

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ANKARA PİYASASINDA AÇIKTA SATILAN BEYAZ VE TULUM
PEYNİRLERİNDE *Staphylococcus aureus* VARLIĞININ BELİRLENMESİ VE
BELİRLENEN SUŞLARDA BAZI KLASİK ENTEROTOKSİJENİK
ÖZELLİKLERİN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) İLE
ARAŞTIRILMASI**

Sahar KARIMIHACHEHSOO

SÜT TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2016**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Sahar KARIMIHACHEHSOO tarafından hazırlanan “**Ankara Piyasasında Açıkta Satılan Beyaz ve Tulum Peynirlerinde *Staphylococcus aureus* Varlığının Belirlenmesi ve Belirlenen Suşlarda Bazı Klasik Enterotoksijenik Özelliklerin Polimeraz Reaksiyonu (PZR) ile Araştırılması**” adlı tez çalışması 15/01/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Süt Teknolojisi Anabilim Dalı’ nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr Birce TABAN
Ankara Üniversitesi, Süt Teknolojisi Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri:

Başkan : Prof. Dr. Asuman GÜRSEL
Ankara Üniversitesi, Süt Teknolojisi Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. İlkin YÜCEL ŞENGÜN
Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü

Üye : Doç. Dr. Birce TABAN
Ankara Üniversitesi, Süt Teknolojisi Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. İbrahim DEMİR

Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

15.01.2016

Sahar KARIMIHACHEHSOO

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ANKARA PİYASASINDA AÇIKTA SATILAN BEYAZ VE TULUM PEYNİRLERİNDE *Staphylococcus aureus* VARLIĞININ BELİRLENMESİ VE BELİRLENEN SUŞLARDA BAZI KLASİK ENTEROTOKSİJENİK ÖZELLİKLERİN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) İLE ARAŞTIRILMASI

Sahar KARIMIHACHEHSOO

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Süt Teknolojisi Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Birce TABAN

Gıda işleme sırasında uygun hijyenik koşulların sağlanamaması sonucu kontamine olmuş sütlerden, özellikle de çiğ süttten üretilen peynirlerin stafilokokal intoksikasyonlar yönünden büyük risk taşıdıkları bilindiğinden, bu tez çalışmasında başlangıç olarak, Ankara piyasasında açıkta satılan 63 adet Beyaz ve Tulum peynirinde *Staphylococcus aureus* varlığı EN/ISO 6888-1 (01/2004) yöntemi kullanılarak araştırılmış ve toplam 210 adet tipik *S. aureus* izolatu elde edilmiştir. Tümü Gram pozitif ancak, 73 adedi koagülaz pozitif olarak belirlenen izolatların 27 adedi, API® Staph kiti kullanılarak, *S. aureus* olarak tanımlanmıştır. Bu suşların, termonükleaz gen bölgesine (*nuc* geni) sahip olup-olmadıkları polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile incelenmiş ve 27 adet izolatu 24 adedinde *nuc* geninin 279 bp'lik bölgesi amplifiye edilebilmiştir. Bir başka deyişle, 63 adet peynir örneğinin 12 adedinde (% 15.9) toplam 24 adet *S. aureus* suş varlığı kesin olarak doğrulanmıştır. Çalışmanın ilerleyen aşamasında, bu suşlarda gıda intoksikasyonları yönünden önemli olan bazı klasik stafilokokal enterotoksinleri (SEA ve SED) ifadeleyen genlerin olup-olmadığı PZR ile araştırılmış ve yalnızca tek bir peynir örneğinden izole edilen bir suşta *sea* geninin 219 bp'lik bölgesi amplifiye edilebilmiş ancak hiçbir suşta *sed* geninin 317 bp'lik bölgesi amplifiye edilememiştir. Dolayısıyla, 63 adet peynir örneğinin yalnızca 1 adedi SEA sentezleyebilecek *S. aureus* ile kontamine halindeyken, örneklerin hiçbirinde SED sentezleyecek *S. aureus* bulunmadığı saptanmıştır. Sonuç olarak; Ankara piyasasında açıkta satılan Beyaz ve Tulum peynirlerinde gerek *S. aureus* gerekse SEA sentezleyebilecek *S. aureus* saptanması, bunların hem üretimleri sırasında yetersiz sanitasyon koşulları olduğunun göstergesi olması hem de enterotoksin içirme olasılıklarının fazlalığı nedenleriyle büyük önem arz etmektedir.

Ocak 2016, 67 sayfa

Anahtar Kelimeler: Beyaz peynir, Tulum peyniri, *Staphylococcus aureus*, polimeraz zincir reaksiyonu, stafilokokal enterotoksin, SEA, SED

ABSTRACT

Master Thesis

DETECTION OF PRESENCE OF *Staphylococcus aureus* IN WHITE PICKLED AND TULUM CHEESES SOLD IN OPEN MARKETS OF ANKARA AND INVESTIGATION OF SOME CLASSICAL ENTEROTOXIGENIC PROPERTIES OF THESE STRAINS BY POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Sahar KARIMIHACHEHSOO

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Dairy Technology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Birce TABAN

Since it's known that contaminated milks, especially raw milk cheeses, carry a great risk for staphylococcal intoxication as a result of failure to provide proper hygienic conditions during food processing and preparation, in this project, firstly, a total of 63 white pickled and Tulum cheeses sold in open markets of Ankara were investigated for the presence of *Staphylococcus aureus* according to the method of EN/ISO 6888-1 (01/2004) and a total of 210 typical *S. aureus* isolates were determined. Twenty seven of the isolates which all were determined as Gram positive but 73 of were determined as coagulase positive, were identified as *S. aureus* by using the API[®] Staph kit. These strains were also examined for the presence of of thermonuclease gene region (*nuc* gene) by PCR and as a result, the region of 279 bp was amplified in 24 of these 27 isolates. In other words, totally 24 *S. aureus* strains have been precisely detected in 12 of 63 cheese samples (15.9 %). Consequently, the presence of some classic staphylococcal enterotoxins (SEA and SED) genes which have great importance in terms of food intoxication were investigated in these strains by PCR and the region of 219 bp of *sea* gene was amplified in one strain from only one cheese sample but 317 bp of *sed* gene could not be amplified in any of these strains. Thus, only 1 of 63 cheese samples was contaminated with SEA producing *S. aureus* while SED producing *S. aureus* were not found in any of them. As a result, detection of both *S. aureus* and SEA producing *S. aureus* in white pickled and Tulum cheeses sold in open markets of Ankara is very important due to being an indicator of poor sanitation conditions during their production as well as redundancy of the possibility of having enterotoxin.

January 2016, 67 pages

Anahtar Kelimeler: White pickled cheese, Tulum cheese, *Staphylococcus aureus*, polymerase chain reaction, staphylococcal enterotoxin, SEA, SED

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ve tez çalışmamın her aşamasında benden desteğini, bilgisini ve yardımını esirgemeyen, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim ve ayrıca deneyimlerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam sayın Doç. Dr. Birce TABAN'a (Ankara Üniversitesi, Süt Teknolojisi Anabilim Dalı),

Tez çalışmamı 14L0447003 numaralı proje ile maddi olarak destekleyen Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Koordinatörlüğü'ne,

Laboratuvarıda birlikte çalıştığım tüm arkadaşlarıma,

Başarılarımın esas kaynağı olan ve bu günlere gelebilmem için hayatımın her aşamasında maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman arkamda olan ve varlıklarıyla gurur duyduğum sevgili annem, babam ve kardeşlerime, teşekkürlerimi sunuyorum.

Sahar KARIMIHACHEHSOO

Ankara, Ocak 2016

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	5
3. MATERYAL ve YÖNTEM	15
3.1 Materyal	15
3.1.1 Peynir örnekleri	15
3.1.2 Bakteri kültürleri	15
3.1.3 Besiyerleri ve enzimler	17
3.1.4 Tampon ve çözeltiler	17
3.1.5 Boya çözeltileri	17
3.1.6 DNA izolasyonu ve saflaştırılması işlemi deney düzeneği	17
3.1.7 DNA izolasyonu ve saflaştırılması kiti	18
3.1.8 PZR yöntemi deney düzeneği	18
3.1.9 Oligonükleotidler	18
3.1.10 Agaroz jel elektroforez işlemi deney düzeneği	18
3.1.11 Jel görüntüleme işlemi deney düzeneği	18
3.2 Yöntem	19
3.2.1 Peynir örneklerinden <i>S. aureus</i> izolasyonu ve tanımlanması	19
3.2.2 DNA izolasyonu ve saflaştırılması işlemi	22
3.2.3 PZR amplifikasyon bileşenleri	24
3.2.4 PZR döngüsü parametre değerleri	25
3.2.5 Agaroz jel elektroforez işlemi	26
3.2.6 Jel görüntüleme işlemi	27

4. ARAŞTIRMA BULGULARI	28
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	35
5.1 Öneriler	43
KAYNAKLAR	44
EKLER	54
EK 1 Çalışmada Kullanılan Besiyerleri	55
EK 2 Çalışmada Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	58
EK 3 Çalışmada Kullanılan Boya Çözeltileri	61
EK 4 Çalışmada Kullanılan Kitler	62
EK 5 Çalışmada Kullanılan Oligonükleotidler	63
EK 6 Çalışmada Kullanılan Jel	66
ÖZGEÇMİŞ	67

SİMGELER DİZİNİ

A _s	Su aktivitesi
bç	Baz çifti
°C	Santigrat derece
Da	Dalton
dak	Dakika
g	Nispi santrifüj kuvveti
g	Gram
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
NaCl	Sodyum klorür
Na ₂ EDTA	Disodyum etilendiamin tetraasetik asit
ng	Nanogram
nm	Nanometre
pH	Potansiyel hidrojen
s	Saniye
v/v	Hacim/hacim
w/v	Ağırlık/hacim

Kısaltmalar

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
BHB	Brain heart broth
BPA	Baird Parker agar
CDC	Hastalık Denetim ve Önleme Merkezleri
DNA	Deoksiribonükleik asit
dATP	2'-deoksiadenozin-5'-trifosfat
dCTP	2'-deoksisitidin-5'-trifosfat
dGTP	2'-deoksiguanozin-5'-trifosfat
dNTP	Deoksiribonükleozid trifosfat
dTTP	2'-deoksitimidin-5'-trifosfat
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
ELIZA	Enzim ilintili immün test
HPPTP	Yüksek saflıkta PZR hedef hazırlama
HPSF	Yüksek saflıkta tuz içermeyen
kob	Koloni oluşturma birimi
nuc geni	Termonükleaz gen bölgesi
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
S.	<i>Staphylococcus</i>
SE	Stafilokokal enterotoksin
SEA	Stafilokokal enterotoksin A
SEB	Stafilokokal enterotoksin B

SEC	Stafilokokal enterotoksin C
SED	Stafilokokal enterotoksin D
SEE	Stafilokokal enterotoksin E
SEI	Stafilokokal toksin benzeri
T _m	Erime noktası
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-borik asit-EDTA
TİK	Türkiye İstatistik Kurumu
TPS	Tamponlanmış peptonlu su
TSA	Triptik soy agar
TSB	Triptik soy broth
UV	Morötesi



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	PZR yönteminin basamakları	12
Şekil 3.1	PZR yöntemi deney düzeneği	19
Şekil 3.2	Jel görüntüleme ve analiz sistemi deney düzeneği	19
Şekil 3.3	EN/ISO 6888-1 (01/2004) yöntemi	21
Şekil 3.4	Çalışmanın ilerleyen aşamaları	22
Şekil 3.5	API [®] Staph test kiti ile kısmen tanımlanmış <i>S. aureus</i> suşlarından DNA izolasyonu ve saflaştırma uygulama basamakları	23
Şekil 4.1	Koagülaz testi görüntülerinin bir kısmı	28
Şekil 4.2	API [®] Staph testleri görüntülerinin bir kısmı	28
Şekil 4.3	<i>S. aureus</i> izolatlarının termonükleaz gen bölgesine (<i>nuc</i> geni) sahip olup-olmadıkları açısından incelendiği PZR sonucunun % 1.5'lik agaroz jeldeki görüntüsü	31
Şekil 4.4	<i>S. aureus</i> izolatlarının <i>sea</i> gen bölgesine sahip olup-olmadıkları açısından incelendiği PZR sonucunun % 1.5'lik agaroz jeldeki görüntüsü	32
Şekil 4.5	<i>S. aureus</i> izolatlarının <i>sed</i> gen bölgesine sahip olup-olmadıkları açısından incelendiği PZR sonucunun % 1.5'lik agaroz jeldeki görüntüsü	34

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1	Çalışmada kullanılan 63 adet peynir örneği	15
Çizelge 3.2	Çalışmada kullanılan PZR amplifikasyon bileşenleri derişim ve miktarları	25
Çizelge 3.2	<i>nuc</i> geninin 279 bç'lik bölümünün amplifikasyonu için kullanılan PZR döngüsündeki parametre değerleri	26
Çizelge 3.3	<i>sea</i> geninin 219 bç'lik ve <i>sed</i> geninin 317 bç'lik bölümlerinin amplifikasyonu için kullanılan PZR döngüsündeki parametre değerleri	26
Çizelge 4.1	Çalışmanın ilerleyen aşamalarında kullanılan izolatlar	29

1. GİRİŞ

İnsanların en temel gereksinimlerinden biri beslenmedir. İnsanların yaşamsal ve fiziksel gelişimlerini sürdürebilmeleri için, yeterli miktarda sağlıklı ve güvenilir gıda tüketmeleri ve bu gıdalara fiziksel ve ekonomik bakımdan kolaylıkla erişebilmeleri gerekmektedir. Günümüzde dünya nüfusunun beslenmesi için yeterli gıda bulunamaması önemli bir sorun olmakla birlikte, var olan gıdanın güvenilir olmaması da sorun yaratmaya başlamıştır (Uygun ve Köksel 2010). Güvenilir gıda üretimini sağlamak için, gıdaların üretim, işleme, saklama, taşıma ve dağıtım aşamalarında gerekli hijyenik kurallara uyulması ve önlemlerin alınması gerekmektedir. Ancak günümüz koşullarında gıdaların, artan çevre kirliliği, şehirleşme ve sanayileşme, çalışan kadın nüfusundaki yoğunluk, toplumun değişen tüketim alışkanlıkları, toplu gıda ve yemek üretiminde artış, yetersiz veya yeterince uygulanmayan mevzuatlar, kontrol dışı gıda üretimi ve denetim uygulamalarının yetersizliği nedenleriyle insanlar için hastalık riski oluşturabildikleri gözardı edilmemelidir. Gıda kaynaklı hastalıklar sadece sağlık sorunlarına yol açmayıp, bunun yanı sıra ciddi işgücü kaybı oluşturmakta ve ekonomik kayıplar olarak da kendini göstermektedir (Erkmen 2010, Aslan 2012).

Son yıllarda gerek üreticilerin gerekse tüketicilerin gıda hijyeni konusunda bilinçli davranmaları sayesinde gıda hijyeninde gözlenen gelişmelere karşın, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) halen gıda kaynaklı hastalıkların önde gelen üçüncü nedeni olarak tanımlanmaktadır (Morandi vd. 2007, Normanno vd. 2007, Akineden vd. 2008, Can ve Çelik 2012).

Staphylococcaceae ailesindeki stafilokoklar içerisinde gıda zehirlenmeleri açısından en önemli tür olan *S. aureus*, patojen bir bakteri olmasına karşın sağlıklı insanların % 20-30'unun nazofarinks ve deri florasında yer almakta ve insanların % 60'ı belirli aralıklarla bu patojeni barındırmaktadır (Normanno vd. 2007). Dolayısıyla gıda işleme ve hazırlama sırasında uygun hijyenik koşulların sağlanamaması ve/veya korunamaması sonucu gıdaların *S. aureus* ile kontamine olmasında en büyük rolü insanlar oynamasına karşın, başta mastitisli hayvanlardan sağılan sütler olmak üzere, kontamine olmuş sütler ve süt ürünlerinin, özellikle de çiğ süttten üretilen peynirlerin stafilokokal

intoksikasyonlar yönünden büyük risk taşıdıkları (de Buyser 2001, Küplülü vd. 2004, Jorgensen vd. 2005, Zweifel vd. 2006, Rall vd. 2008) ve hatta bu peynirlerden *S. aureus*'un sıklıkla izole edildiği bildirilmektedir (Delbes vd. 2006, Rosengren vd. 2010, Jakobsen vd. 2011).

Süt ve süt ürünleri esaslı stafilocokal intoksikasyonlar; enterotoksijenik özelliğe sahip stafilocokların süt ve süt ürünlerinde 10^5 - 10^6 kob/g-mL veya daha yüksek sayıya ulaşması sırasında sentezlenen, ekzotoksin özellikteki stafilocokal enterotoksinlerin (SE) alimenter yol ile alımı sonucu oluşmaktadır (Bostan vd. 2006, Akineden vd. 2008, Pelisser vd. 2009, Ertas vd. 2010). Hastalık Denetim ve Önleme Merkezleri (Centers for Disease Control and Prevention–CDC) verilerine göre Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde her yıl SE'lere bağlı gıda zehirlenmelerinden 325 000 kişi hastaneye yatırılırken, 5 000'den fazlası da ölmektedir (Pinchuk vd. 2010). SE'ler, kimyasal ve antijenik özellikleri esas alınarak adlandırılmaktadırlar. Bugüne kadar 21 SE tipi tanımlanmış ve bunları ifadeleyen genler belirlenmiş ancak stafilocokal intoksikasyon vakalarının % 95'inin (Cremonesi vd. 2005, Ertas vd. 2010, Rahimi 2013, Aytac ve Mercanoglu-Taban 2014) emetik özellikteki klasik SE'ler olarak bilinen SEA, SEB, SEC (SEC₁, SEC₂, SEC₃), SED ve SEE kaynaklı olduğu gözlenmiştir (Holečková vd. 2002, Blaiotta vd. 2004, Scherrer vd. 2004, Cremonesi vd. 2007, Akineden vd. 2008, das Dores vd. 2013). Klasik SE'ler arasında SEA ve SED'in sıklıkla, SEC'nin kısmen intoksikasyonlara neden oldukları saptanmıştır (Rosec vd. 2002, Bostan vd. 2006, Pelisser vd. 2009, Ertas vd. 2010, Pinchuk vd. 2010). SEE ve SEB'nin ise gıda zehirlenmesi vakalarında hiç saptanmadıkları belirlenmiştir.

İnsanlar süt veren hayvanları evcilleştirmeye başladığından beri, süt ve fermente süt ürünleri insan diyetinin önemli bir parçası olmuştur (Jakobsen vd. 2011). Yüksek miktarda *S. aureus* içeren sütlerin pastörize edilmeden peynire işlenmesi, kullanılan starter kültürün aktivitesinin zayıf olması, sütün pastörizasyon sonrası kontaminasyonu ile ürüne işlenmesi ve uygun olmayan depolama koşulları peynirlerde SE'lere bağlı gıda zehirlenmelerinin oluşmasına neden olmaktadır (Küçükçetin ve Milci 2008, Kaynar 2011).

Her ne kadar pastörizasyon işlemi sonucu *S. aureus* hücreleri inhibe edilebilse de, termostabil özellikte olan SE'lerin biyolojik aktivitelerini genellikle korudukları saptanmıştır (Balaban ve Rasooly 2000, Asao vd. 2003, Morandi vd. 2007, Rall vd. 2008, Rahimi 2013). Stafilokokal enterotoksinlerin pepsin, tripsin, kimotripsin, kimozin, papain vb. gibi proteolitik enzimlere, düşük pH değerlerine ve fermantasyon koşullarına dirençli olmalarının yanısıra, peynirlerin olgunlaştırılması sırasında da aktivitelerini kaybetmedikleri bilinmektedir (Cremonesi vd. 2007, Akineden vd. 2008, das Does vd. 2013, Rahimi 2013). Dolayısıyla çiğ süttten ve/veya hijyenik olmayan ortamlarda üretilen peynirlerin stafilokokal intoksikasyon riskini arttırdıkları, halk sağlığını tehdit ettikleri ve önemli ekonomik kayıplara neden oldukları bildirilmektedir (Santos vd. 1981, de Buyser 2001, Jorgensen vd. 2005, Normanno vd. 2005, Ertas vd. 2010).

