. (2015). *Kütahya yöresinde çeşitli kaynaklardan elde edilen Staphylococcus aureus izolatlarının karakterizasyonu* (Doctoral dissertation, Anadolu University (Turkey)).
- Gündoğan, N., Çitak, S., Yücel, N., Devren, A. (2005). A note on the incidence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and chicken samples, *Meat Science*, 69, 807-810.
- Hart, M. E., Hart, M. J., & Roop, A. J. (2009). Genotypic and phenotypic assessment of hyaluronidase among type strains of a select group of staphylococcal species. *International Journal of Microbiology*, 2009.
- Hennekinne, J. A., Ostry, A., Guillier, F., Herbin, S., Pruffer, A. L., & Dragacci, S. (2010). How should staphylococcal food poisoning outbreaks be characterized *Toxins*, 2(8), 2106-2116.
- Henry, R. (2013). Staphylococcus. *Emerging Infectious Diseases*, 19, 1553.
- Holzinger, D., Gieldon, L., Mysore, V., Nippe, N., Taxman, D. J., Duncan, J. A., ... & Löffler, B. (2012). Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin induces an inflammatory response in human phagocytes via the NLRP3 inflammasome. *Journal of leukocyte biology*, 92(5), 1069-1081.
- Hu, D. L., & Nakane, A. (2014). Mechanisms of staphylococcal enterotoxin-induced emesis. *European journal of pharmacology*, 722, 95-107.

Huseby, M., Shi, K., Brown, C. K., Digre, J., Mengistu, F., Seo, K. S., ... & Earhart, C. A. (2007). Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*, 189(23), 8719-8726.

İnal, M. (2014). Farklı süre ve sıcaklıklarda muhafaza edilen çiğ sütlerde koagulaz pozitif staphylococcus türlerinin dağılımı ve stafilokokal enterotoksin oluşumu. Selçuk Üniversitesi, Yayınlanmış doktora tezi, Konya.

İnal, T. (1990). *Süt ve süt ürünleri hijyen ve teknolojisi*. İstanbul Final Ofset, 34-59.

İşeri, Ö., & Erol, İ. (2009). Hindi etinden kaynaklanan başlıca bakteriyel infeksiyon ve intoksikasyonlar. *Ankara Üniv Vet Fak Dergisi*, 56: 47-54.

Jorgensen, H. J., Mork, T., Caugant, D. A., Kearns, A., & Rorvik, L. M. (2005). Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from Norwegian bulk milk. *Applied and environmental microbiology*, 71(12), 8352-8361.

Kaneko, J., & Kamio, Y. (2004). Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 68(5), 981-1003.

Keyvan, E., Yurdakul, O., & Erdi, Ş. E. N. (2020). Staphylococcal Enterotoxins and Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in Raw Milk: A Screening Study. *Kocatepe Veterinary Journal*, 13(2), 104-109.

Kılıç, S. (2007). *Hindi etlerinden izole edilen koagulaz pozitif stafilokokların enterotoksin oluşturma yeteneklerinin EIA (Enzyme Immuno Assay) yöntemiyle belirlenmesi* (Doctoral dissertation, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü).

Koçak Kızanlık P. (2019). Çeşitli kaynaklardan izole edilen staphylococcus aureus' un bazı virulens özelliklerinin belirlenmesi. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC (1997). Textbook of Diagnostic Microbiology. *Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins*, 539-565.

Korpysa-Dzirba, WERONIKA, & Osek, J. (2011). Identification of genes encoding classical staphylococcal enterotoxins in *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 1(55).

Kou, X., Cai, H., Huang, S., Ni, Y., Luo, B., Qian, H., ... & Wang, X. (2021). Prevalence and Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolated From Retail Raw Milk in Northern Xinjiang, China. *Frontiers in Microbiology*, 2187.

Krakauer, T. (1999). Immune response to staphylococcal superantigens. *Immunologic research*, 20(3), 163-173.

Kumar, T. K., Murali, H. S., & Batra, H. V. (2009). Simultaneous detection of pathogenic *B. cereus*, *S. aureus* and *L. monocytogenes* by multiplex PCR. *Indian journal of microbiology*, 49(3), 283-289.