Peynirlerde yüksek miktarlarda *S. aureus* saptanması, hem işletmedeki yetersiz sanitasyon koşullarının göstergesi olması, hem de peynirlerin enterotoksin içermeye ihtimalinin fazlalığı nedenleriyle büyük önem arz etmektedir. Bununla beraber peynirlerde düşük *S. aureus* sayısının saptanmış olması da enterotoksin açısından oluşabilecek riski azaltmamaktadır. Çiğ süte kontamine olmuş *S. aureus*'un sentezleyeceği enterotoksinlerin ısı işlem ve diğer yöntemler ile inaktif hale getirilemeyeceği bilinmektedir. Bu durumda tüketim öncesi yapılacak analizler ile *S. aureus* varlığı saptanmayan ya da düşük miktarlarda saptanan peynirler tüketildiğinde ciddi intoksikasyonlara sebep olabilecektir.

Süt ve süt ürünlerindeki SE'ler, 20 ng ile 1 µg arası gibi çok düşük seviyelerde bile stafilokokal intoksikasyonlara yol açabilmektedirler. Dolayısıyla çiğ süt ve/veya hijyenik olmayan koşullarda üretilen peynirler stafilokokal intoksikasyonlara yol açarak, hem halk sağlığını tehdit edebilmekte hem de önemli ekonomik kayıplara neden olabilmektedir.

Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği'ne göre eritme peyniri hariç diğer tüm peynirler için, EN/ISO 6888-1 veya 2 yöntemi kullanılarak yapılan analiz sonucunda 5 örnekten yalnızca 2 adedinin en çok 10^2 - 10^3 kob/g seviyesinde koagülaz

pozitif stafilokok içermesine izin verilebileceği, ancak 1 örneğin bile 10^3 kob/g'dan fazla koagülaz pozitif stafilokok içermesi durumunda ürünün tüketiminin uygun olmadığı belirtilmektedir. Aynı tebliğe göre eritme peynirler ve peynir ürünlerinin 25 gramının SE içermemesi gerektiği belirtilmektedir. Bununla birlikte, Ocak 2006 tarihinden itibaren yürürlükte olan CEE 2073 sayılı yasa gereğince de, 1 gramında 10^5 kob'den fazla *S. aureus* içeren peynir örnekleri, enterotoksin üretme yetenekleri açısından test edilmelidir (Anonim 2011).

Bu çalışmada, Ankara piyasasında açıkta satılan Beyaz ve Tulum peynirlerinde *S. aureus* varlığının belirlenmesi ve saptanan suşlarda gıda intoksikasyonları yönünden büyük önem arz eden bazı klasik enterotoksijenik özelliklerin (SEA ve SED), bir başka deyişle bazı klasik SE'leri ifadeleyen genlerin olup-olmadığı, PZR tekniği kullanılarak araştırılmış ve dolayısıyla bu peynirlerin tüketici sağlığı yönünden güvenilirliği saptanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

Patojen bir mikroorganizma veya toksinini içeren bir gıdanın tüketimi sonucu meydana gelen gıda kaynaklı hastalıklar, halen günümüzün önemli sağlık problemlerindendir. Dünyada en yaygın görülen gıda kaynaklı mikrobiyal intoksikasyonlara, *S. aureus* tarafından sentezlenen SE'lerin neden olduğu bilinmektedir (Waldvogel 2000, Alisharli ve Solmaz 2003).

Gıda kaynaklı mikrobiyal hastalıklar içerisinde *S. aureus* intoksikasyonu oranının Macaristan'da % 40, Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde % 45 ve Japonya'da % 25-30 olduğu tahmin edilmektedir. ABD'nde stafilokokal intoksikasyonun her yıl yaklaşık 1.5 milyar dolarlık ekonomik kayıplara neden olduğu belirtilmektedir. ABD'nde gıda kaynaklı mikrobiyal hastalığa neden olan gıdaların % 77.8'inde SEA ve % 10'unda SEB tespit edildiği bildirilmektedir. Japonya'da ise en fazla zehirlenmeye neden olan SE tipinin SEA olduğu bildirilmektedir (Küçükçetin ve Milci 2008).

İlk olarak 1881 yılında İskoçyalı cerrah Alexander Ogston tarafından insanların irinli lezyonlarından izole edilen Stafilokoklar, çoğalmaları sırasında birbirlerinden ayrılmayarak üzüm salkımına benzeyen, düzensiz kümeler oluşturmalarından dolayı, Yunanca'da üzüm salkımı anlamına gelen "staphyle" sözcüğünden türeyerek adlandırılmıştır (Waldvogel 2000). 1884 yılında Alman doktor Friedrich Julius Rosenbach, Stafilokokların ilk kez kültürünü yaparak karakteristik özelliklerini incelemiş ve katı besiyerinde beyaz ve sarı renkli koloniler oluşturan iki farklı Stafilokok suşu gözlemlemiş, beyaz renkli koloni oluşturan suşlar *S. albus*, sarı renkli koloni oluşturan suşlar ise *S. aureus* olarak isimlendirilmiştir. *Staphylococcus* cinsi içerisinde 28 tür ve 32 alt tür yeralmasına karşın, *S. aureus* enterotoksin sentezleyebilmesi açısından en önemli tür olarak kabul edilmektedir (Adams ve Moss 2008, Aytac ve Taban 2010, Madigan vd. 2013, Aytac ve Mercanoglu-Taban 2014).

Staphylococcacea ailesi üyesi olan *S. aureus* mikroskopik olarak incelendiğinde 0.5-1.5 µm çapında, çift, kısa zincirli ve/veya üzüm salkımı oluşturan koklar şeklinde, Gram pozitif, spor oluşturmayan, kapsülsüz ve hareketsiz bakteriler olarak

gözlemlenmektedir. *S. aureus* kolonileri ise, yaklaşık 6-8 mm çapında, düz, yüzeyden hafifçe kabarık, yarı şeffaf görünümündedir. *S. aureus*, fakültatif anaerobik, mezofilik, katalaz pozitif ve oksidaz negatif özelliktedir. Gelişme sıcaklığı 6-46°C olmasına karşın toksin oluşturabilmesi için gerekli minimum ve maksimum sıcaklık değerleri 10-48°C gibi daha yüksek sıcaklıklardır. Optimum gelişebildiği pH değeri 7.0-7.5 olan bu bakteri, pH 4.0-10 değerlerinde de gelişimini sürdürebilmektedir. Minimum su aktivitesi (A_s) değeri aerobik gelişme için 0.83-0.86 olmasına karşın, toksin oluşturabilmek için daha yüksek A_s değerine ihtiyaç duymaktadır. *S. aureus*, % 10 NaCl gibi yüksek tuz derişimlerinde rahatlıkla gelişebilmekte ve hatta bazı suşlar % 20 NaCl içeren ortamlara da tolerans gösterebilmektedir ancak pastörizasyon işlemi sonucu canlılığını koruyamamaktadır. *S. aureus* mikrokoklardan farklı olarak glukozu gaz oluşturmaksızın asit oluşturarak fermente edebilmektedir (Tükel ve Doğan 2000, Küçükçetin ve Milci 2008, Aytac ve Taban 2010, Landgraf ve Destro 2013, Aytac ve Mercanoglu-Taban 2014). *S. aureus*, geniş sıcaklık, pH ve NaCl aralıklarında gelişebilme özelliği nedeniyle çoğu gıda maddesinde canlı kalabilmekte ve dolayısıyla peynir gibi süt ürünlerinin işlenmesi sırasında rahatlıkla gelişebilmektedir (Le Loir vd. 2003).

Stafilokoklar içerisinde *S. aureus* suşları, gıda zehirlenmelerine neden olan ve hücre zarına etkili oldukları bilinen, serolojik olarak birbirlerinden farklı 21 adet SE veya enterotoksin benzeri proteinler sentezlemektedirler (Tamarapu vd. 2001, Cremonesi vd. 2007, Aytac ve Mercanoglu-Taban 2014). SE'ler, geniş biyolojik ve biyokimyasal özellikleri içeren süperantijen olarak adlandırılan grup içerisinde yer alan ve pirojenik özellik taşıyan toksinlerdir. Süperantijenler, normal peptid veya protein antijenlerden farklı özellikteki bakteri kaynaklı antijenik yapılardır. Normal antijenik yapılar, hücreler üzerindeki doku uygunluk proteinlerine bağlanarak, T lenfosit reseptörleriyle kompleks meydana getirirler. Süperantijenlerin normal antijenik yapılardan en önemli farkı, çok daha fazla sayıda T lenfosit aktive edebiliyor olmalarıdır (Sağlam 2011). Molekül ağırlıkları 26 900-29 600 Da arasında değişen SE'ler, yapılarında fazla miktarda lizin, tirozin, aspartik asit ve glutamik asit bulunduran tek zincirli proteinlerdir. Emetik özellikteki klasik SE'ler olarak da bilinen ve SEA, SEB, SEC (SEC_1 , SEC_2 , SEC_3), SED ve SEE olarak isimlendirilen SE'lerin, insan stafilokokal zehirlenmelerinin % 95'inden sorumlu oldukları saptanmıştır. Özellikle de en toksik SE olarak bilinen

SEA'nın daha çok insan kaynaklı suşlar tarafından, SEC ve SED'nin ise memeli hayvanlardan izole edilen suşlar tarafından sentezlendikleri de bilinmektedir (K  rouanton vd. 2007). Son yıllarda yapılan çalışmalarda SE'lerin SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN ve SEO gibi yeni tiplerinin de var olduğu bildirilmiş ancak bu SE'lerin gıda zehirlenmeleri ile ilişkileri henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır (Demirel ve Karapınar 2000, Hole  kov   vd. 2002, Omoe vd. 2003, Blaiotta vd. 2004, Scherrer vd. 2004, Cremonesi vd. 2005, Cremonesi vd. 2007, Akineden vd. 2008, Ertas vd. 2010, das Dores vd. 2013, Rahimi 2013, Aytac ve Mercanoglu-Taban 2014). SEA haricindeki tüm SE'lerin genellikle bakterinin geç logaritmik fazı ya da erken durgunluk fazında yüksek düzeylerde de sentezlendikleri bilinmektedir (Seo ve Bohach 2007).

Gıdaya kontamine olmuş *S. aureus*'un sentezleyebileceği SE'lerin, ısııl işlem, inhibitör madde ilavesi ya da A_s'ni düşürmeye yönelik işlemler ile inaktif hale getirilemeyecekleri ancak bu işlemler ile gıdada bulunan *S. aureus*'ların sayısında bir azalma meydana geleceği bilinmektedir. Bu durumda, tüketim öncesi yapılacak mikrobiyolojik analizlerde *S. aureus* açısından temiz olarak değerlendirilen gıda, tüketildiğinde stafilokokal intoksikasyonlara sebep olabilecektir (Ünlütürk ve Turantaş 2003). Dolayısı ile bir gıdanın *S. aureus* açısından incelenmesi durumunda mutlaka SE varlığı da aranmalıdır.

SE'lerin ısııl işleme karşı dayanımları enterotoksinin içinde bulunduğu ortamın bileşimine, pH'sına ve NaCl derişimine bağlı olarak değişim göstermektedir (Asao vd. 2003). SE'lerin 100  C sıcaklıkta 10 dakikalık ısııl işlem uygulamasında bile aktivitelerini % 50 oranında korudukları ve ancak 121  C sıcaklıkta 1-2 dakikalık ısııl işlem uygulaması sonucu inaktif hale geldikleri bilinmektedir. SEB'nin ısııl işleme en dayanıklı SE olduğu saptanmıştır. Enterotoksinlerin ısııl işleme olduğu kadar pepsin ve tripsin gibi proteolitik enzimlere karşı da dayanıklı olması, sindirim dokularından etkilerini yitirmeden geçmelerine olanak sağlamaktadır (Tükel ve Doğan 2000, Küplülü vd. 2002).

Gıdalarda intoksikasyon yapacak düzeyde toksin oluşabilmesi için, gıda örneğinin gramındaki *S. aureus* sayısının 10⁵ kob üzerinde olması gerekmektedir. Başka bir

ifadeyle *S. aureus* sayısı 5×10^5 kob/g olan gıdalar riskli olarak kabul edilmektedir (Erol ve İşeri 2004).

Stafilokokal intoksikasyonların oluşumunda bireysel duyarlılık, tüketilen kontamine gıda miktarı, toksin tipi ve miktarı önemli olmasına karşın, stafilokokal intoksikasyon kısa inkübasyon süresi ile karakterize edilmekte ve 20 ng ile 1 µg arasındaki seviyelerinde SE içeren gıdanın alınmasından 1-6 saat sonra mide bulantısı, karın ağrısı, ishal, şiddetli kusma semptomları ve normalin altına düşen vücut ısı ile ortaya çıkmaktadır. İntoksikasyonun daha şiddetli seyrettiği durumlarda, baş ağrısı, kas krampları, kan basıncı değişiklikleri ve çarpıntı gözlemlenebilmektedir. Ancak duyarlı bir insanda intoksikasyonun meydana gelebilmesi için gerekli enterotoksin miktarının yaklaşık 0.1-1.0 µg arasında değiştiği tahmin edilmektedir (Balaban ve Rasooly 2000, Scherrer vd. 2004, Jorgensen vd. 2005, Huseby vd. 2007, Rosengren vd. 2010). Bazı durumlarda sentezlenen SE miktarı, gıda kaynaklı intoksikasyon için yetersiz de kalabilmektedir (Cremonesi vd. 2007). Stafilokokal intoksikasyonda mortalite oranı genel olarak % 0.03 düzeyinde olup, daha duyarlı insanlarda bu oran % 4.4'e çıkabilmektedir (Seo ve Bohach 2007).

Sağlıklı insanların nazofarinks ve deri florasında, ellerde ve kollarda yer almasından dolayı *S. aureus*'un gıdalara bulaşmasındaki en önemli etkenin insan olduğu saptanmıştır (Normanno vd. 2007). Bunun yanı sıra birçok evcil hayvanın da *S. aureus* kaynağı olduğu bildirilmektedir. Daha çok sıcakkanlı hayvanların burun deliklerinde, derilerinde ve tüylerinde bulunan bu patojen bakteri, aynı zamanda süt veren hayvanlarda önemli bir mastitis etkenidir (Ollis vd. 1995). Mastitis, süt veren hayvanların süt üretimini (Wilson vd. 1997), süt protein kalitesini (Barbano vd. 1991), üreme (Schrack vd. 2001) ve yaşam sürelerini (Caraviello vd. 2005) olumsuz etkilediği için, büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Klinik mastitisin, sütün görünüşünü gözle görülebilecek şekilde değiştirebildiği halde subklinik mastitisin sütün görünümde değişiklik yapmadığı ancak sütteki somatik hücre sayısını arttırdığı ve dolayısıyla süt kalitesini düşürdüğü bilinmektedir (Ferguson vd. 2007). Subklinik mastitisli ineklerden elde edilen sütlerin sağlıklı ineklerden elde edilen sütlere karışmış olması, süt ve süt ürünlerinin özellikle de çiğ süttten üretilen peynirlerin *S. aureus* ile kontaminasyonunun

en önemli kaynağıdır (de Buyser 2001, Küplülü vd. 2004, Jorgensen vd. 2005, Zweifel vd. 2006, Küçükçetin ve Milci 2008, Rall vd. 2008). Çiğ sütte en çok SEC ve SED görüldüğü, süt ürünlerinde ise genellikle SE'lerin bütün tiplerine rastlanıldığı bilinmektedir. Ancak stafilocokal intoksikasyonlara SEA ve SED'in sıklıkla, SEC'nin kısmen neden olduğu saptanmıştır (Demirel ve Karapınar 2000).

Tüm dünyada sevilerek tüketilen ve yüzlerce çeşidi bulunan peynirin mikrobiyolojik kalitesi önemlidir. Peynirde bulunan mikroorganizmalar peynirin yapısında değişime neden olacağı gibi tüketilmesi sonucunda da gıda kaynaklı hastalıklara yol açabilmektedir. Süt ve süt ürünlerinden kaynaklanan stafilocokal intoksikasyonların oranı ülkelere göre farklılık göstermekle birlikte tüm dünyada stafilocokal intoksikasyonların en çok görüldüğü süt ürünü peynirdir. Cheddar, Gouda, Ras, Camembert, Brick, Colby, İsveç tipi Mozzarella ve keçi peynirleri gibi farklı çeşit peynirlerden enterotoksijenik *S. aureus* suşlarının izole edildiği bildirilmiştir (Demirel ve Karapınar 2000). 1969-1990 yıllarında İngiltere'de stafilocokal intoksikasyonların % 8'inin kaynağını süt ürünleri oluşturmakta iken, 1975 ve 1982 yıllarında ABD'nde stafilocokal intoksikasyonların sadece % 1.4'ünün süt ürünlerinden kaynaklandığı tespit edilmiştir. 1999-2000 yıllarında Fransa'da ise stafilocokal intoksikasyonların % 32'sinin süt ürünlerinden (özellikle de peynir) kaynaklandığı bildirilmektedir (Bhatia ve Zahoor 2007, Küçükçetin ve Milci 2008).

Peynir tüketimi sonucu meydana gelen stafilocokal intoksikasyon vakalarının genellikle pastörizasyon sonrası personel hijyeni yetersizliğinden kaynaklandığı ve peynirlere kontamine olmuş stafilocokların rekabetçi mikrofloranın yokluğuna bağlı olarak uygun olmayan muhafaza koşullarında hızla gelişerek enterotoksin oluşturmaları sonucunda ortaya çıktığı bildirilmiştir (de Buyser vd. 2001, Normanno vd. 2005).

Stafilocokal intoksikasyon vakalarının ilki 1884 yılında ABD'nde Cheddar peyniri tüketiminden sonra görülmüş ve yapılan mikrobiyolojik analizler sonucunda peynir örneklerinden yüksek sayıda Stafilokok izole edilmiştir (Küçükçetin ve Milci 2008). 1914 yılında Filipinli çiftçilerin mastitisli ineklerden sağılan sütü tüketmeleri sonucu stafilocokal intoksikasyon yaşadıkları bildirilmiştir (Nakazawa ve Hosono 1992). 1930

yılında Duck ve arkadaşları, stafilokokal intoksikasyonların SE'lerin vücuda gıda ile birlikte alınmaları sonucunda meydana geldiğini belirlemişlerdir (Akkaya 2001, Seo ve Bohach 2007). 1985 yılında ABD'nde, üretim sırasında kontaminasyona uğrayan ve pastörizasyondan önce 4-5 saat süreyle uygun olmayan şartlarda bekletilen çikolatalı sütlerin tüketimi sonucu stafilokokal intoksikasyon vakaları gözlemlenmiştir. Bu çikolatalı sütlerde pastörizasyon işleminin, Stafilokokları inhibe ettiği ancak SE'leri inaktif hale getirmekte yetersiz kaldığı saptanmıştır (Le Loir vd. 2003). 1973-1992 yıllarında ABD'nde kontamine peynir tüketimi sonucu 16 adet stafilokokal intoksikasyon vakası belirtilmiştir (Alterkuse vd. 1998). 1993-1997 yıllarında ABD'nde birinin ölümle sonuçlandığı 42 adet stafilokokal intoksikasyon vakası meydana gelmiştir (Olsen vd. 2000). 1969-1990 yıllarında İngiltere'de 359 adet stafilokokal intoksikasyon vakası saptanmış ve bunların % 79'undan tek başına veya diğer SE'ler ile birlikte SEA'nın sorumlu olduğu belirlenmiştir. Bu gıdalarda tespit edilen ortalama *S. aureus* sayısının da 3.0×10^7 kob/g olduğu belirlenmiştir (Akkaya 2001, Küçükçetin ve Milci 2008). 1999 yılında Brezilya'da görülen iki adet gıda intoksikasyonu vakasının ilkinde 50 kişi peynir tüketiminden, ikincisinde ise 328 kişi çiğ süt tüketiminden hemen sonra hastalanmış ve şüpheli gıdalardan sırasıyla 2.4×10^3 kob/g ve 2.0×10^8 kob/g *S. aureus* izole edilmiştir. Enterotoksin içerdikleri de tespit edilen bu örneklerde kontaminasyonun sırasıyla personelden ve sütün mastitisli ineklerden elde edilmiş olmasından kaynaklandığı belirtilmiştir (do Carmo vd. 2002).

Ülkemizde tarım ekonomisi içerisinde süt ürünlerinin payı oldukça büyük olup, hayvansal protein ihtiyacının % 45'i süt ve süt ürünleri ile karşılanabilmektedir. Türkiye'de üretilen toplam çiğ sütün yaklaşık % 55 gibi önemli bir kısmı peynire işlenmekte, bunun % 65-70'i ise Beyaz peynir ve Tulum peynirine işlenmektedir. Bununla birlikte peynir üretiminin büyük bir kısmı mandıralarda yapılmakta, % 10 gibi bir miktarı da modern işletmelerde gerçekleştirilmektedir (Kaynar 2011).

Türkiye'de 50'den fazla peynir çeşidi bulunmakta olup, bunların en popüler olanları Beyaz, Kaşar ve Tulum peynirleridir. Türkiye İstatistik Kurumu'nun (TİK) verilerine göre, üretimi yapılan peynirlerin yaklaşık % 60'ını Beyaz peynir, % 15'ini Kaşar ve %

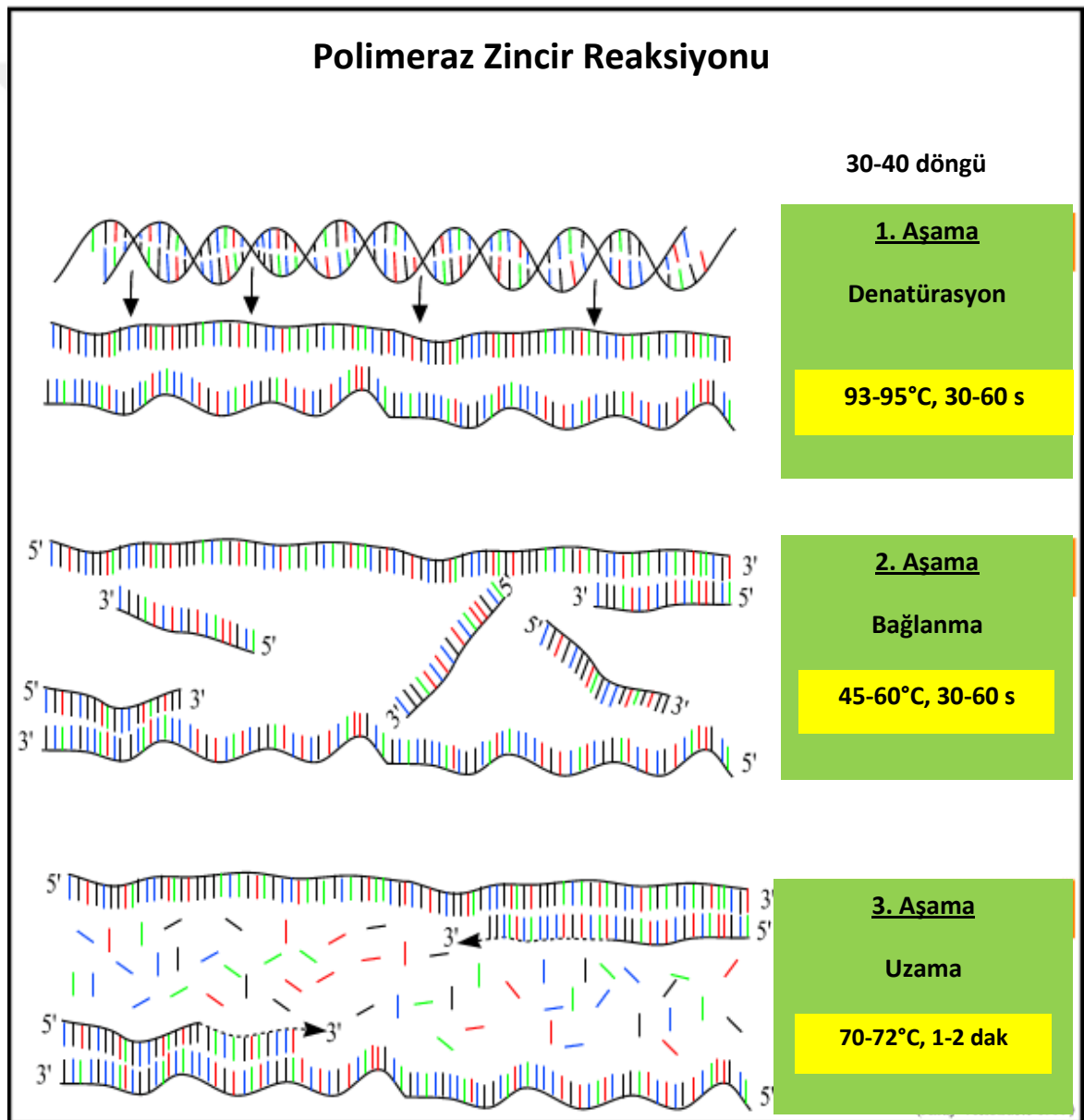
15'ini ise Tulum ve Mihaliç peyniri oluşturmaktadır. Kalan % 10'luk kısmı ise diğer yöresel peynirler paylaşmaktadır (Hayaloğlu 2008).

Sütün önemli bir bölümünün peynire işlendiği ülkemizde, en çok üretilip tüketilen Beyaz peynir ve Tulum peynirinin kalitesi ne yazık ki üretim miktarı ile orantılı olarak geliştirilememiştir. Bu peynirlerden kaynaklanan stafilokokal gıda zehirlenmeleri ülkemizde karşılaşılan önemli bir sorundur. Yapılan çalışmalar, *S. aureus*'un peynirde gelişimi ve toksin oluşturmalarının pek çok faktöre bağlı olduğunu göstermektedir. Yüksek miktarlarda *S. aureus* içeren sütlerin pastörize edilmeden peynire işlenmesi, kullanılan starter kültür aktivitesinin yetersiz olması, personel ve kalite kontrolünün yetersizliği, satış yerlerinde hijyene gereken önemin verilmemesi, sütün pastörizasyon sonrası kontaminasyonu ile ürünün işlenmesi ve depolanması sırasında uygun olmayan koşullar, peynirlerde bu problemlerin oluşmasına neden olmaktadır. İdeal koşullar altında *S. aureus*'un gelişimi ve enterotoksin üretimi, sütün peynir teknesinde kaldığı birkaç saat içinde başlamaktadır. Peynire işlenecek sütte *S. aureus* sayısının yüksek olması, üretim sırasında bu bakterinin inhibitör etkisi gösteren faktörlere karşı direnç geliştirmesini kolaylaştırmaktadır. Diğer taraftan sütte rekabetçi mikroorganizma sayısı ne kadar fazla ise *S. aureus*'un inhibisyonu o kadar kolay olmaktadır (Küçükçetin ve Milci 2008, Kaynar 2011).

1971 yılında H. Gobind Khorana, iki sentetik primer kullanılarak DNA molekülünün belirli bir bölgesinin amplifiye edilebileceğini bulmuş ancak bunu pratikte uygulayamamıştır (Kleppe vd. 1971). 1983 yılında Kary B. Mullis'in termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus*'dan termostabil DNA polimerazı (*Taq* DNA polimeraz) izole etmesi ve bunu polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi olarak adlandırılan Khorana'nın prensibinde başarı ile kullanması, bir başka deyişle DNA molekülünün tek zinciri boyunca belirli bölgelerde polimeraz aktivitesi başlatabilmesi ve sonlandırabilmesi ile moleküler tanımlama alanında büyük bir gelişme yaşanmıştır. PZR yöntemi, önceleri, üçlü su banyolarında uygulanırken, 1986 yılında ilk thermalcycler'ın piyasaya çıkarılması ile birlikte, su banyolarında zahmetli ve kontaminasyon riski fazla olarak uygulanan PZR yönteminin, thermalcycler'lar ile yürütülmeye başlanması ile bu konuda çok sayıda çalışma yapılabilmesine olanak sağlamıştır (Taban 2007).

Moleküler fotokopi tekniği olarak da adlandırılan PZR yöntemi, özgün DNA dizilerinin, sentetik oligonükleotidler kullanılarak *in vitro* şartlarda enzimatik olarak amplifiye edilmesi prensibine dayanır. Bir başka deyişle bu yöntem, belirli bir nükleotid dizisini içeren DNA bölgesinin sayısal olarak çoğaltılması ve ortamda çok az miktarda DNA bulunsa bile, bunun saptanabilir düzeye getirilmesi esasına dayanmaktadır (Gauthier ve Blais 2003, Taban 2007).

PZR yöntemi, temelde üç aşamadan oluşmaktadır (Şekil 2.1):



Şekil 2.1 PZR yönteminin basamakları (Taban 2007)

Denatürasyon olarak adlandırılan ilk aşama; çift sarmal zincirli DNA molekülünün, 93-95°C’de 30-60 saniye tutulması ve sarmal yapısının bozularak çift zincirin birbirinden ayrılmasını içermekte, bir başka deyişle DNA molekülü tek zincirli DNA haline getirilmektedir. Bu, yüksek sıcaklığın DNA molekülünün sarmal yapısını birarada tutan hidrojen bağlarını kırması ile sağlanmakta ve böylece primerlerin ve *Taq* DNA polimeraz enziminin girebildiği ve “replikasyon çatalı” olarak adlandırılan bir alan açılmış olur. PZR süresi boyunca da, helikaz enzimi, bu alanın açık kalmasını sağlamaktadır. Bununla birlikte daha yüksek sıcaklık ve sürede yapılan denatürasyon işleminin, *Taq* DNA polimeraz enziminin inaktive olmasına neden olduğu bilinmektedir (Taban 2007).

Bağlanma (annealing) olarak adlandırılan ikinci aşama; özgün primerlerin (sentetik oligonükleotidler) 45-60°C’de 30-60 saniyelik süre boyunca, tek zincir haline getirilen DNA’nın hedef bölgelerindeki 3’ uçlarına, hidrojen bağları yardımı ile hibridizasyonunu içermektedir. Sıcaklık 45-60°C’ye düşürüldüğü zaman tek zincirli DNA’larda, *Taq* DNA polimeraz enziminin varlığında tamamlayıcı DNA sentezi başlayamaz. Bu sentezin başlayabilmesi için, ortama bu moleküllerin 3’ uçlarındaki baz sekanslarına tamamlayıcı yapıda kısa bir zincirden oluşan tek zincirli primerlerin ilave edilmesi gerekir. Bu özgün primerler, tek zincir haline getirilen hedef DNA’nın, 3’ uçlarına kolaylıkla bağlanır ve tamamlayıcı DNA molekülü sentezlenmeye başlanır. Bu bağlanma sıcaklığının, bağlanmayı çok kısa bir sürede sağlamak amacı ile primerlerin erime sıcaklığının (T_m) 5°C altında olması istenmektedir. Yüksek bağlanma sıcaklığının da primerlerin bağlanma özgünlüğünü arttırdığı bildirilmektedir (Taban 2007).

Uzama (elongation) olarak adlandırılan üçüncü aşama, *Taq* DNA polimeraz enziminin 70-72°C’de 1-2 dakikalık süre boyunca primerleri, başlatıcı nokta; tek zincirli DNA’yı da, kalıp olarak kullanarak sentezleme işlemine başlaması ve çift zincirli DNA’nın kopyası olan DNA moleküllerinin sentezlenmesini içermektedir. Bu sentezin başlangıcında, *Taq* DNA polimeraz enziminin, primerlerin 3’ uçlarındaki hidroksil grubu ile tamamlayıcı nükleotidlerin 5’ uçlarındaki fosfat grupları arasında fosfodiester bağı oluşturduğu ve bunu takiben DNA sentezinin, 5’-3’ yönünde gerçekleştiği bilinmektedir. Oluşan DNA, bir sonraki döngüde hedef olarak kullanılmaktadır.

Böylelikle birinci döngü tamamlandığında, ortamdaki hedef DNA sayısı iki katına çıkmakta ve ikinci döngüde de, birinci döngüdeki aynı aşamaların tekrarlanması ile DNA sayısı bir misli daha artmaktadır (Taban 2007).

Sonuç olarak her döngünün sonunda yeni sentezlenen DNA zincirleri, bir sonraki PZR döngüsü için hedef zincir olmaktadır. Her bir döngü esnasında, mevcut DNA miktarının, iki katına çıkarıldığı ve örneğin 30 döngü sonunda milyardan daha fazla hedef DNA elde edilebileceği saptanmıştır. Bir başka deyişle bir PZR uygulaması “n” sayıda döngü içeriyor ise, ortamda en fazla “2n” sayıda amplifiye edilmiş DNA olacağı belirlenmiştir. Amplifikasyondan sonra PZR ürünlerin, genellikle, önceden hazırlanılan agaroz jel üzerindeki kuyucuklara yüklenerek, elektroforez işlemine tabi tutulması gereklidir (Taban 2007).

Agaroz jel elektroforezi; DNA fragmentlerinin, elektrik alanı varlığında, agaroz jel matriksi boyunca büyüklüklerine (uzunlukça) göre ayrılması amacı ile kullanılan bir işlemdir. Bu işlem ile ayrılan fragmentlerin büyüklükleri, uzunluğu bilinen fragmentler (moleküler ağırlık belirteci) ile karşılaştırılarak belirlenmektedir. DNA fragmentlerinin, fosfat gruplarındaki negatif yüklerden dolayı, elektroforez tankının negatif ucundan (katod) pozitif ucuna (anod) doğru jel matriks boyunca ilerledikleri ve kısa olan fragmentlerin uzun olanlara göre daha hızlı hareket ettikleri saptanmıştır. Agaroz jel elektroforez işlemi esnasında normalde görülemeyen bantlar oluşturan bu fragmentlerin farkedilmeden jelden akıp gitmesini önlemek amacı ile fragmentlere, jeldeki örnek kuyularına aktarılmadan önce, düşük moleküler ağırlığa sahip bir marker boya (bromfenol mavisi) ilave edilmektedir. Marker boyanın, jel matriks boyunca DNA fragmentlerine göre daha hızlı ilerlediği ve dolayısıyla jelden akıp gidene kadar elektroforez işleminin devam ettirilebildiği ve bu sayede DNA fragmentlerinin jel matriksde kaldığı saptanmıştır. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel, etidyum bromid boya çözeltisi içerisinde bir süre bekletilmekte ve ardından amplifiye edilen hedef DNA’ların gösterilmesi amacı ile UV ışık altında incelemeye alınmaktadır. Görüntüleme sonucunda agaroz jel üzerinde tanımlanan DNA fragmentlerinin uzunlukları, moleküler ağırlık belirteci referans alınarak belirlenmektedir (Westermeier 2001, Taban 2007, Stellwagen 2009).

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Peynir örnekleri

Çalışmada kullanılan 30 adet Beyaz ve 33 adet Tulum peyniri Ankara piyasasında açıkta satış yapan çeşitli hal ve pazaryerlerinden (Çizelge 3.1) belirli zaman aralıklarında tesadüfi olarak seçilerek alınmış, soğuk zincir kırılmadan Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi mikrobiyoloji laboratuvarına getirilmiş ve 10 g'lık parçalara ayrılarak, her biri vakit kaybetmeden aynı gün analize alınmıştır.

3.1.2 Bakteri kültürleri

S. aureus, SEA ifadeleyen gene sahip *S. aureus* ve SED ifadeleyen gene sahip *S. aureus* kültürleri, Justus-Liebig Üniversitesi, Veteriner Gıda Bilimleri Enstitüsü, Süt Bilimleri, Almanya'dan temin edilmiş ve - 80°C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir. Çalışma süresince kullanılan kültürlerin uygun zaman aralıkları ile triptik soy broth (TSB) besiyerine aktarımları yapılmış ve 37°C sıcaklıkta 24 saat inkübe edilerek aktive edilmişlerdir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan 63 adet peynir örneği

Örnek No	Örnek Adı	Örnek Alım Yeri
1	Elazığ Tulum peyniri	Çankaya Nişantaşı Pazarı
2	Malatya Beyaz peynir	Sıhhiye Semt Pazarı
3	Aydın Beyaz peynir	Çankaya Nişantaşı Pazarı
4	Trabzon Tulum peyniri	Çankaya Nişantaşı Pazarı
5	Tulum peyniri	Sıhhiye Semt Pazarı
6	Trakya Beyaz peynir	Yenimahalle Çamlıca Pazarı
7	Ankara Beyaz peynir	Yenimahalle Mesa Pazarı
8	Erzincan Beyaz peynir	Esat Pazarı
9	Kırşehir Tulum peyniri	Yenimahalle Mesa Pazarı
10	Ankara Tulum peyniri	Yenimahalle Mesa Pazarı
11	Ankara Tulum peyniri	Yenimahalle Mesa Pazarı
12	Erzincan Tulum peyniri	Yenimahalle Çamlıca Pazarı
13	Sivas Tulum peyniri	Yenimahalle Çamlıca Pazarı
14	Kars Tulum peyniri	Yenimahalle Çamlıca Pazarı

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan 63 adet peynir örneği (devam)

15	Kayseri Tulum peyniri	Yenimahalle Çamlıca Pazarı
16	Çubuk Beyaz peynir	Dışkapı Pazarı
17	Ankara Beyaz peynir	Ulus Hal Pazarı
18	Afyon Beyaz peynir	Dışkapı Pazarı
19	Kayseri Tulum peynir	Dışkapı Pazarı
20	Kayseri Tulum peyniri	Ulus Hal Pazarı
21	Ankara Beyaz peynir	Ulus Hal Pazarı
22	Ankara Beyaz peynir	Ulus Hal Pazarı
23	Erzincan Beyaz peynir	Dışkapı Pazarı
24	Köy Tulum peyniri	Ulus Hal Pazarı
25	Beyaz peynir	Dışkapı Pazarı
26	Erzincan Tulum peyniri	Ulus Hal Pazarı
27	Erzincan Tulum peyniri	Dışkapı Pazarı
28	Malatya Beyaz peynir	Sincan Törekent Pazarı
29	Tulum peyniri	Mamak Semt Pazarı
30	Erzincan Tulum peyniri	Sincan Törekent Pazarı
31	Tulum peyniri	Mamak Semt Pazarı
32	Tulum peyniri	Mamak Semt Pazarı
33	Beyaz peynir	Sincan Törekent Pazarı
34	Hatay Tulum peyniri	Mamak Semt Pazarı
35	Tulum peyniri	Sincan Törekent Pazarı
36	Tulum peyniri	Sincan Törekent Pazarı
37	Hatay Tulum peyniri	Mamak Semt Pazarı
38	Beyaz peynir	Mamak Semt Pazarı
39	Gümüşhane Tulum peyniri	Mamak Semt Pazarı
40	Tulum peyniri	Sincan Törekent Pazarı
41	Beyaz peynir	Batıkent Kapalı Pazarı
42	Beyaz peynir	Mamak Akşemsettin Pazarı
43	Beyaz peynir	Eryaman Etap Pazarı
44	Beyaz peynir	Eryaman Etap Pazarı
45	Beyaz peynir	Mamak Fatih Pazarı
46	Beyaz peynir	Eryaman Etap Pazarı
47	Beyaz peynir	Mamak Fahri Korutürk Pazarı
48	Erzincan Tulum peyniri	Batıkent Kapalı Pazarı
49	Erzincan Tulum peyniri	Aydınlıkevler Pazarı
50	Erzincan Tulum peyniri	Eryaman Devlet Mah. Pazarı
51	Beyaz peynir	Yenimahalle Çamlıca Pazarı
52	Beyaz peynir	Yenimahalle Çamlıca Pazarı
53	Beyaz peynir	Yenimahalle Mesa Pazarı
54	Beyaz peynir	Yenimahalle Mesa Pazarı
55	Beyaz peynir	Keçiören Kardeşler Pazarı
56	Tulum peyniri	Yenimahalle Mesa Pazarı
57	Tulum peyniri	Yenimahalle Mesa Pazarı

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan 63 adet peynir örneği (devam)

58	Tulum peyniri	Keçiören Kardeşler Pazarı
59	Tulum peyniri	Keçiören Kardeşler Pazarı
60	Tulum peyniri	Keçiören Kardeşler Pazarı
61	Beyaz peynir	Çukurambar Nişantaşı Pazarı
62	Beyaz peynir	100.Yıl Pazarı
63	Beyaz peynir	Dışkapı Örnek Mah. Pazarı

3.1.3 Besiyerleri ve enzimler

Çalışmada kullanılan TSB, Triptik soy agar (TSA), Baird Parker agar (BPA) ve Brain heart broth (BHB), Merck (Almanya) markalı besiyerleridir. Koagülaz testi sırasında kullanılan liyofilize tavşan plazması, Merck (Almanya) markalıdır. Bu besiyerlerinin ve liyofilize tavşan plazmasının bileşimleri ve hazırlanış şekilleri, EK 1 bölümünde verilmektedir.