Kutlu, S. B. (2006). Çeşitli klinik materyallerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında metisilin direnci ve E-Test ile vankomisin MIC değerlerinin araştırılması. *İstanbul. Uzmanlık Tezi. T.C. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği*.

Küçükçetin, A., & Milci, S. (2008). *Staphylococcus aureus* ile kontamine olan peynirlerden kaynaklanan gıda zehirlenmeleri. *Gıda*, 33(3), 129-135.

Küplülü, Ö. (2002). Pastörize sütlerde ELISA tekniği ile stafilokokal enterotoksin varlığının belirlenmesi. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 26(3), 631-637.

Kwon, N. H., Kim, S. H., Park, K. T., Bae, W. K., Kim, J. Y., Lim, J. Y., ... & Park, Y. H. (2004). Application of extended single-reaction multiplex polymerase chain reaction for toxin typing of *Staphylococcus aureus* isolates in South Korea. *International journal of food microbiology*, 97(2), 137-145.

Ladhani, S. (2003). Understanding the mechanism of action of the exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 39(2), 181-189.

Lamprell, H., Villard, L., Chambra, J. F., Borges, E., Maurin, F., Mazerolles, G., ... & Kodjo, A. (2004). Identification and biotyping of coagulase positive staphylococci (CPS) in ripened

French raw milk cheeses and their in vitro ability to produce enterotoxins. *Revue de médecine vétérinaire*, 155 (2), 92-96.

Leloğlu, N. (1999). Staphylococcus ve Staphylococcus İnfeksiyonları. *Özel Mikrobiyoloji*, 39-45.

Le Loir, Y., Baron, F., & Gautier, M. (2003). Staphylococcus aureus and food poisoning. *Genetics and molecular research: GMR*, 2(1), 63-76.

Letertre, C., Perelle, S., Dilasser, F., & Fach, P. (2003). Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the egc cluster of Staphylococcus aureus. *Journal of applied microbiology*, 95(1), 38-43.

Lina, G., Bohach, G. A., Nair, S. P., Hiramatsu, K., Jouvin-Marche, E., & Mariuzza, R. (2004). Standard nomenclature for the superantigens expressed by Staphylococcus. *The Journal of infectious diseases*, 189(12), 2334-2336.

Ljevaković-Musladin, I., Vodnica-Martucci, M., Krilanović, M., & Kozačinski, L. (2022). Occurrence, enterotoxin production and antimicrobial susceptibility of Staphylococcus aureus isolates from domestic cheeses in the Dubrovnik area. *Veterinarska stanica*, 53(2), 141-153.

Mansour, A. S., Wagih, G. E. S., Morgan, S. D., Elhariri, M., El-Shabrawy, M. A., Abuelnaga, A. S., & Elgabry, E. A. (2017). Detection of Staphylococcus aureus enterotoxigenic strains in bovine raw milk by reversed passive latex agglutination and multiplex polymerase chain reaction. *Veterinary world*, 10(8), 843.

Mariutti, R. B., Tartaglia, N. R., Seyffert, N., de Paula Castro, T. L., Arni, R. K., Azevedo, V. A., ... & Nishifuji, K. (2017). Exfoliative toxins of Staphylococcus aureus. *The Rise of Virulence and Antibiotic Resistance in Staphylococcus aureus. InTech*, 127-143.

Metin, M. (2001). Süt Teknolojisi: Sütün Bileşimi ve İşlenmesi. 3. Baskı, *EÜ Mühendislik Fakültesi Yayınları, İzmir*; 793s.

Miller, G. D., Jarvis, J. K., & McBean, L. D. (2000). The importance of milk and milk products in the diet. *Handbook of dairy foods and nutrition*, 1-27.

Morandi, S., Brasca, M., Lodi, R., Cremonesi, P., & Castiglioni, B. (2007). Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. *Veterinary microbiology*, *124*(1-2), 66-72.

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

Müştak, H. K., & Esendal, Ö. M. (2008). *Staphylococcus aureus* ekzotoksinleri. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*; *19*, 69-74.

Neder, V. E., Canavesio, V. R., & Calvinho, L. F. (2011). Presence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk tank milk from Argentine dairy farms. *Revista Argentina de Microbiología*, *43*(2), 104-106.