3.1.4 Tampon ve çözeltiler

Çalışmada kullanılan ¼'lük Ringer çözeltisi, 10 mM tris-HCl çözeltisi (pH: 8.0), 10 mg/mL lizozim çözeltisi, 0.5 M Na₂EDTA (disodyum etilendiamin tetraasetik asit) çözeltisi (pH: 8.0) ve tris-borik asit-EDTA (TBE) tamponu (10X)'nın bileşimleri ve hazırlanış şekilleri, EK 2 bölümünde verilmektedir.

3.1.5 Boya çözeltileri

Araştırmada kullanılan 1 mg/mL etidyum bromür çözeltisi ve 6X yükleme boya çözeltisinin bileşimleri ve hazırlanış şekilleri, EK 3 bölümünde verilmektedir.

3.1.6 DNA izolasyonu ve saflaştırılması işlemi deney düzeneği

Çalışmada Nüve (Türkiye) markalı mikrosantrifüj kullanılmıştır. Bu düzenek; maksimum 14 000 devir/dakika hızda çalışabilen ve 24 adet standard mikrosantrifüj tüpünü tutabilen, otoklavlanabilir bir rotor ve bu rotorun kapağını içermektedir.

3.1.7 DNA izolasyonu ve saflaştırılması kiti

Çalışmada kullanılan Roche (Almanya) markalı high pure PCR template preparation (HPPTP) kitinin içeriği ve içeriğindeki tampon ve çözeltilerin hazırlanış şekilleri, EK 4 bölümünde verilmektedir.

3.1.8 PZR yöntemi deney düzeneği

Araştırmada THE-MWG (Almanya) markalı Primus 96 termocycler (Şekil 3.1) kullanılmıştır.

3.1.9 Oligonükleotidler

Çalışma esnasında termonükleaz gen bölgesi (*nuc* geninin) 279 bp'lik bölümünü amplifiye eden (Brakstad vd. 1992), *sea* geninin 219 bp'lik bölümünü amplifiye eden (Tsen ve Chen, 1992) ve *sed* geninin 317 bp'lik bölümünü amplifiye eden (Johnson vd. 1991) Integrated DNA Technologies (Almanya) markalı primer çiftleri kullanılmıştır. Bu primer çiftlerinin hazırlanış şekilleri EK 5 bölümünde verilmektedir.

3.1.10 Agaroz jel elektroforez işlemi deney düzeneği

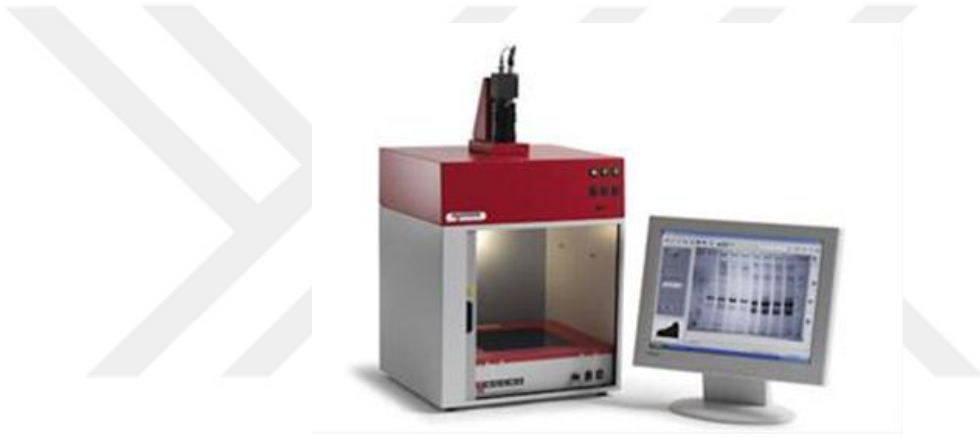
Çalışmada Serva (Almanya) markalı BlueMarine 100 ve BlueMarine 200 yatay elektroforez tankları ve bu tanklara uygun ebatlardaki jel tablaları ve tarakları ile birlikte BioRad (İngiltere) markalı PowerPac Basic güç kaynağı kullanılmıştır.

3.1.11 Jel görüntüleme işlemi deney düzeneği

Araştırmada Syngene (İngiltere) markalı InGenius jel görüntüleme ve analiz sistemi (Şekil 3.2) kullanılmıştır. Bu düzenek; karanlık oda, yüksek performanslı digital fotoğraf makinası, UV emisyon filtresi ve filtre kabini ve 302 nm'lik dalga boyunda çalışan UV translüminatörü içermektedir ve çalışma esnasında jel analizi software'i GeneTools içeren bilgisayara bağlı olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.1 PZR yöntemi deney düzeneği (Anonymous 2003)



Şekil 3.2 Jel görüntüleme ve analiz sistemi deney düzeneği (Anonymous 2004a)

3.2. Yöntem

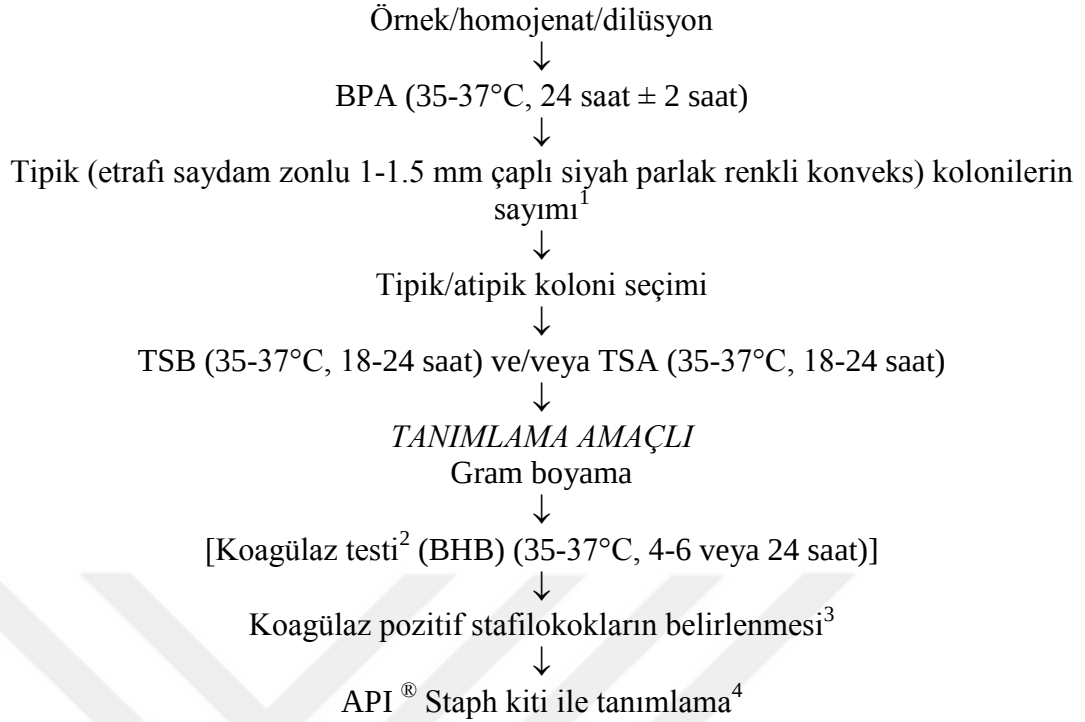
3.2.1 Peynir örneklerinden *S. aureus* izolasyonu ve tanımlanması

Ankara piyasasında açıkta satış yapan çeşitli hal ve pazaryerlerinden (Çizelge 1.1) belirli zaman aralıklarında tesadüfi olarak 30 adet Beyaz ve 33 adet Tulum peyniri örneği alınarak, soğuk zincir kırılmadan mikrobiyoloji laboratuvarına getirilmiştir. Herbir peynir örneğinden 10 g alınarak, 90 mL $\frac{1}{4}$ 'lük Ringer çözeltisi içeren steril filtreli Stomacher torbalarına aktarılmış ve Interscience Bag (Fransa) markalı bag mixer 400P cihazında homojenize edilmiştir. Hazırlanan bu homojenatların uygun dilüsyonları

yapılarak, EN/ISO 6888-1 (01/2004) yöntemine göre *S. aureus* izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3). Bu amaçla; her bir örneğin uygun dilüsyonlarından BPA besiyerine yayma yöntemi kullanılarak paralel ekim yapılmış ve petri kapları, 35-37°C sıcaklıkta 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, izole edilen etrafi saydam zonlu 1-1.5 mm çaplı siyah parlak renkli konveks yapıda tipik *S. aureus* kolonilerinin tanımlanması amacı ile, Gram boyama, koagülaz ve API[®] Staph kiti testleri gerçekleştirilmiştir.

İzolatların Gram reaksiyonunu belirlemek amacıyla, her bir izolat BHB kullanılarak 37°C sıcaklıkta 18-24 saat inkübe edilerek geliştirilmiş ve hazırlanan taze kültürlerden preparat hazırlanmıştır. Boyama aşamasında preparatlar ilk olarak, kristal violet boya çözeltisi ile 2-3 dakika boyanmış, preparat üzerindeki boya yıkanmış ve ardından preparat üzerine lugol çözeltisi eklenerek 1-2 dakika bekletilmiştir. Preparat üzerindeki lugol çözeltisinin yıkanmasının ardından preparata, absolut alkolde dekolorizasyon işlemi uygulanmış ve yine yıkama gerçekleştirilmiştir. Son olarak preparat, safranin çözeltisi ile 5-10 saniye bekletilerek boyanmış, preparat üzerindeki boya yıkanmış ve daha sonra kurumaya bırakılmıştır. Hazırlanan preparat ışık mikroskobu altında incelenmiş, mavi-mor renkli görülen hücreler, Gram pozitif olarak değerlendirilmiştir.

İzolatlara koagülaz aktivitesini belirlemek amacıyla liyofilize tavşan plazması 3 mL steril destile su ile sulandırılıp steril küçük tüplere 0.3 mL olacak şekilde dağıtılmış ve üzerlerine, BHB kullanılarak 37°C sıcaklıkta 18-24 saat inkübasyon sonunda elde edilen kültürlerden 0.1'er mL eklenerek, 37°C sıcaklıkta inkübe edilmişlerdir. Her saat başı tüplerde pıhtılaşma olup-olmadığı, tüpleri yavaşça eğerek kontrol edilmiş ve tüplerde belirgin pıhtı oluşumu (% 75 pıhtı), koagülaz pozitif olarak değerlendirilmiştir. Koagülaz pozitif stafilocoklar Biomérieux (Fransa) markalı API[®] Staph kiti kullanılarak kısmen tanımlanmıştır.



Şekil 3.3 EN/ISO 6888-1 (01/2004) yöntemi

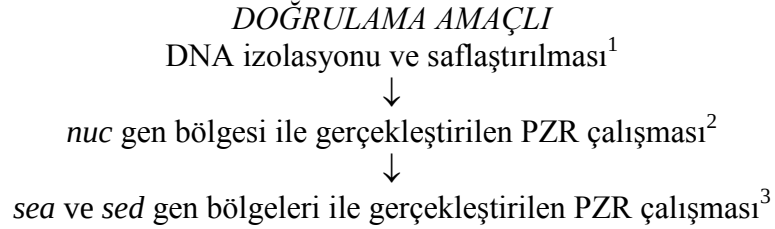
¹Stafilokokal intoksikasyona neden olan toksin düzeyine, *S. aureus* sayısı 100 000 kob/g-mL'den fazla olduğunda ulaşılmaktadır. Bu nedenle, *S. aureus* sayısı 5×10^5 kob/g-mL olan gıdalar kesinlikle riskli olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle peynir örneklerinde toplam stafilokok sayımı gerçekleştirilmiştir. *S. aureus* suşları için koagülaz reaksiyonu ile enterotoksin oluşumu arasında yüksek bir korelasyon olduğundan, sayım sonuçları yüksek çıkan peynir örnekleri SE varlığını belirlemek amacıyla (AOAC 2007.06) VIDAS SET 2 ile incelemeye alınmıştır. Bununla beraber gıdadaki düşük *S. aureus* sayısı da gıdanın kesinlikle güvenli olduğunu göstermemektedir (Tükel ve Doğan 2000).

²Koagülaz enzimi hücre dışı olarak serbest formda veya hücre yüzeyine bağlı olarak iki ayrı şekilde bulunabilmekte, protrombine bağlanarak aktivasyonunu sağlamakta ve bu şekilde fibrinojenin fibrine polimerize olmasını sağlamaktadır. Sonuçta fibrinle kaplanan bakteri hücre duvarı, fagositoza daha dirençli hale gelmektedir.

³Koagülaz aktivitesi *S. aureus* patojenitesini belirlemede önemli bir indikatördür. Koagülaz enzimi ile kandaki fibrinojen, fibrine dönüşerek koagülasyona sebep olmakta ve bu durum tavşan plazması ile belirlenebilmektedir. *S. aureus* suşları için koagülaz ve enterotoksin oluşumu arasında yüksek bir korelasyon olup, toksin varlığının gösterilemediği durumlarda koagülaz pozitif *S. aureus* sayısı önemli olmaktadır (Ünlütürk ve Turantaş 2003).

Gıdada koagülaz ve termonükleazın saptanması, *S. aureus* varlığını kanıtlamaktadır. Bu amaçla, API[®] Staph test kiti kullanılarak kısmen tanımlanmış izolatlar, doğrulama amaçlı olarak *nuc* genine sahip olup-olmadıkları açısından PZR ile incelenmiş ve bu incelemenin sonucunda *S. aureus* kesin olarak doğrulanmıştır. Ancak, termonükleaz ile enterotoksin varlığının oluşumu arasında bir ilişkinin olmadığı bildirilmektedir (Tükel

ve Doğan 2000). Bu amaçla da, tanımlaması doğrulanan *S. aureus* suşlarında bazı stafilkokal klasik enterotoksinleri ifadeleyen genlerin olup-olmadığı yine PZR ile araştırılmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 Çalışmanın ilerleyen aşamaları

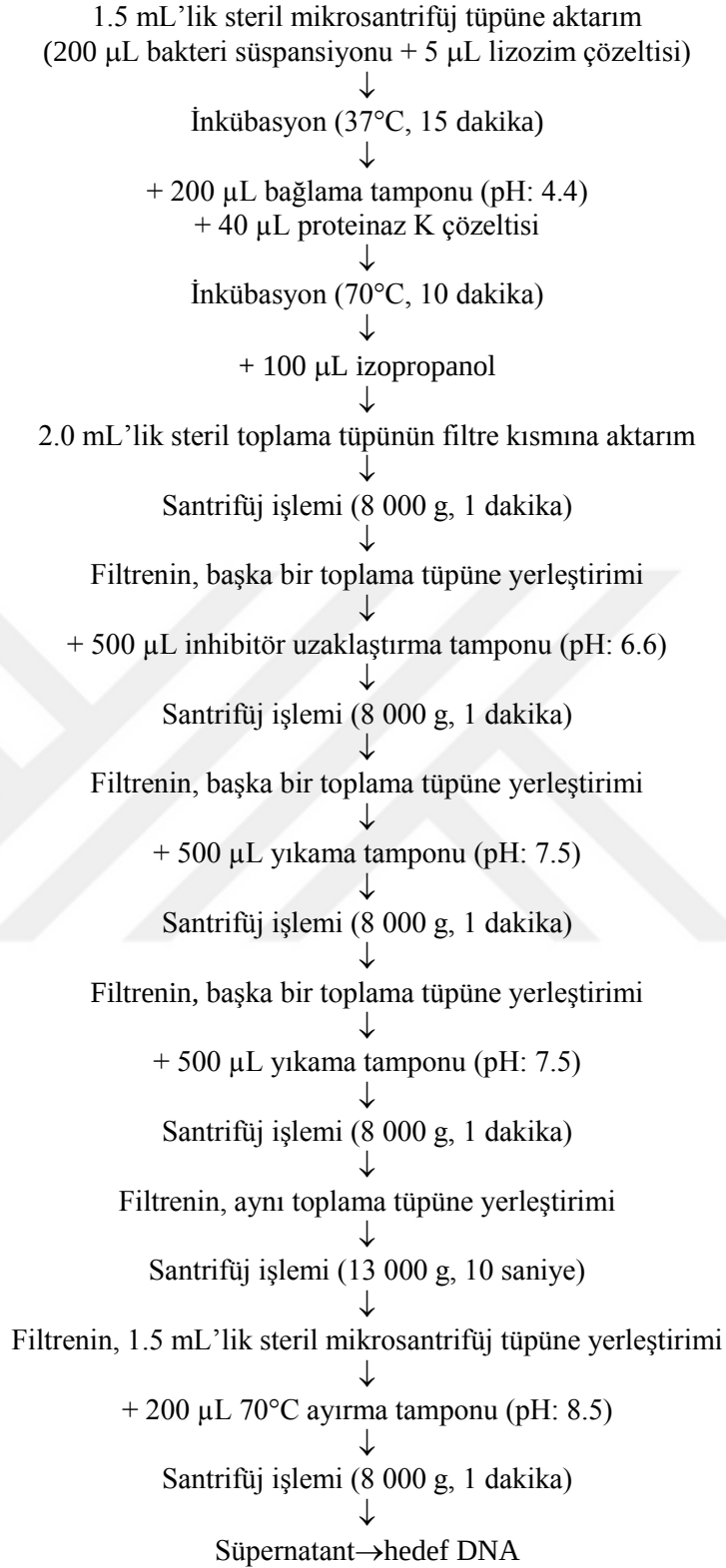
¹Çalışmada kullanılan DNA izolasyonu ve saflaştırılması işleminin uygulama basamakları Şekil 3.5’de gösterilmektedir.

²Çalışmada *S. aureus*’a özgü geni belirlemek amacıyla kullanılan primerlerin oligonükleotid dizileri Ek 5’de gösterilmektedir. Bu primer dizileri kullanılarak gerçekleştirilen PZR analizinde, Çizelge 3.2’de belirtilen PZR amplifikasyon bileşenleri derişim ve miktarları ve Çizelge 3.3. ve 3.4’de belirtilen PZR döngülerindeki parametre değerleri kullanılmıştır.

³Çalışmada SE’leri kodlayan genleri belirlemek amacıyla kullanılan primerlerin oligonükleotid dizileri Ek 5’de gösterilmiştir. Bu primer dizileri kullanılarak gerçekleştirilecek PZR analizinde Çizelge 3.2’de belirtilen PZR amplifikasyon bileşenleri derişim ve miktarları ve Çizelge 3.3 ve 3.4’de belirtilen PZR döngülerindeki parametre değerleri kullanılmıştır.

3.2.2 DNA izolasyonu ve saflaştırılması işlemi

API[®] Staph test kiti ile kısmen tanımlanmış *S. aureus* suşlarından DNA izolasyonu ve saflaştırılması işlemi, HPPTP kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5). Bu amaçla, 1.5 mL’lik steril mikrosantrifüj tüpüne, 200 µL bakteri süspansiyonu ve 5 µL lizozim çözeltisi eklenmiş ve 37°C sıcaklıkta 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Bu inkübasyonun ardından aynı tüpe, 200 µL bağlama tamponu ve 40 µL proteinaz K çözeltisi eklenerek hemen karıştırılmış ve 70°C sıcaklıkta 10 dakika süre ile ikinci bir inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra aynı tüpe 100 µL izopropanol eklenerek karıştırılmış ve bu



Şekil 3.5 API® Staph test kiti ile kısmen tanımlanmış *S. aureus* suşlarından DNA izolasyonu ve saflaştırılması uygulama basamakları (Anonymous 2004b)

karışım, filtre başlık içeren toplama tüpünün üstteki filtre kısmına aktararak, 8 000 g'de 1 dakika santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüj işlemi sonrası toplanan üst sıvıyı içeren (süpernatant) toplama tüpü atılarak, filtre başka bir steril toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Yeni toplama tüpüne yerleştirilen bu filtre kısmına, 500 µL inhibitör uzaklaştırma tamponu eklenerek, 8 000 g'de 1 dakika santrifüj işlemi yapılmıştır. Santrifüj işlemi sonrası üst sıvıyı içeren toplama tüpü atılarak filtre, başka bir steril toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Yeni toplama tüpüne yerleştirilen bu filtre kısmına, 500 µL yıkama tamponu eklenerek 8 000 g'de 1 dakika santrifüj işlemi yapılmıştır. Santrifüj işlemi sonrası üst sıvıyı içeren toplama tüpü atılarak filtre, başka bir steril toplama tüpüne yerleştirilmiş ve bir önceki işlem tekrar edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrası üst sıvı uzaklaştırılmış ve filtre, aynı toplama tüpüne yerleştirilerek, 13 000 g'de 10 saniye santrifüj işlemi yapılmıştır. Artakalan üst sıvıyı içeren toplama tüpü atılmış ve filtre, 1.5 mL'lik yeni bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir. 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilen filtre üzerine, 200 µL 70°C sıcaklıkta bekletilen ayırma tamponu eklenerek, 8 000 g'de 1 dakika süre ile son bir santrifüj işlemi yapılmıştır. Son olarak, filtre başlık atılmış ve tüpte kalan üst sıvı, hedef DNA'yı içerdiğinden, ileri aşamalarda kullanılmak üzere - 20°C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir (Anonymous 2004b).

3.2.3 PZR amplifikasyon bileşenleri

Çalışmada dNTP'lerin (dATP, dGTP, dCTP ve dTTP) herbirinin 10 mM'lık eşit derişimlerini içeren ve hazır halde ticari olarak satılan Roche marka (Almanya) PZR nükleotid karışım çözeltisi kullanılmıştır. PZR amplifikasyon karışımı hazırlanırken hedef DNA ve primerler arasında oluşabilecek özgün olmayan bağlanmaların *Taq* DNA polimeraz enzimi ile uzatılmasını önlemek amacı ile 75°C'nin altındaki sıcaklıklarda inaktif halde bulunan ancak 95°C'de 3 dakikalık bir beklemenin ardından aktif hale geçebilen ve hazır halde ticari olarak satılan Roche marka (Almanya) modifiye *Taq* (FastStart *Taq*) polimeraz enzim çözeltisi kullanılmıştır.

Çalışmanın bu aşamasında, *nuc* geninin 279 bp'lik bölümünü (Brakstad vd. 1992), *sea* geninin 219 bp'lik bölümünü (Tsen ve Chen 1992) ve *sed* geninin 317 bp'lik bölümünü (Johnson vd. 1991) amplifiye etmek amacı ile yapılan her bir PZR analizi hazırlığında

Çizelge 3.2’de verilen bileşenler kullanılarak toplam 30 µL’lik PZR amplifikasyon karışımı hazırlanmış ve kullanılmıştır (Akineden vd. 2008). Bu amaçla; ince çeperli 0.2 mL’lik PZR tüpü içerisinde, 2.5 µL hedef DNA, 19.9 µL ultra saf su ve 100 µM olarak hazırlanan primer çiftinden 1’er µL ile birlikte, hepsi Roche markalı (Almanya) olmak üzere hazır halde ticari olarak satılan 10 mM’lık PZR nükleotid karışımından 0.6 µL, 10X PZR tamponundan 3 µL, 25 mM’lık MgCl₂ çözeltisinden 1.8 µL, 5 U/µL’lik FastStart Taq DNA polimeraz enzim çözeltisinden 0.2 µL olacak şekilde toplam 30 µL’lik PZR amplifikasyon karışımı hazırlanmış ve kullanılmıştır.

3.2.4 PZR döngüsü parametre değerleri

Çalışmanın bu aşamasında, *nuc* geninin 279 bp’lik bölümü Çizelge 3.3’de belirtilen değerler, *sea* geninin 219 bp’lik ve *sed* geninin 317 bp’lik bölümleri Çizelge 3.4’de belirtilen değerler kullanılarak amplifiye edilmiştir.

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan PZR amplifikasyon bileşenleri derişim ve miktarları

Primer	Hedef gen bölgesi	PZR amplifikasyon bileşenleri derişim ve miktarları (µL)						
		Primer (100 µM)	PZR nükleotid karışımı (10 mM)	10X PZR tamponu	MgCl ₂ çözeltisi (25 mM)	FastStart Taq DNA polimeraz (5 U/µL)	Ultra saf su	Hedef DNA
nuc-1 nuc-2	nuc	1 1	0.6	3	1.8	0.2	19.9	2.5
SEA-1 SEA-2	sea	1 1	0.6	3	1.8	0.2	19.9	2.5
SED-1 SED-2	sed	1 1	0.6	3	1.8	0.2	19.9	2.5

Çizelge 3.3 *nuc* geninin 279 bç'lik bölümünün amplifikasyonu için kullanılan PZR döngüsündeki parametre değerleri

	Sıcaklık (°C)	Süre (saniye)	Döngü sayısı (adet)
Başlangıç denatürasyonu	95	180	1
Denatürasyon	94	60	37
Bağlanma	55	30	
Uzama	72	30	
Son uzama	72	210	1

Çizelge 3.4 *sea* geninin 219 bç'lik ve *sed* geninin 317 bç'lik bölümlerinin amplifikasyonu için kullanılan PZR döngüsündeki parametre değerleri

	Sıcaklık (°C)	Süre (saniye)	Döngü sayısı (adet)
Başlangıç denatürasyonu	95	180	1
Denatürasyon	94	120	30
Bağlanma	55	120	
Uzama	72	60	
Son uzama	72	210	1

PZR işlemleri sonrası elde edilecek tüm ampikonların (PZR yöntemi ile amplifiye edilen hedef DNA'ların) gösterilmesi amacıyla ampikonlar, ilk olarak, agaroz jel elektroforez işlemi uygulanarak etidyum bromür çözeltisi ile boyanmış agaroz jelde yürütülmüştür. Bu işlemi takiben elektroforez ortamından alınan jeller, 302 nm dalgaboyunda UV ışık altında moleküler ağırlık belirteci ile karşılaştırılarak görüntülemeye alınmış ve ilgili gen bölgeleri için yukarıda belirtilen ampikon uzunluklarına karşılık gelen DNA fragman bantları aranarak, ampikonlar değerlendirilmiştir.

3.2.5 Agaroz jel elektroforez işlemi

Çalışmanın bu aşamasında, amplifiye edilen hedef DNA'ların gösterilmesi amacı ile ilk olarak, agaroz jel elektroforez işlemi uygulanmıştır. Bu işlem esnasında, % 1.5'lik agaroz jeli (w/v) kullanılmıştır. Bu jelin içeriği ve hazırlanış şekli, EK 6 bölümünde verilmektedir.

Agaroz jel elektroforez işleminde ilk olarak tabla üzerinde oluşturulan agaroz jel, uygun ebatlardaki yatay elektroforez tankına yerleştirilmiş ve ardından tank içerisine, jelin üzerini kapatacak miktarda, TBE tamponundan (1X) ilave edilmiştir. Diğer taraftan, amplikonlardan 10'ar μL alınarak, 2'şer μL 6X yükleme boya çözeltisi ile karıştırılmışlardır. Boyanarak hazır hale getirilmiş bu amplikonlar, daha sonra, jeldeki kuyucuklara yüklenmiş ve ilk kuyucuğa yüklenen Fermentas markalı (Litvanya) 100 bç'lik GeneRuler™ DNA ladder plus (ready-to-use) moleküler ağırlık belirteci eşliğinde, yaklaşık 1-1.5 saat 90 volt sabit akımda yürütülmüşlerdir. 6X yükleme boya çözeltisinin jel sistemini terk etmesinden sonra, elektrik akımı kesilmiştir.

3.2.6 Jel görüntüleme işlemi

Çalışmanın bu aşamasında, amplifiye edilen hedef DNA'nın ve SEA ve SED'lerin gösterilmesi amacı ile son olarak, elektroforez ortamından alınan jel, 302 nm dalgaboyunda UV ışık altında moleküler ağırlık belirteci ile karşılaştırılarak görüntülemeye alınmış ve *nuc* geninin 279 bç'lik, *sea* geninin 219 bç'lik ve *sed* geninin 317 bç'lik uzunluklarına karşılık gelen DNA fragman bantları aranarak amplikonlar değerlendirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Ankara piyasasında açıkta satış yapan çeşitli hal ve pazaryerlerinden belirli zaman aralıklarında tesadüfî olarak seçilerek alınan 30 adet Beyaz ve 33 adet Tulum peyniri örneğinden, EN/ISO 6888-1 (01/2004) yöntemine göre yapılan *S. aureus* izolasyonu sonucu toplam 210 adet tipik *S. aureus* izolatu elde edilmiştir. Bu izolatların Gram boyama sonucu hepsi Gram pozitif, koagülaz testi sonucu ise 73 adedi koagülaz pozitif olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1). Koagülaz pozitif Stafilkokokların API[®] Staph kiti sonuçlarına göre; 1, 2, 9, 15, 27, 29 ve 34 no'lu örneklerden 1'er adet, 3, 51 ve 56 no'lu örneklerden 2'ser adet, 10 no'lu örnekden 4 adet, 4 ve 22 no'lu örneklerden 5'er adet olmak üzere toplam 27 adet izolat, kısmen tanımlanmış ve numarandırılmıştır (Şekil 4.2). Bu izolatların elde edildiği peynirlerdeki toplam stafilkokok sayıları ve bu izolatlar ile ilgili bilgiler, Çizelge 4.1'de verilmiştir. Çalışmanın ilerleyen aşamalarında bu 27 adet izolatta doğrulama amaçlı *nuc* geninin ve ayrıca SEA ve SED ifadeleyen genlerin olup-olmadığı araştırılmıştır.



Şekil 4.1 Koagülaz testi görüntülerinin bir kısmı



Şekil 4.2 API[®] Staph testleri görüntülerinin bir kısmı

Çizelge 4.1 Çalışmanın ilerleyen aşamalarında kullanılan izolatlar

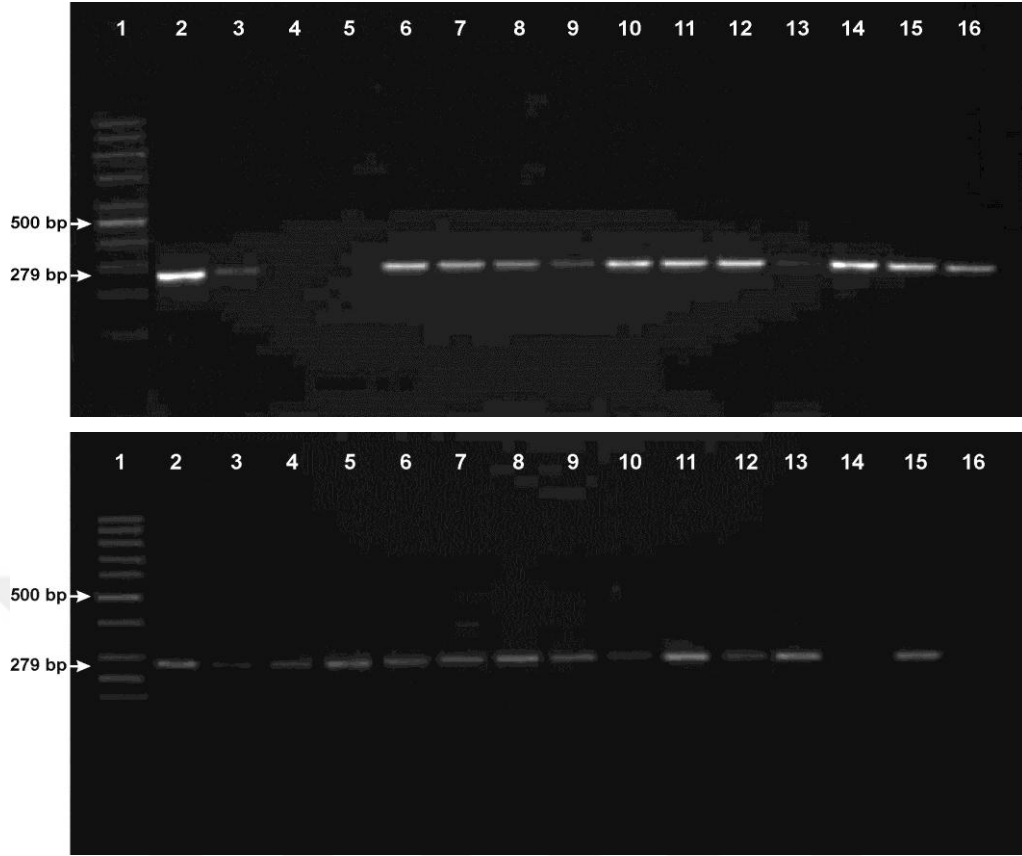
Örnek No	Örnek Adı	Pazar Yeri	Örnekdeki toplam stafilokok sayısı	İzolat No	API Staph (%)
1	Erzurum Tulum peyniri	Çankaya Nişantaşı Pazarı	9.4 X 10 ³	1.7	90
2	Malatya Beyaz peynir	Sıhhiye Semt Pazarı	7.4 X 10 ⁴	2.3	80.0
3	Aydın Beyaz peynir	Çankaya Nişantaşı Pazarı	5.7 X 10 ⁴	3.3, 3.5	98.1, 80.0
4	Trabzon Tulum peyniri	Çankaya Nişantaşı Pazarı	2.7 X 10 ⁴	4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6	80.0, 98.1, 98.1, 74.5, 74.5
9	Kırşehir Tulum peyniri	Yenimahalle Mesa Pazarı	3.7 X 10 ²	4.1 (2)	97.8
10	Ankara Tulum peyniri	Yenimahalle Mesa Pazarı	3.7 X 10 ³	5.4 (2), 5.5 (2), 5.6 (2), 5.8 (2)	86.7, 86.7, 77.7, 77.7
15	Kayseri Tulum peyniri	Yenimahalle Çamlıca Pazarı	3.4 X 10 ⁴	10.1 (2)	86.7
22	Ankara Beyaz peynir	Ulus Hal Pazarı	3.4 X 10 ^{5*}	7.1 (3), 7.2 (3), 7.3 (3), 7.4 (3), 7.6 (3)	86.7, 86.7, 77.7, 77.7, 77.7
27	Erzincan Tulum peyniri	Dışkapı Pazarı	3.0 X 10 ³	12.6 (3)	97.8
29	Tulum peyniri	Mamak Semt Pazarı	9.5 X 10 ²	2.1 (4)	97.8
34	Hatay Tulum peyniri	Mamak Semt Pazarı	3.0 X 10 ³	7.2 (4)	97.8
51	Beyaz peynir	Yenimahalle Çamlıca Pazarı	5.0 X 10 ^{6*}	1.3 (6), 1.5 (6)	98.1, 98.1
56	Tulum peyniri	Yenimahalle Mesa Pazarı	1.3 X 10 ^{5*}	6.3 (6), 6.11 (6)	98.1, 97.8

*Stafilokokal intoksikasyona neden olan toksin düzeyine, *S. aureus* sayısı 100 000 kob/g-mL'den fazla olduğunda ulaşılmaktadır. Bu nedenle, *S. aureus* sayısı 5 X 10⁵ kob/g-mL olan gıdalar kesinlikle riskli olarak kabul edilmektedir. Bu sebeple peynir örneklerinde toplam stafilokok sayımı gerçekleştirilmiştir. *S. aureus* suşları için koagülaz aktivitesi ve enterotoksin oluşumu arasında yüksek bir korelasyon olduğundan, 22, 51 ve 56 no'lu peynir örnekleri SE varlığı açısından (AOAC 2007.06) VIDAS SET 2 ile incelenmiş ve bu peynir örneklerinde herhangi bir SE varlığına rastlanılmamıştır.

2.5 µL hedef DNA ve 19.9 µL ultra saf su ile birlikte, 10 mM'lık PZR nükleotid karışımından 0.6 µL, 10X PZR tamponundan 3 µL, 25 mM'lık MgCl₂ çözeltisinden 1.8 µL, 5 U/µL'lik FastStart *Taq* DNA polimeraz enzim çözeltisinden 0.2 µL olacak şekilde toplam 30 µL'lik PZR amplifikasyon karışımı kullanılarak, 95°C'de 180 saniyelik

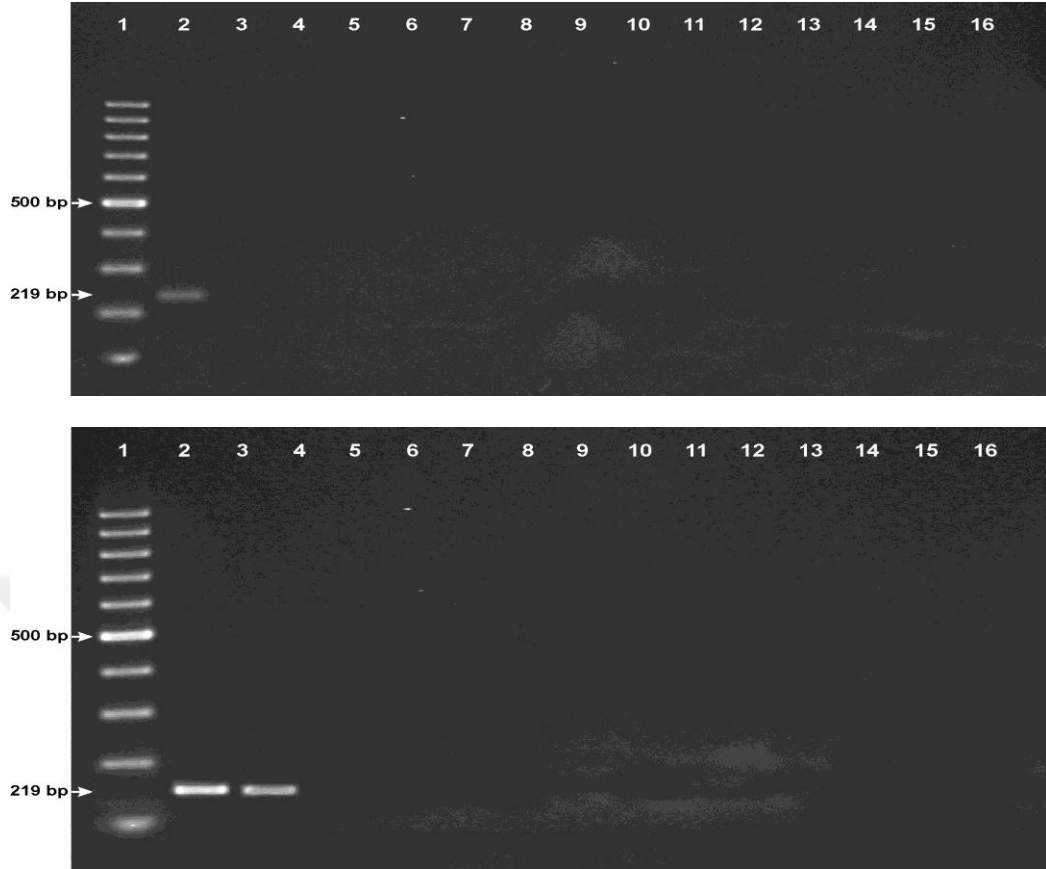
başlangıç denatürasyonu, 94°C’de 60 saniyelik denatürasyon, 55°C’de 30 saniyelik bağlanma ve 72°C’de 30 saniyelik uzama basamaklarının 37 kere tekrarlanmasını ve son olarak da 72°C’de 210 saniyelik son uzamayı içeren PZR işlemi gerçekleştirildiğinde, 27 adet izolatın 24 adedinde 279 bç’lik bölgesi amplifiye edilmiş ve dolayısı ile % 1.5’lik agaroz jelde 279 bç’lik bu özgün bant, yalnızca 2 no’lu örnekten izole edilen 2.3 no’lu izolatta, 3 no’lu örnekten izole edilen 3.3 no’lu izolatta ve 56 no’lu örnekten izole edilen 6.3 (6) no’lu izolatta gözlenilmemiştir. Bu çalışma esnasında, hatalı-pozitif ya da beklenilmeyen ürün (primer-dimer) bandına rastlanılmamıştır (Şekil 4.3).