Normanno, G., Firinu, A., Virgilio, S., Mula, G., Dambrosio, A., Poggiu, A., ... & Celano, G. V. (2005). Coagulase-positive *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *International journal of food microbiology*, *98*(1), 73-79.

Oliver, S. P., Jayarao, B. M., & Almeida, R. A. (2005). Foodborne pathogens, mastitis, milk quality, and dairy food safety. In *NMC Annual Meeting Proceedings* (Vol. 1).

Ostyn, A., De Buyser, M. L., Guillier, F., Groult, J., Felix, B., Salah, S., ... & Hennekinne, J. A. (2010). First evidence of a food poisoning outbreak due to staphylococcal enterotoxin type E, France, 2009. *Eurosurveillance*, *15*(13), 19528.

Otto, M. (2014). *Staphylococcus aureus* toxins. *Current opinion in microbiology*, *17*, 32-37.

Öncül, A. B., (2006). Toplumda ve hastanede edinilmiş nazal stafilokok taşıyıcılığında risk faktörleri ve direnç durumlarının karşılaştırılması (Uzmanlık tezi). *T.C. Sağlık Bakanlığı Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul*.

Pajić, M., Boboš, S., Velebit, B., Rašić, Z., Katić, V., Radinović, M., ... & Babić, M. (2016). Prevalence and molecular characterization of enterotoxin-producing strains of *Staphylococcus aureus* isolated from Serbian dairy cows. *Acta Veterinaria-Beograd*, *66*(4), 466-477.

- Papadopoulos, P., Angelidis, A. S., Papadopoulos, T., Kotzamanidis, C., Zdragas, A., Papa, A., ... & Sergelidis, D. (2019). Staphylococcus aureus and methicillin-resistant S. aureus (MRSA) in bulk tank milk, livestock and dairy-farm personnel in north-central and north-eastern Greece: Prevalence, characterization and genetic relatedness. *Food microbiology*, *84*, 103249.
- Pottumarthy, S., Schapiro, J. M., Prentice, J. L., Houze, Y. B., Swanzy, S. R., Fang, F. C., & Cookson, B. T. (2004). Clinical isolates of Staphylococcus intermedius masquerading as methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Journal of clinical microbiology*, *42*(12), 5881-5884.
- Rahimi, E., Momtaz, H., Shakerian, A., & Kavyani, H. R. (2012). The detection of classical enterotoxins of Staphylococcus aureus in raw cow milk using the ELISA method. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, *36*(3), 319-322.
- Riva, A., Borghi, E., Cirasola, D., Colmegna, S., Borgo, F., Amato, E., ... & Morace, G. (2015). Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in raw milk: Prevalence, SCC mec typing, enterotoxin characterization, and antimicrobial resistance patterns. *Journal of food protection*, *78*(6), 1142-1146.
- Sandel, M. K., & McKillip, J. L. (2004). Virulence and recovery of Staphylococcus aureus relevant to the food industry using improvements on traditional approaches. *Food Control*, *15*(1), 5-10.
- Santos, V. M., Martins, H. B., Rezende, I. S., Barbosa, M. S., Andrade, E. F., Souza, S. G., ... & Marques, L. M. (2014). Virulence factor profile of Staphylococcus aureus isolated from bovine milk from Brazil. *Food and Nutrition Sciences*, *2014*.
- Sasaki, T., Tsubakishita, S., Tanaka, Y., Sakusabe, A., Ohtsuka, M., Hirotaki, S., ... & Hiramatsu, K. (2010). Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. *Journal of clinical microbiology*, *48*(3), 765-769.
- Sawant, A. A., Gillespie, B. E., & Oliver, S. P. (2009). Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative Staphylococcus species isolated from bovine milk. *Veterinary microbiology*, *134*(1-2), 73-81.