2.5 µL hedef DNA ve 19.9 µL ultra saf su ile birlikte, 10 mM’lık PZR nükleotid karışımından 0.6 µL, 10X PZR tamponundan 3 µL, 25 mM’lık MgCl₂ çözeltisinden 1.8 µL, 5 U/µL’lik FastStart *Taq* DNA polimeraz enzim çözeltisinden 0.2 µL olacak şekilde toplam 30 µL’lik PZR amplifikasyon karışımı kullanılarak, 95°C’de 180 saniyelik başlangıç denatürasyonu, 94°C’de 120 saniyelik denatürasyon, 55°C’de 120 saniyelik bağlanma ve 72°C’de 60 saniyelik uzama basamaklarının 30 kere tekrarlanmasını ve son olarak da 72°C’de 210 saniyelik son uzamayı içeren PZR işlemi gerçekleştirildiğinde, 27 adet izolatın 1 adedinde 219 bç’lik bölgesi amplifiye edilmiş ve dolayısı ile % 1.5’lik agaroz jelde 219 bç’lik bu özgün bant, 10 no’lu örnekten izole edilen 5.6 (2) no’lu izolatta gözlenilmiştir. Bu çalışma esnasında, hatalı-pozitif ya da beklenilmeyen ürün (primer-dimer) bandına rastlanılmamıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.3 *S. aureus* izolatlarının termonükleaz gen bölgesine (*nuc* geni) sahip olup-olmadıkları açısından incelendiği PZR sonucunun % 1.5’lik agaroz jeldeki görüntüsü

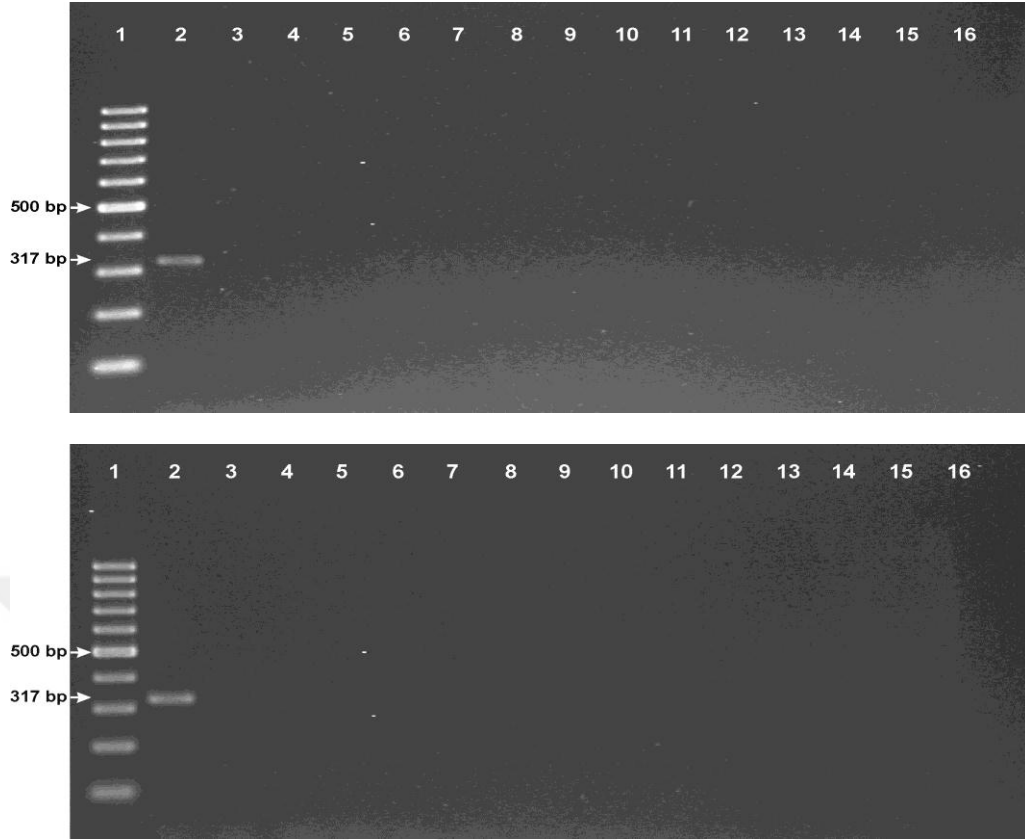
ÜST JEL		ALT JEL	
1	100 bç’lik moleküler ağırlık belirteci	1	100 bç’lik moleküler ağırlık belirteci
2	Pozitif kontrol (PK)	2	Pozitif kontrol (PK)
3	İzolat No: 1.7	3	İzolat No: 10.1 (2)
4	İzolat No: 2.3	4	İzolat No: 7.1 (3)
5	İzolat No: 3.3	5	İzolat No: 7.2 (3)
6	İzolat No: 3.5	6	İzolat No: 7.3 (3)
7	İzolat No: 4.2	7	İzolat No: 7.4 (3)
8	İzolat No: 4.3	8	İzolat No: 7.6 (3)
9	İzolat No: 4.4	9	İzolat No: 12.6 (3)
10	İzolat No: 4.5	10	İzolat No: 2.1 (4)
11	İzolat No: 4.6	11	İzolat No: 7.2 (4)
12	İzolat No: 4.1 (2)	12	İzolat No: 1.3 (6)
13	İzolat No: 5.4 (2)	13	İzolat No: 1.5 (6)
14	İzolat No: 5.5 (2)	14	İzolat No: 6.3 (6)
15	İzolat No: 5.6 (2)	15	İzolat No: 6.11 (6)
16	İzolat No: 5.8 (2)	16	İzolat No: Negatif kontrol (NK)



Şekil 4.4 *S. aureus* izolatlarının *sea* gen bölgesine sahip olup-olmadıkları açısından incelendiği PZR sonucunun % 1.5'lik agaroz jeldeki görüntüsü

ÜST JEL		ALT JEL	
1	100 bç'lik moleküler ağırlık belirteci	1	100 bç'lik moleküler ağırlık belirteci
2	Pozitif kontrol (PK)	2	Pozitif kontrol (PK)
3	İzolat No: 1.7	3	İzolat No: 5.6 (2)
4	İzolat No: 2.3	4	İzolat No: 7.1 (3)
5	İzolat No: 3.3	5	İzolat No: 7.2 (3)
6	İzolat No: 3.5	6	İzolat No: 7.3 (3)
7	İzolat No: 4.2	7	İzolat No: 7.4 (3)
8	İzolat No: 4.3	8	İzolat No: 7.6 (3)
9	İzolat No: 4.4	9	İzolat No: 12.6 (3)
10	İzolat No: 4.5	10	İzolat No: 2.1 (4)
11	İzolat No: 4.6	11	İzolat No: 7.2 (4)
12	İzolat No: 4.1 (2)	12	İzolat No: 1.3 (6)
13	İzolat No: 5.4 (2)	13	İzolat No: 1.5 (6)
14	İzolat No: 5.5 (2)	14	İzolat No: 6.3 (6)
15	İzolat No: 5.8 (2)	15	İzolat No: 6.11 (6)
16	İzolat No: 10.1 (2)	16	İzolat No: Negatif kontrol (NK)

2.5 µL hedef DNA ve 19.9 µL ultra saf su ile birlikte, 10 mM'lık PZR nükleotid karışımından 0.6 µL, 10X PZR tamponundan 3 µL, 25 mM'lık MgCl₂ çözeltisinden 1.8 µL, 5 U/µL'lik FastStart *Taq* DNA polimeraz enzim çözeltisinden 0.2 µL olacak şekilde toplam 30 µL'lik PZR amplifikasyon karışımı kullanılarak, 95°C'de 180 saniyelik başlangıç denatürasyonu, 94°C'de 120 saniyelik denatürasyon, 55°C'de 120 saniyelik bağlanma ve 72°C'de 60 saniyelik uzama basamaklarının 30 kere tekrarlanması ve son olarak da 72°C'de 210 saniyelik son uzamayı içeren PZR işlemi gerçekleştirildiğinde, 27 adet izolattın hiçbirinde 317 bp'lik bölgesi amplifiye edilememiş ve dolayısı ile % 1.5'lik agaroz jelde 317 bp'lik bu özgün bant, hiçbir izolatta gözlenilmemiştir. Bu çalışma esnasında, hatalı-pozitif ya da beklenilmeyen ürün (primer-dimer) bandına rastlanılmamıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 *S. aureus* izolatlarının *sed* gen bölgesine sahip olup-olmadıkları açısından incelendiği PZR sonucunun % 1.5'lik agaroz jeldeki görüntüsü

ÜST JEL		ALT JEL	
1	100 bç'lik moleküler ağırlık belirteci	1	100 bç'lik moleküler ağırlık belirteci
2	Pozitif kontrol (PK)	2	Pozitif kontrol (PK)
3	İzolat No: 1.7	3	İzolat No: 5.6 (2)
4	İzolat No: 2.3	4	İzolat No: 7.1 (3)
5	İzolat No: 3.3	5	İzolat No: 7.2 (3)
6	İzolat No: 3.5	6	İzolat No: 7.3 (3)
7	İzolat No: 4.2	7	İzolat No: 7.4 (3)
8	İzolat No: 4.3	8	İzolat No: 7.6 (3)
9	İzolat No: 4.4	9	İzolat No: 12.6 (3)
10	İzolat No: 4.5	10	İzolat No: 2.1 (4)
11	İzolat No: 4.6	11	İzolat No: 7.2 (4)
12	İzolat No: 4.1 (2)	12	İzolat No: 1.3 (6)
13	İzolat No: 5.4 (2)	13	İzolat No: 1.5 (6)
14	İzolat No: 5.5 (2)	14	İzolat No: 6.3 (6)
15	İzolat No: 5.8 (2)	15	İzolat No: 6.11 (6)
16	İzolat No: 10.1 (2)	16	İzolat No: Negatif kontrol (NK)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Peynirin hammaddesi olan çiğ sütte hayvan memesinden başlayarak, sütün depolanma, taşıma ve işlenmesi sırasında hijyenik koşullara, sıcaklık ve süreye bağlı olarak Stafilocoklar, özellikle de *S. aureus* her zaman bulunabilmekte ve peynirlerde kontaminasyon göstergesi olarak kullanılmaktadır. Ayrıca *S. aureus*, çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda sığırlarda mastitis etkeni olarak da önemli oranda izole edilmektedir. Çiğ sütün kontaminasyonu, yetersiz ısı işlem uygulamaları, kullanılan starter kültürlerin aktivitelerinin yetersizliği, üretim sürecinde yetersiz sanitasyon ve uygun olmayan depolama koşulları sonucunda *S. aureus*'un hızla gelişerek enterotoksin oluşturması, peynirlerde görülen stafilocokal intoksikasyonların başlıca nedenleri arasında yer almaktadır (Küçükçetin ve Milci 2008).

Ülkemizde çeşitli peynirlerde belirlenen *S. aureus* miktarlarının, peynir üretiminden satış noktasına kadar geçen süreçte gerekli hijyenik koşullara uyulmamasından dolayı oldukça yüksek düzeyde olduğu bilinmektedir (Özpınar 2011). Dolayısıyla bu çalışma ile, Ankara piyasasında açıkta satılan Beyaz ve Tulum peynirlerinde *S. aureus* varlığı belirlenmiş ve saptanan suşlarda gıda intoksikasyonları yönünden büyük önem arz eden bazı klasik enterotoksijenik özelliklerin (SEA ve SED) bir başka deyişle bazı stafilocokal klasik enterotoksinleri ifadeleyen genlerin olup-olmadığı oldukça özgün, hassas ve hızlı bir teknik olan PZR yöntemi kullanılarak araştırılmış ve bu peynirlerin tüketici sağlığı yönünden güvenilirliği belirlenerek, daha güncel ve kesin bir sonuca varılmıştır.

Ankara piyasasında açıkta satış yapan çeşitli hal ve pazaryerlerinden belirli zaman aralıklarında tesadüfî olarak seçilerek alınan 30 adet Beyaz ve 33 adet Tulum peyniri örneğinden, EN/ISO 6888-1 (01/2004) yöntemine göre toplam 210 adet tipik *S. aureus* izolatu elde edilmiştir. Bu izolatların 73 adedi koagülaz pozitif olarak belirlenmiş ve koagülaz pozitif Stafilocokların 27 adedi API[®] Staph kiti ile kısmen tanımlanmıştır. Bu suşlar bir kez de *nuc* genine sahip olup-olmadıkları açısından PZR ile incelenmiş ve 27 adet izolatın 24 adedinde *nuc* geninin 279 bp'lık bölgesi amplifiye edilebilmiştir. Bir

başka deyişle, 63 adet peynir örneğinin 12 adedinde (% 15.9) toplam 24 adet *S. aureus* suş varlığı kesin olarak doğrulanmıştır.

Çalışmanın ilerleyen aşamasında yalnızca 3 adet (% 4.8) peynir örneğinde *S. aureus* sayısı 5×10^5 kob/g'dan yüksek bulunmuş (Çizelge 4.1), ancak bu örneklerde ne herhangi bir SE varlığına ne de SEA ve SED sentezleyebilecek *S. aureus* varlığına rastlanılmamıştır. Bununla beraber peynirlerdeki düşük *S. aureus* sayısının peynirlerin kesinlikle güvenli olduğunu göstermediğinden, 24 adet *S. aureus* suşunda gıda intoksikasyonları yönünden önemli olan SEA ve SED'leri ifadeleyen genlerin olup-olmadığı PZR ile araştırılmış ve yalnızca *S. aureus* sayısı 3.7×10^3 olarak bulunan tek bir peynir örneğinden izole edilen bir suşta *sea* geninin 219 bç'lik bölgesi amplifiye edilebilmiş ancak hiçbir suşta *sed* geninin 317 bç'lik bölgesi amplifiye edilememiştir. Bir başka deyişle, 63 adet peynir örneğinin yalnızca 1 adedinin (% 1.6) SEA sentezleyebilecek *S. aureus* ile kontamine halde olduğu, bununla birlikte örneklerin hiçbirinde SED sentezleyecek *S. aureus* bulunmadığı saptanmıştır.

Sonuç olarak, incelenen peynir örneklerinin 3 adedinin *S. aureus* miktarı açısından Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'ne uygun olmadığı ancak bu peynir örneklerinin hiçbirinin SE içermediği belirlenmiştir. Diğer yandan 63 adet peynir örneğinin 1 adedinin SEA sentezleyebilecek *S. aureus* ile kontamine olmuş olması, bu örneğin hem üretiminin yetersiz sanitasyon koşullarında gerçekleşme olasılığını hem de enterotoksin içirme olasılığını göstermekte ve bu nedenle de stafilokokal intoksikasyonların oluşumunda halk sağlığı açısından risk oluşturmaktadır.

Dünyada ve ülkemizde tüketilen çeşitli peynirlerde enterotoksijenik stafilokokların tespiti ve SE tiplerinin belirlenmesine yönelik birçok çalışma bulunmaktadır. Türkiye'de en çok tüketilen süt ürünlerinin başında peynir yer almaktadır. Yapılan bir çalışmada, Erzurum'un farklı yerlerinden 30 adet olgunlaştırılmadan taze olarak tüketime sunulan Beyaz peynir örnekleri incelenmiş ve bu örneklerin 18 adedinin (% 60) 6.0×10^1 - 1.3×10^3 kob/g seviyesinde *S. aureus* ile kontamine olduğu belirlenmiştir (Sert ve Kıvanç, 1984). Ergün vd. (1992), Van'da satışa sunulan 25 adet Van otlu peynirinin 21 adedinde (% 84) 1.0×10^5 kob/g' dan fazla miktarda *S. aureus*

saptamışlardır. Tekinşen ve Çelik (1979), inceledikleri taze Şavak Beyaz peynirlerinin % 20.5'inin 5×10^5 kob/g'dan fazla, Patır vd. (1987) ise yine taze Şavak Beyaz peynirlerinin % 55.6'sının $10 \times 10^1 - 5.0 \times 10^5$ kob/g düzeyinde koagülaz pozitif *S. aureus* içerdiklerini belirlemişlerdir. Bir başka çalışmada 50 adet taze köy peyniri örneği mikrobiyolojik açıdan incelemeye alınmış ve peynirlerin % 30'unda $2.2 \times 10^4 - 4.1 \times 10^7$ kob/g seviyelerinde *S. aureus* olduğu belirlenmiştir (Şık 1995). Bolat (2006) ise, Ankara'nın çeşitli semtlerinden topladığı 75 adet Beyaz peynir örneğinden 37 farklı patojen mikroorganizmayı izole etmiş ve bu patojen mikroorganizmaların % 34'ünü *S. aureus* olarak tanımlamıştır. Tekinşen ve Özdemir (2006), Van ve Hakkari'deki marketlerden topladıkları 50 adet Van otlı peynirinin tamamında 2.48 - 7.15 log kob/g gibi oldukça yüksek seviyelerde *S. aureus* belirlemiş ve bu miktarın örneklerin % 54'ünde 5.0×10^5 kob/g'dan daha yüksek düzeylerde olduğunu saptamışlardır. Yapılan bu çalışmalarda, yürüttüğümüz çalışmaya göre oldukça fazla sayıda örnekte ve yasal limitlerin üzerinde *S. aureus* kontaminasyonu belirlenmiştir. Andre vd. (2008) tarafından 2004-2005 yıllarında Brezilya'da yürütülen bir çalışmada, 24 adet çiğ süt ve 24 adet Minas Frescal peyniri (Brezilya'ya özgü bir peynir çeşidi), *S. aureus* varlığı yönünden incelenmiş ve peynir örneklerinin 17 adedinden (% 70.8) *S. aureus* izole edilmiştir. Bu peynir örneklerindeki *S. aureus* sayısı ise ortalama 3.8×10^4 kob/g olarak saptanmıştır. Önganer vd. (2009), Diyarbakır'da taze olarak tüketilen 30 adet çökelek peynirinin mikrobiyolojik kalitesinin incelenmeye alındığı bir çalışmada, örneklerin tamamında yaklaşık 7.53 ± 1.12 log kob/g gibi oldukça yüksek seviyede *S. aureus* saptamışlardır. Bingöl vd. (2011) tarafından yapılan başka bir çalışmada, İstanbul'da perakende marketlerden toplanan 150 adet peynirin 40 adedinin (% 26.7) oldukça yüksek düzeyde enterotoksijenik Stafilokok türleri ile kontamine olduğu belirlenmiştir. Jakobsen vd. (2011), çiğ inek ve keçi sütlerinden yaptıkları peynirlerde *S. aureus*'un bulunma olasılığını incelemişler ve çiğ inek sütünden yapılan peynirlerde % 47.3 ve çiğ keçi sütünden yapılan peynirlerde % 98.8 oranlarında *S. aureus* varlığı saptamışlardır. Özpınar (2011), 132 adet Beyaz peynir örneğini, 70 günlük olgunlaşma süresince *S. aureus* bulundurma açısından incelemiş ve taze peynir örneklerinden yüksek sayıda *S. aureus* izolasyonu gerçekleştirmiştir. Olgunlaşmanın ilk haftalarında örneklerdeki *S. aureus* miktarı taze peynir örneklerindeki gibi yüksek olarak gözlenirken, son haftalarda örneklerdeki *S. aureus* seviyesinde düşme meydana geldiğini ve *S. aureus*'un

olgunlaşmanın en az 6. haftasına kadar canlılığını sürdürebildiğini ortaya koymuştur. Brooks vd. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, ABD’nde perakende ve çiftçi marketlerinden sağlanan çiğ süttten üretilen 41 adet peynir örneği mikrobiyal özellikleri açısından incelenmiş ve sadece 3 örnekte *S. aureus* olduğu tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar açısından çalışmamızdan farklı olarak 26 adet Erzincan Tulum peyniri ile yapılan bir çalışmada, örneklerin hiçbirinden *S. aureus* izole edilememiş ancak birinde SE saptanmıştır (Özalp vd. 1978). İngiltere’de koyun sütünden yapılan peynirler üzerine yapılan bir çalışmada örneklerin hiçbirinde *S. aureus* bulunmamış ancak örneklerde SEA’ya rastlanmıştır (Bone vd. 1989). Yine Kaynar vd. (2005), Ankara’daki marketlerden topladıkları Beyaz peynirlerin hiçbirinde *S. aureus* saptamamışlardır.