- Schleifer, K. H., & Kroppenstedt, R. M. (1990). Chemical and molecular classification of staphylococci. *Journal of applied bacteriology*, 69, 9-24.
- Schneewind, O., & Missiakas, D. (2008). Staphylococcus aureus and Related Staphylococci. In *Practical Handbook of Microbiology*. CRC Press, 295-314.
- Schmid, D., Fretz, R., Winter, P., Mann, M., Höger, G., Stöger, A., ... & Allerberger, F. (2009). Outbreak of staphylococcal food intoxication after consumption of pasteurized milk products, June 2007, Austria. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 121(3), 125-131.
- Seo, K. S., & Bohach, G. A. (2012). Staphylococcus aureus. *Food microbiology: Fundamentals and frontiers*, 547-573.
- Silversides, J. A., Lappin, E., & Ferguson, A. J. (2010). Staphylococcal toxic shock syndrome: mechanisms and management. *Current infectious disease reports*, 12(5), 392-400.
- Smith, P. B., Hancock, G. A., & Rhoden, D. L. (1969). Improved medium for detecting deoxyribonuclease-producing bacteria. *Applied microbiology*, 18(6), 991-993.
- Soriano, J. M., Font, G., Moltó, J. C., & Mañes, J. (2002). Enterotoxigenic staphylococci and their toxins in restaurant foods. *Trends in Food Science & Technology*, 13(2), 60-67.
- Spaulding, A. R., Salgado-Pabón, W., Kohler, P. L., Horswill, A. R., Leung, D. Y., & Schlievert, P. M. (2013). Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. *Clinical microbiology reviews*, 26(3), 422-447.
- Sutherland, J., & Varnam, A. (2002). Enterotoxin-producing staphylococcus, shigella, yersinia, vibrio, aeromonas and plesiomonas. *Foodborne pathogens*, 384-415.
- Şardan Y.Ç., (2000). Metisilin dirençli Staphylococcus aureus infeksiyonlarının epidemiyolojisi ve kontrolü. *Hastane İnfek Derg*, 4, 205-207.
- Takagi, Y. (1990). Action site of exfoliative toxin on keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, 94, 582.
- Tang, J., Kang, M., Chen, H., Shi, X., Zhou, R., Chen, J., & Du, Y. (2011). The staphylococcal nuclease prevents biofilm formation in Staphylococcus aureus and other biofilm-forming bacteria. *Science China Life Sciences*, 54(9), 863-869.

Tekinşen, O. C., & Nizamlıoğlu M. (2001). Süt Kimyası. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Konya.

TS 6582-3 EN ISO 6888-3 (2004). TSE Türk Standartları Enstitüsü. Gıda ve hayvan yemleri mikrobiyolojisi–Koagülaz-Pozitif stafilokok sayımı için yatay yöntem (staphylococcus aureus ve diğer türler) bölüm 3: Belirleme ve düşük sayımlar için ems tekniği, Ankara.

Tükel Ç, Doğan H. B. (2000). Gıda mikrobiyolojisi ve uygulamaları. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara: Sim Matbacılık Ltd.Şti. Genişletilmiş 2. Baskı, 357-365.

Tünger, A. (2004). Staphylococcus aureus: Mikrobiyoloji, patogenez ve epidemiyoloji. *Gram-Pozitif Bakteri İnfeksiyonları, 1st edn. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 9-22.*

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

Ünal, R. N., & Besler, H. T. (2008). Beslenmede sütün önemi. *Sağlık Bakanlığı Yayın, 727.*

Ünlütürk, A., & Turantaş, F. (1999). Gıda Güvenliği, Mikrobiyolojik Kriterler ve Hızlı Mikrobiyolojik Yöntemler. *Gıda Mikrobiyolojisi, Editör A. Ünlütürk, F. Turantaş, Meta Basım, Bornova, İzmir.*

Valsangiacomo, C., Dolina, M., Peduzzi, R., & Jäggli, M. (2000). Antimicrobial susceptibility of Staphylococcus aureus isolates from hospitalized patients and dairy food (fresh cheese): a survey over a decade in southern Switzerland. *Clinical microbiology and infection, 6(7), 393-394.*

Varshney, A. K., Mediavilla, J. R., Robiou, N., Guh, A., Wang, X., Gialanella, P., ... & Fries, B. C. (2009). Diverse enterotoxin gene profiles among clonal complexes of Staphylococcus aureus isolates from the Bronx, New York. *Applied and environmental microbiology, 75(21), 6839-6849.*

Vasil, M., Fotta, M., & Elečko, J. (2007). Enterotoxin production in Staphylococcus sp. isolated from sheep milk. *Slovak Journal of Animal Science, 40(1), 52-56.*

Vernozy-Rozand, C., Mazuy-Cruchaudet, C., Bavai, C., & Richard, Y. (2004). Comparison of three immunological methods for detecting staphylococcal enterotoxins from food. *Letters in applied microbiology*, 39(6), 490-494.

Walstra, P., & Jenness, R. (1984). *Dairy Chemistry and Physics*. New York: John Wiley & Sons.

Xu, Z., Peters, B. M., Li, B., Li, L., & Shirliff, M. E. (2016). Staphylococcal Food Poisoning and Novel Perspectives in Food Safety. In *Significance, Prevention and Control of Food Related Diseases*. IntechOpen, Londra, 159-213.

Yalçın, C. (2005). Türkiye'nin Avrupa Birliği'ne Entegrasyon Sürecinde Süt Hijyen Kriterleri ve Önemi. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 76(3-4), 17-21.

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

YILMAZ, S., & GÖNÜLALAN, Z. (2010). KAYSERİ BÖLGESİNDE TÜKETİME SUNULAN ÇİĞ SÜTLERDE STAPHYLOCOCCUS AUREUS VE ENTEROTOKSİN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI. *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 19(1), 26-33.

Zell, C., Resch, M., Rosenstein, R., Albrecht, T., Hertel, C., & Götz, F. (2008). Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. *International journal of food microbiology*, 127(3), 246-251.

Zouharova, M., & Rysanek, D. (2008). Multiplex PCR and RPLA identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains from bulk tank milk. *Zoonoses and Public health*, 55(6), 313-319.

## İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

### TÜKETİM AMACIYLA PİYASADA BULUNAN ÇİĞ VE PASTÖRİZE SÜTLERDE ENTEROTOKSİJENİK STAPHYLOCOCCUS AUREUS VE ENTEROTOKSİNLERİNİN ARAŞTIRILMASI

#### ORJİNALLİK RAPORU

% <b>17</b>	% <b>17</b>	% <b>4</b>	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

#### BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	<a href="http://adudspace.adu.edu.tr:8080">adudspace.adu.edu.tr:8080</a> İnternet Kaynağı	% <b>4</b>
<b>2</b>	<a href="http://nek.istanbul.edu.tr:4444">nek.istanbul.edu.tr:4444</a> İnternet Kaynağı	% <b>2</b>
<b>3</b>	<a href="http://acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr:8080">acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr:8080</a> İnternet Kaynağı	% <b>2</b>
<b>4</b>	<a href="http://acikbilim.yok.gov.tr">acikbilim.yok.gov.tr</a> İnternet Kaynağı	% <b>2</b>
<b>5</b>	<a href="http://www.ulusaltezmerkezi.net">www.ulusaltezmerkezi.net</a> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>6</b>	<a href="http://acikerisim.dicle.edu.tr">acikerisim.dicle.edu.tr</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>7</b>	<a href="http://veteriner.fusabil.org">veteriner.fusabil.org</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>8</b>	<a href="http://lisansustu.omu.edu.tr">lisansustu.omu.edu.tr</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>

[acikarsiv.ankara.edu.tr](http://acikarsiv.ankara.edu.tr)

## ETİK KURUL İZİN YAZISI

**Uyarı:** Canlı denekler üzerinde yapılan tüm araştırmalar için Etik Kurul Belgesi alınması zorunludur.

- Etik Kurul izni gerekmektedir.
- Etik Kurul izni gerekmemektedir.

Recep GEÇKİNLİ  
(İmza)



## KURUM İZİNİ YAZILARI

**Uyarı:** Canlı ve cansız deneklerle yapılan tüm çalışmalar için kurum izin belgelerinin eklenmesi zorunludur. Gizlilik ve mahremiyet içeren durumlarda kurum adı kapatılmalıdır.

- Kurum izni gerekmektedir.
- Kurum izni gerekmemektedir.

Recep GEÇKİNLİ  
(İmza)