Castro vd. (1986), Şili’de ev yapımı peynirlerde yaptıkları bir araştırmada, örneklerden 103 adet *S. aureus* izole etmişler ancak örneklerin tamamında herhangi bir SE varlığı saptamamışlardır. Tkáčiková vd. (2003), mastitisli inek, koyun ve keçi sütlerinden yapılan 75 adet ve mastitisli koyun sütünden yapılan 12 adet peynir ile yaptıkları çalışmada, örneklerden 32 adet *S. aureus* izole etmişler ve bunlardan 15 adedinin *sec* geni ve geri kalan 15 adedinin de *sed* geni taşıyıcısı olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca elde edilen izolatlardan iki adedinin de hem *sea* hem de *seb* genleri taşıyıcısı olduğunu saptamışlardır. Ikeda vd. (2006), 38 adet peynir örneği ile yaptıkları çalışmada, örneklerin hiçbirinde klasik SE saptamamış, izole ettikleri 38 adet suşun 13 adedinin (% 34.2) *seg* ve *sei* genlerini taşıdığını belirlemişlerdir. Rosec vd. (1997), aralarında çiğ süttten üretilen peynirlerin de olduğu 121 adet gıda örneğinden elde ettikleri 213 adet *S. aureus* suşunu SE sentezleme özellikleri yönünden incelemiş ve çiğ süttten üretilen peynir örneklerinden izole edilen *S. aureus* suşlarının % 15,9’unun SE sentezleyebildiklerini belirlemişlerdir. Holečková vd. (2002), koyun peynirinden izole ettikleri 51 adet *S. aureus*’un 19 adedinin enterotoksijenik özellikte olduğunu ve çalışmamızdan farklı olarak bu izolatların 9 adedinin (% 47.4) SEB’yi sentezlediklerini saptamışlardır. Sancak et al. (2002), 50 adet Van otlu peynirinin % 14’ünde 8.4×10^1 - 5.2×10^4 kob/g seviyesinde *S. aureus* saptamışlar ve bu suşların % 42.8’inin enterotoksijenik özellikte olduğunu belirlemişlerdir. Küplülü vd. (2004) tarafından

yapılan bir çalışmada, 77 adet Beyaz, 65 adet Tulum ve 72 adet Kaşar peyniri olmak üzere toplam 214 adet peynir örneğinin 35 adedinin (% 16.4) enterotoksijenik *S. aureus* içerdiği saptanmıştır. Ayrıca, 41 adet enterotoksijenik *S. aureus* izolatının enterotoksin üretme yeteneklerini ve toksin tiplerini enzim ilintili immün test (ELIZA) yöntemi kullanarak belirlemişler ve buna göre 25 izolatın SEA, 4 izolatın SEB, 6 izolatın SEC, 5 izolatın hem SEA hem de SEC ve 1 izolatın da hem SEA hem de SED sentezlediğini saptamışlardır. Buna ek olarak, özellikle Tulum ve Beyaz peynirlerinin halk sağlığı açısından yüksek risk taşıdıklarını gözlemlemişlerdir. Lamprell vd. (2004), çiğ süttten yapılan peynirlerden izole ettikleri 852 adet *S. aureus* izolatının 63 adedinin (% 7.3) enterotoksijenik olduğunu ve çalışmamızdan farklı olarak, izolatların en çok SED'yi sentezlediklerini saptamışlardır. Jorgensen vd. (2005), Norveç'te 220 adet inek ve 213 adet keçi sütü ile, içinde peynir örneklerinin de bulunduğu çiğ süttten yapılan 82 adet süt ürününde enterotoksijenik *S. aureus* varlığı incelemişlerdir. İnek ve keçi sütü örnekleri ile çiğ süttten yapılan süt ürünlerinin sırasıyla 165 (% 75), 205 (% 96,2) ve 31 (% 37,8) adedinin *S. aureus* ile kontamine olduğu belirlenmiştir. İnek ve keçi sütlerinden elde edilen *S. aureus* izolatlarında, sırasıyla % 52.5 ve % 55.8'inde SE genleri bulunduğu saptanmıştır. Bu çalışmalarda, bizim yürüttüğümüz çalışmaya göre oldukça fazla sayıda örnekte SE sentezleyebilecek *S. aureus* kontaminasyonu olduğu görülmektedir. Normanno vd. (2005), 1 578 peynir örneğinin çalışmamıza göre oldukça yüksek bir miktarının yani 375 adedinin (% 23.7) koagülaz pozitif Stafilokok ile kontamine olduğunu ve 161 adet *S. aureus* izolatının 99 adedinin (% 61.5) klasik SE genlerinden en az birini içerdiğini saptamışlardır. Cremonesi vd. (2007) çiğ sığır ve keçi sütlerinden üretilen 33 adet peynir örneğinin tamamında *S. aureus* varlığı belirlemiş ve bunların 14 adedinin bazı SE'leri ifadeleyen genlere sahip olduğunu saptamışlardır. Normanno vd. (2007) 3 yıl boyunca et ve süt ürünleri üzerine yaptıkları bir çalışmada, 641 süt ürünleri örneğinin 109 (% 17) adedinin *S. aureus* içerdiğini ve bunlardan, çalışmamıza göre daha yüksek miktarlarda olmak üzere, 59 (% 54) adet izolatın bir ya da daha fazlasının SE sentezleyebilir özellikte olduğunu saptamışlardır. Rall vd. (2008), 54 adet çiğ süt örneğinin 38 adedinin (% 70.4) 8.9×10^5 kob/mL seviyesinde *S. aureus* içerdiğini belirlemişler ve elde ettikleri 57 adet *S. aureus* suşunun % 68.4'ünün en az bir veya birden fazla SE genini içerdiğini saptamışlardır. Ertas vd. (2010), 100 adet koyun peynirinin 60 adedinden *S. aureus* izole etmişler ve izolatların 5 adedinin sea, 2

adedinin *seb* ve 1 adedinin ise *sed* genlerini bulundurduklarını belirlemişlerdir. Ayrıca, ELIZA yöntemi ile peynirlerin 7 adedinde (% 2.3) SE saptamışlardır. Rosengren vd. (2010), 44 adet peynir örneğinden 156 adet koagülaz pozitif Stafilokok izole etmişler ve bu izolatların 152 adedinin (% 97) *S. aureus* olduğunu belirlemişler, elde edilen suşların 45 adedinde SE'leri ifadeleyen herhangi bir gen bulunmadığını ancak 67 adedinde *sec* geninin varlığını saptamışlardır. Bununla birlikte izolatların 40 adedinde ise SE'leri ifadeleyen birden fazla geni (*sea*, *seg*, *sei* veya *sea* ve *seh*) belirlemişlerdir. Spanu vd. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, çiğ koyun sütünden üretilen Tulum ve Beyaz peynir örneklerinde 3.9 - 5.8 log kob/g düzeyinde koagülaz pozitif Stafilokok bulunmuştur. Çalışmamız ile benzer olarak, burada elde edilen 12 adet *S. aureus* izolatının 3'ünün enterotoksijenik özellikte olduğu ve bunlardan 2'sinin de sadece SEC, 1'inin ise hem SEC hem de SED sentezleyebildikleri belirlenmiştir. Bu enterotoksijenik izolatlar sadece Tulum peyniri örneklerinden izole edilmiş ve Beyaz peynir örneklerinde enterotoksijenik *S. aureus*'a rastlanılmamıştır. Can and Çelik (2012), Ankara'da farklı marketlerde ambalajsız olarak satılan 200 adet peynirin 12 adedinde (% 6) ortalama olarak 4.31 log kob/g düzeyinde *S. aureus* saptamışlar ve ELIZA yöntemi kullanarak bu izolatların 2 adedinin yalnızca SEC, 1 adedinin ise hem SEC hem de SED oluşturabildiklerini saptamışlardır. Bu sonuçlar çalışmamıza paralel olarak, Beyaz ve Tulum peyniri örneklerinde hijyenik kalitenin yetersiz olduğunu göstermektedir. das Doros vd. (2013), 60 adet geleneksel olarak üretilen Minas peynir örneklerinden izole ettikleri 44 adet *S. aureus* suşunun % 12.5'inin hem SEA hem de SEC sentezleyebildiğini ve sadece 1 adet izolatta *seb* gen varlığını gözlemlemişlerdir.

Bostan vd. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, İstanbul'daki çeşitli satış noktalarından toplanan 30 adet Beyaz peynir örneğinde yaklaşık $10 - 9.2 \times 10^3$ kob/g seviyelerinde *S. aureus* saptamışlar ancak örneklerin hiçbirinde SE saptayamamışlardır. Aynı çalışmada, *S. aureus* sayısı bakımından peynir örneklerinin % 63'ünün Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'ne uygunluk göstermediği belirtilmiştir. Akineden vd. (2008), 181 adet keçi peyniri ile yaptıkları çalışmada, örneklerin sadece 14 adedinde (% 7.7) *S. aureus* varlığı belirlemişler, *S. aureus* varlığı belirlenen örneklerden izole edilen 64 adet *S. aureus* suşunun 19 adedinin (% 29) hem SEA hem de SEC sentezleyebildiğini saptamışlardır.

Şengül (2006), Erzurum’da farklı marketlerde satışa sunulan 15 Civil peynirinde *S. aureus* sayısının ortalama 4.1×10^4 kob/g olduğunu saptamış ve bunun nedeni olarak da Civil peyniri üretiminde genellikle çiğ süt kullanılmasının ve bu peynirin çoğunlukla taze olarak tüketilmesi olduğunu vurgulamıştır. Şimşek ve Sağdıç (2006), Isparta’ya özgü geleneksel bir peynir olan dolaz (tort) peyniri örneklerinin tamamında *S. aureus* seviyesi $< 10^1$ kob/g olarak saptamışlar ancak, bu farklılığın dolaz (tort) peyniri üretim tekniğinin Beyaz ve Tulum peyniri üretim tekniğinden farklı olması yani, peynir altı suyunun uzun süre kaynatılmasından kaynaklanacağını belirtmişlerdir. Kıvanç (1989), 48 adet Kaşar peynirini mikrobiyal özellikleri açısından incelemiş ve Şimşek ve Sağdıç (2006) çalışmasındaki gibi peynirlerde *S. aureus* seviyesinin oldukça düşük yani 9.5×10^2 kob/g seviyesinde olduğunu bildirmiştir. Aynı şekilde Günşen ve Büyükyörük (2003), 125 adet vakumla paketlenmiş taze Kaşar peyniri örneğinin yalnızca 4 adedinde (% 3.2) ortalama 6.25×10^2 kob/g seviyesinde *S. aureus* belirlemişlerdir. Her iki çalışmada da bu sonucun, Kaşar peyniri üretimi sırasında pıhtının haşlanmasından kaynaklandığı öne sürülmüştür.

Cremonesi vd. (2005), 111 süt örneğinin tamamında koagülaz pozitif *S. aureus* varlığı saptamışlar ve çalışmamızın aksine, 95 adet örneğin SE’lerden en az birini içerdiğini belirlemişlerdir. Fueyo vd. (2005), el yapımı peynir, krema ve dondurma örneklerinden 269 adet *S. aureus* izole etmişler ve çalışmamızdan daha yüksek miktarlarda olmak üzere, bunların 57 adedinin klasik SE’lerden en az birini içerdiğini saptamışlardır. Boynukara vd. (2008), Van köylerinde subklinik mastitis hastalığı taşıyan ineklerden 480 adet çiğ süt örneği almışlar ve bu örneklerden toplam 106 adet *S. aureus* izolatu elde etmişlerdir. Bu izolatların 27 adedinin (% 25.5) SE sentezleyebilme özelliği taşıdıkları belirtilmiş ve bunlardan 25 adedinin (% 23.6) *sea* geni, 2 adedinin ise (% 1.9) *seb* genlerini taşıdığı ancak izolatların hiçbirisinin *sec* ve *sed* genlerini bulundurmadıkları belirlenmiştir. Bu çalışmada da, bizim çalışmamıza benzer olarak örneklerin en çok *sea* geni içerdikleri ancak *sed* geni taşımadıkları vurgulanmıştır. Morandi vd. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada, inek, koyun, keçi ve manda sütü ve bu sütlerden yapılan peynir ve tereyağ örneklerinde toplam 122 adet *S. aureus* izolatının elde edildiği belirtilmiş ve elde edilen bu izolatlar ile yapılan PZR çalışması sonucunda çalışmamızdan farklı olarak bu izolatların % 65’inin SE genlerinden en az birini

taşıdıkları bulunmuştur. İzolatlarda en çok *sed* genine, daha sonra sırasıyla *sea*, *sec*, *sel* ve *sei* genlerine rastlanıldığı da belirtilmektedir. Singh ve Prakash (2010), 64 adet inek sütünün 42 adedinin koagülaz pozitif *S. aureus* barındırdığını ve bunların 25 adedinin de enterotoksijenik *S. aureus* olduğunu saptamışlardır. Ayrıca araştırmacıların, 71 adet Cottage peyniri ile yaptıkları çalışmada, 43 örneğin koagülaz pozitif *S. aureus* barındırdığını ve bunların 9 adedinin de enterotoksijenik *S. aureus* içerdiğini belirlemişlerdir. Başka bir çalışmada Aydın vd. (2011), Marmara Bölgesi'nde perakende ve çiftçi marketlerinden alınan ve aralarında süt ürünlerinin de bulunduğu 1 070 gıda örneğini *S. aureus* varlığı açısından analize almışlar ve elde ettikleri 144 izolatın % 92'sinin enterotoksijenik *S. aureus* olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmada da, bizim çalışmamıza benzer olarak *S. aureus*'lerde enterotoksijenik genlerinin olup-olmadığı PZR yöntemi ile araştırılmış ve izolatların % 53.3'ünün klasik enteroksin genlerine nazaran stafilokokal toksin benzeri (*seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep*, *seq* ve *seu*) genleri içerdikleri tespit edilmiştir. de Oliveira vd. (2011) Brezilya'da yaptıkları bir çalışmada, çalışmamıza benzer olarak, 50 adet süt örneğinde 34 (% 68) örnekte *S. aureus* belirlemişlerdir. Rahimi vd. (2012), 72 adet çiğ süt örneğinin 15 adedinde (% 20.8) en az bir adet SE bulunduğunu ve bu örneklerden 12 adedinin (% 16.7) SEA, 9 adedinin (12.5) SED ve 6 adedinin (% 8.3) SEC içerdiğini saptamışlardır. Rahimi (2013), 347 adet süt ürününün 20 adedinin (% 5.8) *S. aureus* içerdiğini belirlemiştir. İzole edilen *S. aureus* suşlarının 7 adedinin de (% 35) klasik SE genleri taşıyıcısı olduklarını belirtmişlerdir.

Yapılan bu araştırmalar dikkate alındığında, ülkemizde tüketilen farklı peynir çeşitlerinde *S. aureus* sayısının 10^5 kob/g'ın üzerine çıkması ve peynirlerin *S. aureus* kaynaklı intoksikasyonlara karşı halk sağlığı açısından önemli bir tehlike oluşturduğunu ortaya koymaktadır (Küçükçetin ve Milci 2008). Bu durum, Ankara piyasasında açıkta satılan Beyaz ve Tulum peynirlerinin hijyenik olmayan koşullar altında üretilip, çeşitli hal ve pazarlarda satıldıkları ve satılan bu peynirlerin gerek *S. aureus* gerekse enterotoksijenik (SEA üretebilen) *S. aureus* ile kontamine olabildiklerini göstermektedir. *S. aureus* süte uygulanan pastörizasyon işlemi ile inhibe olsa da, SE'ler inaktive edilememektedir. Bu nedenle peynirlerde düşük seviyede *S. aureus* bulunması veya hiç bulunmaması, onların stafilokokal intoksikasyonlara neden olmayacağı

anlamına gelmemektedir. Halk sağlığı açısından besin değerinin yüksek olmasından dolayı önemli bir yere sahip olan Beyaz ve Tulum peynirlerinin uygun olmayan koşullarda üretilmeleri ve bu yerlerde satılmaları durumunda risk oluşturdukları yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur. İnsan sağlığını tehdit etmeyecek peynirler için, mikrobiyolojik kalitesi yüksek sütlerin, yeterli pastörizasyon işleminden sonra hijyenik koşullar altında peynire işlenmeleri ve olgunlaştırma süresini tamamlandıktan sonra kontaminasyonları önlemek adına önlemlerin alındığı ve denetimlerin yapıldığı satış yerlerinde satılmaları gerekmektedir.

5.1 neriler

Peynirlerin mikrobiyel bozulma açısından son derece duyarlı ürünler olduğu bilinmektedir. Ülkemizde üretilen çiğ sütlerin hijyenik kaliteleri, peynir yapımı için genel olarak uygun bulunmamakta, bununla birlikte peynir üretiminden tüketime kadar geçen tüm aşamalarda hijyenik koşullara yeterince uyulmamaktadır. Peynirlerde mikrobiyolojik kalitenin yetersizliği, peynirlerin tüketicisi ile buluştuğu noktaya kadar geçen aşamalarda kullanılan alet ve ekipmanlardan, kullanılan sudan, personel ve kalite kontrolünün yetersizliğinden ayrıca satış noktalarında hijyene gereken önemin verilmemesinden kaynaklanmaktadır. Bunlara rağmen tüketicinin yoğun talebi üzerine geleneksel olarak çiğ sütten peynir üretimi yaygın bir şekilde devam etmektedir. Bu nedenle *S. aureus* açısından oluşabilecek riskleri en aza indirmek amacıyla peynir üretiminde pastörize süt kullanımı, peynir üreticilerinin, dağıtıcıların ve tüketicilerin hijyen konusunda bilinçlendirilmesi, çapraz kontaminasyonun önlenmesi, gıdaların hazırlama, pişirme ve servisinde kişisel hijyen kurallarına uyulması ve uygun sıcaklıklarda muhafazanın sağlanması, alınması gereken önemli tedbirler arasında yer almaktadır (Kaynar 2011, Tambulut 2011, Aslan 2012).

KAYNAKLAR

- Adams, M.R. and Moss, M.O. 2008. Food microbiology, 3rd edn, The Royal Society of Chemistry, 463, Cambridge, the UK.
- Akineden, O., Hassan, A.A., Schneider, E. and Usleber, E. 2008. Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese. International Journal of Food Microbiology, 124(2), 211-216.
- Akkaya, L. 2001. Otlu peynirlerde enterotoksijenik *Staphylococcus aureus* suşlarının üreme ve enterotoksin oluşturma yetenekleri . Doktora Tezi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Van.
- Alişarlı, M. ve Solmaz, H. 2003. Sağmal ineklerin meme başı derileri ve çiğ sütlerinden izole edilen *Staphylococcus aureus*'ların patojenite özellikleri ile bazı antibiyotiklere duyarlılıkları. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 34(4), 333-339.
- Alterkuse, S.F., Timbo, B.B., Mowbray, J.C., Bean, N.H. and Potter, M.E. 1998. Cheese-associated outbreaks of human illness in the United States, 1973 to 1992: Sanitary manufacturing practices protect consumers. Journal of Food Protection, 61(10), 1405-1407.
- Andre, M.C.D.P.B., Campos, M.R.H., Borges, L.J., Kipnis, A., Pimenta, F.C. and Serafini, A.B. 2008. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and minas frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following smai digestion. Food Control, 19(2), 200-207.
- Anonymous. 2000. Merck microbiology manual, Merck KGaA, 407p., Darmstadt, Germany.
- Anonymous. 2003. THE-MWG primus thermocyclers operating instructions manual, 24p., Ebersberg, Germany.
- Anonymous. 2004a. Sygene InGenius gel imaging and analysis system sheets. 3p., England.
- Anonymous. 2004b, Roche high pure PCR template preparation instructions manual, Penzberg, Germany, 22p.
- Anonim. 2011. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği.
- Asao, T., Kumeda, Y., Kawai, T., Shibata, T., Oda, H., Haruki, K., Nakazawa, H. and 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), 33-40.

- Aslan, Ö. 2012. Bazı gıdalardan izole edilen *Staphylococcus aureus*' ların enterotoksijenik özellikleri ve farklı antibiyotiklere duyarlılıklarının saptanması. Yüksek Lisans Tezi. Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Aydin, A., Sudagidan, M. and Muratoglu, K. 2011. Prevalence of staphylococcal enterotoxins, toxin genes and genetic-relatedness of foodborne *Staphylococcus aureus* strains isolated in the Marmara Region of Turkey. International Journal of Food Microbiology, 148(2), 99-106.
- Aytac, S.A. ve Taban, B. 2010. III. Kısım Bölüm 7: Gıda kaynaklı intoksikasyonlar. In: Gıda Mikrobiyolojisi, Erkmen, O. (ed.), 1. Baskı, Eflatun Basım Dağıtım Yayıncılık Danışmanlık Yatırım ve Tic. Ltd. Şti., 178-189, Ankara.
- Aytac, S.A. and Mercanoğlu-Taban, B. 2014. Foodborne microbial diseases and control: Foodborne infections and intoxications. In: Food Processing: Strategies for Quality Assessment. Malik, A., Erginkaya, Z., Ahmad, S. and Erten, H. (eds.), Springer, 191-225, the USA.
- Balaban, N. and Rasooly, A. 2000. Review: Staphylococcal enterotoxins. International Journal of Food Microbiology, 61(1), 1-10.
- Barbano, D.M., Rasmussen, R.R. and Lynch, J.M. 1991. Influence of milk somatic cell count and mil age on cheese yield. Journal of Dairy Science, 74(2), 369-388.
- Bhatia, A. and Zahoor, S. 2007. *Staphylococcus aureus* enterotoxins: A review. Journal of Clinical and Diagnostic Research, 1(2), 188-197.
- Bingöl, B., Çetin, Ö., Çolak, H. and Hampikyan, H. 2011. Presence of enterotoxin and verotoxin in Turkish cheeses sold in İstanbul. Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences, 36(4), 424-432.
- Blaiotta, G., Ercolini, D., Pennacchia, C., Fusco, V., Casaburi, A., Pepe, O. and Villani, F. 2004. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and sel in *S. aureus* AB-8802. Journal of Applied Microbiology, 97(4), 719-730.
- Bolat, S. 2006. Ankara yöresinde tüketime sunulan beyaz peynirlerde *Salmonella*-bazı patojen bakterilerin bulunma sıklığı ve proteolitik lipolitik aktiviteleri. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Bone, F.J., Bogie, D. and Morgan-Jones, S.C. 1989. Staphylococcal food poisoning from sheep milk cheese. Epidemiology and Infection, 103(3), 449-458.

- Bostan, K., Cetin, O., Buyukunal, S.K. and Ergun, O. 2006. The presence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in ready-to-cook meatballs and white pickled cheese. İstanbul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 32(3), 31-39.
- Boynukara, B., Gulhan, T., Mustafa, A., Gurturk, K. and 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. and 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.
- Brooks, J. C., Martinez, B., Stratton, J., Bianchini, A., Krokstrom, R. and Hutkins, R. 2012. Survey of raw milk cheeses for microbiological quality and prevalence of foodborn pathogens. Food Microbiology, 31(2), 154-158.
- Can, H.Y. ve Çelik, T.H. 2012. Detection of enterotoxigenic and antimicrobial resistant *S. aureus* in Turkish cheeses. Food Control, 24(1-2), 100-103.
- Castro, R., Schoebitz, R., Montes, R. and Bergdoll, M.S. 1986. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cheese from unpasteurized milk. Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie, 19(5), 401-402.
- Caraviello, D.Z., Weigel, K.A., Shook, G.E., and Ruegg, P.L. 2005. Assessment of the impact of somatic cell count on functional longevity in Holstein and jersey cattle using survival analysis methodology. Journal of Dairy Science, 88(2), 804-811.
- Cremonesi, P., Luzzana, M., Brasca, M., Morandi, S., Lodi, R., Vimercati, C., Agnellini, D., Caramenti, G., Moronic, P. and Castiglioni, B. 2005. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. Molecular and Cellular Probes, 19(5), 299-305.
- Cremonesi, P., Perez, G., Pisoni, G., Moroni, P., Morandi, S., Luzzana, M., Brasca, M. and Castiglioni, B. 2007. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in raw milk cheese. Letters in Applied Microbiology, 45(6), 586-591.
- das Dores, M.T., Dias, R.S., Arcuri, E.F., da Nobrega, J.E., Ferreira, C.L.D.F. 2013. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus aureus* isolated from Artisan Minas cheese from the Serra da Canastra-MG, Brazil. Food Science and Technology, 33(2), 271-275.
- de Buyser, M.L., Dufour, B., Maire, M. and Lafarge, V. 2001. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. International Journal of Food Microbiology, 67(1-2), 1-17.

- de Oliveira, L.P, Soares e Barros, L.S., Silva, V.C. and Cirqueira, M.G. 2011. Study of *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk consumed in the Reconcavo area of the State of Bahia, Brazil. Journal of Food Processing & Technology, 2(6), 1-5.
- Delbes, C., Alomar, J., Chougui, N., Martin, J.F. and Montel, M.C. 2006. *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production during the manufacture of uncooked, semihard cheese from cow`s raw milk. Journal of Food Protection 69(7), 2161-2167.
- Demirel, N.N. ve Karapınar, M. 2000. Süt ürünlerinde *Staphylococcus aureus*. Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu, Tebliğler Kitabı, 22-24 Mayıs, 78-85, Tekirdağ.
- do Carmo, L.S., Dias, R.S., Linardi, V.R., de Sena, M.J., dos Santos, D.A., de Faria, M.E., Pena, E.C., Jett, M. and Heneine, L. 2002. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. Food Microbiology, 19(1), 9-14.
- Ergün, Ö., Bostan, K. ve Sağun, E. 1992. Van otlu peynirlerinde mikrobiyolojik kalite ve küf florası. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 3 (1-2), 53-59.
- Erkmen, O. 2010. Gıda kaynaklı tehlikeler ve güvenli gıda üretimi. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi, 53(3), 220-235.
- Erol, İ. ve İşeri, Ö. 2004. Stafilokokal enterotoksinler. Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 51(2), 239-245.
- Ertas, N., Gönülalan, Z., Yildirim, Y. and Kum, E. 2010. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in sheep cheese and dairy desserts by multiplex PCR technique. International Journal of Food Microbiology, 142(1-2), 74-77.
- Ferguson, J.D., Azzaro, G., Gambina, M. and Licitra, G. 2007. Prevalence of mastitis pathogens in Ragusa, Sicily, from 2000 to 2006. Journal of Dairy Science, 90(12), 5798-5813.
- Fueyo, J.M., Mendoza, M.C. and Martin, M.C. 2005. Enterotoxins and toxic shock syndrome toxin *Staphylococcus aureus* recovered from human nasal carriers and manually handled foods: epidemiological and genetic findings. Microbes and Infection, 7(2), 187-194.
- Gauthier, M. and Blais, B. W. 2003. Comparison of different approaches for the incorporation of non-radioactive labels into polymerase chain reaction. Biotechnology Letters, 25, 1369-1374.

- Günşen, U. and Büyükyörük, I. 2003. Piyasadan temin edilen taze kaşar peynirlerinin bakteriyolojik kaliteleri ile aflatoksin M₁ düzeylerinin belirlenmesi. Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences, 27, 821-825.
- Hayaloğlu, A.A. 2008. Türkiye'nin peynirleri – Genel bir perspektif. Türkiye 10. Gıda Kongresi Bildiri Özeti Kitabı, 21-23 Mayıs, Erzurum.
- Holečková, B., Holoda, E., Fotta, M., Kalinacova, V., Gondol, J. and Grolmus, J. 2002. Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 9, 179-182.
- Huseby, M., Shi, K., Brown, C.K., Digre, J., Mengistu, F., Seo, K.S., Bohach, G.A., Schlievert, P.M., Ohlendorf, D.H. and Earhart, C.A. 2007. Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology, 189(23): 8719-8726.
- Ikeda, T., Morimoto, Y., Makino, S. and Yamaguchi, K. 2006. Surveillance of *Staphylococcus aureus* in cheese produced in Hokkaido. Journal of Food Protection, 69(3), 516-519.
- Jakobsen, R.A., Heggebø, R., Sunde, E.B. and Skjervheim, M. 2011. *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in Norwegian raw milk cheese production. Food Microbiology, 28(3), 492-496.
- Johnson, W.M., Tyler, S.D., Ewan, E.P., Ashton, F.E., Pollard, D.R. and Rozee, K.R. 1991. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *S. aureus* by the polymerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiology, 29(3), 426-430.
- Jorgensen, H.J., Mork, T., Hogasen, H.R. and Rovik, L.M. 2005. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. Journal of Applied Microbiology, 99(1), 158-167.
- Kaynar, Z., Kaynar, P. ve Koçak, C. 2005. Ankara piyasasında tüketime sunulan beyaz peynirlerin hijyenik kalitelerinin belirlenmesi üzerine bir araştırma. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 62(1,2,3), 1-10.
- Kaynar, P. 2011. Ülkemiz peynirleri üzerine mikrobiyolojik araştırmalar. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 41(1), 1-8.
- Kérouanton, A., Hennekinne, J.A, Letertre, C., Petit, L., Chesneau, O., Brisabois, A. and de Buyser, M.L. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. International Journal of Food Microbiology, 115(3), 369-375.
- Kıvanç, M. 1989. Erzurum piyasasında tüketime sunulan Kaşar peynirlerinin mikrobiyal florası. Gıda Dergisi, 14(1), 23-30.

- Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I. and Khorana, H.G. 1971. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *Journal of Molecular Biology*, 56(2), 341-346.
- Küçükçetin, A. ve Milci, S. 2008. *S. aureus* ile kontamine olan peynirlerden kaynaklanan gıda zehirlenmeleri. *Gıda Dergisi*, 33(3), 129-135.
- Küplülü, Ö., Sarımeahmetoğlu, B. and Kaymaz, Ş. 2002. Pastörize sütlerde ELISA tekniğı ile stafilokokal enterotoksin varlığının belirlenmesi. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 26(3), 631-637.
- Küplülü, O., Sarımeahmetoglu, B. and Çelik, T.H. 2004. Determination of the enterotoxigenicity of coagulase positive staphylococci isolated from cheese by ELISA. *Milchwissenschaft*, 59(1-2), 17-19.
- Lamprell, H., Villard, L., Chamba, J.F., Beuvier, E., Borges, E., Maurin, F., Mazerolles, G., Noel, Y. and 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.
- Landgraf, M. and Destro, M.T. 2013. Staphylococcal food poisoning, In: *Foodborne Infections and Intoxications*. Morris, Jr. J.G. and Potter, M.E. (eds), 4th edn, Academic Press, 389–401, the USA.
- Le Loir, Y., Baron, F. and Gautier, M. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*, 2(1), 63-76.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A. and Clark, D.P. 2013. *Brock biology of microorganisms*, 13th edn, Pearson Education Inc., 579, San Francisco, the USA.
- Morandi, S., Brasca, M., Lodi, R., Cremonesi, P. and 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.
- Morandi, S., Brasca, M., Andrighetto, C., Lombardi, A. and Lodi, R. 2009. Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* strains from Italian dairy products. *International Journal of Microbiology*, 501362, 1-7.
- Nakazawa, Y. and Hosono, A. 1992. *Functions of fermented milk*, Elsevier Science Published Ltd., 245, New York.

- Normanno, G., Firinu, A., Virgilio, S., Mula, G., Dambrosio, A., Poggiu, A., Decastelli, L., Mioni, R., Scuota, S., Bolzoni, G., Di Gianatale, E., Salinetti, A.P., La Salandra, G., Bartoli, M., Zuccon, F., Pirino, T., Sias, S., Parisi, A., Quaglia, N.C. and Celano, G.V. 2005. Coagulase-positive *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *Journal of Food Microbiology*, 98(1), 73-79.
- Normanno, G., La Salandra, G., Dambrosio, A., Quaglia, N.C., Corrente, M., Parisi, A., Santagada, G., Firinu, A., Crisetti, E. and Celano, G.V. 2007. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 115(3), 290-296.
- Ollis, G.W., Rawluk, S.A., Schoonderwoerd, M., and Schipper, C. 1995. Detection of *S. aureus* in bulk tank milk using modified Baird-Parker culture media. *The Canadian Veterinary Journal*, 36(10), 619-623.
- Olsen, S.J., MacKinon, L.C., Goulding, J.S., Bean, N.H. and Slutsker, L. 2000. Surveillance for foodborne disease outbreaks-United States 1993-1997. *Morbidity and Mortality Weekly Reports*, 49(1), 1-51.
- Omoe, K., Hu, D.L., Takahashi-Omoe, H., Takahashi-Omoe, H., Nakane, A. and Shinagawa, K.. 2003. Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. *Infection and Immunity*, 71(10), 6088-6094.
- Önganer, A. ve Kırbağ, S. 2009. Diyarbakır'da taze olarak tüketilen çökelek peynirlerinin mikrobiyolojik kalitesi. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 25(1-2), 24-33.
- Özalp, E., Kaymaz, Ş. ve Akşehirli, E. 1978. Erzincan Tulum peynirlerinde enterotoksijenik Stafilokoklar ve Salmonellalar yönünden araştırma. *Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 25(11), 56-61.
- Özpınar N. 2011. Erzincan Tulum Peynirinden izole edilen *Staphylococcus aureus* İzolatlarında Antibiyotik Direncinin Ve Biyofilm Oluşturma Özelliğinin Fenotipik ve Genotipik Olarak Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 61, Kayseri.
- Patır, B. 1987. Şavak salamura Beyaz Peynirin olgunlaşması sırasında enterotoksijenik koagülaz pozitif *Staphylococcus aureus*'un yaşam süreleri ile mikrobiyolojik ve kimyasal niteliklerinde meydana gelen değişimler. *Doğa Türk Veteriner Hayvan Dergisi*, 11(1), 59-71.
- Pelisser, M.R., Klein, C.S., Ascoli, K.R., Zotti, T.R. and Arisil, A.C.M. 2009. Occurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(1), 145-148.

- Pinchuk, I.V., Beswick, E.J. and Reyes, V.E. 2010. Staphylococcal enterotoxins. *Toxins*, 2(1), 2177-2197.
- Rahimi, E., Mommtaz, H., Shakerian, A. and 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.
- Rahimi, E. 2013. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* isolated from traditional and commercial dairy products marketed in Iran. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(2), 393-399.
- Rall, V.L.M, Vieira, F.P., Rall, R., Vieitis, R.L., Fernandes, J.R.A., Candeias, J.M.G., Cardoso, K.F.G. and Araujo, J.R.J.P. 2008. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. *Veterinary Microbiology*, 132(3-4), 408-413.
- Rosec, J.P., Guiraud, J.P., Dalet, C. and Richard, N. 1997. Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. *International Journal of Food Microbiology*, 35(3), 213-221.
- Rosec, J.P and Gigaud, O. 2002. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *International Journal of Food Microbiology*, 77 (2), 61-70.
- Rosengren, A., Fabricius, A., Guss, B., Sylvéna, S. and Lindqvist, R. 2010. Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies. *International Journal of Food Microbiology*, 144(2), 263-269.
- Sağlam, A. 2011. Adana’da satışa sunulan dondurmalarda stafilokokal enterotoksinlerinin varlığının saptanması ve *Staphylococcus aureus* identifikasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Sancak, Y.C., Alişarlı, M. ve Akkaya, L. 2002. Otlı peynirlerde enterotoksijenik *Staphylococcus* suşları ve enterotoksin varlığı üzerine bir araştırma. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 8(1-2), 70-75.
- Santos, E.C. and Genigeorgis, C. 1981. Survival and growth of *Staphylococcus aureus* in commercially manufactured Brazilian Minas cheese. *Journal of Food Protection*, 44(3), 177-184.
- Seo, K.S. and Bohach, G.A. 2007. Foodborne pathogenic bacteria. *Staphylococcus aureus*. In: *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, Doyle, M.P. and Beuchat, L.R.(eds.), 3rd edn, ASM Press, 493-518, Washington, the USA.

- Sert, S. ve Kıvanç, M. 1984. Erzurum piyasasında taze olarak tüketime sunulan Beyaz peynirlerin hijyenik kaliteleri üzerinde bir araştırma. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 15(3-4), 79-83.
- Scherrer, D., Corti, S., Muehlherr, J.E., Zweifel, C. and Stephan, R. 2004. Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. Veterinary Microbiology, 101(2), 101-107.
- Schrack, F.N., Hockett, M.E., Saxon, A.M., Lewis, M.J., Dowler, H.H. and Oliver, S.P. 2001. Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. Journal of Dairy Science, 84(6), 1407-1412.
- Singh, P. and Prakash, A. 2010. Prevalence of coagulase positive pathogenic *Staphylococcus aureus* in milk and milk products collected from unorganized sector of AGRA. Acta Agriculturae Slovenica, 96(1), 37-41.
- Spanu, V., Virdis, S., Scarano, C., Cossu, F., de Santis, E.P.L. and Cosseddu, A.M. 2010. Antibiotic resistance assessment in *S. aureus* strains isolated from raw sheep's milk cheese. Veterinary Research Communications, 34(1), 87-90.
- Stellwagen, N.C. 2009. Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. Electrophoresis, 30(1), S188-S195.
- Şengül, M. 2006. Microbiological characterization of Civil cheese, a traditional Turkish cheese: microbiological quality, isolation and identification of its indigenous Lactobacilli. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 22(6), 613-618.
- Şık, B. 1995. Kırsal kesimde üretilen ve taze olarak pazarlarda satılan peynirlerin bazı patojen mikroorganizma içerikleri ve kimyasal özellikleri üzerine araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi. Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya.
- Şimşek, B. ve Sağdıç, O. 2006. Isparta ve yöresinde üretilen dolaz (tort) peynirinin bazı kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 10(3), 346-351.
- Taban, B. 2007. İmmünomanyetik ayırma-polimeraz zincir reaksiyonu (İMA-PZR) yönteminin uygulanması ile tavuk etlerinde *Salmonella* spp. belirlenmesi. Doktora Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Tkáčiková, L., Tesfaye, A. and Mikula, I. 2003. Detection of the genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxin by PCR. Acta Veterinaria Brno, 72, 627-630.

- Tamarapu, S., McKillip, J.L. and Drake, M. 2001. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. *Journal of Food Protection*, 64, 664-668.
- Tambulut, Y. 2011. Köy peynirinin starter kültürle üretilmesi ve kalite özelliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale.
- Tekinşen, O.C. ve Çelik, C. 1979. Şavak peynirinde *Staphylococcus*lar ve *Micrococcus*lar. *Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 26(3-4), 47-63.
- Tekinşen, K.K. and Özdemir, Z. 2006. Prevalence of foodborne pathogens in Turkish Van otlu (Herb) cheese. *Food Control*, 17(9), 707-711.
- Tsen, H.Y. and Chen, T.R. 1992. Use of the polymerase chain reaction for specific detection of type A, D and E enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in foods. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37(5), 68-690. Erratum in: 38(5), 708.
- Tükel, Ç. ve Doğan, H. 2000. *Staphylococcus aureus*:. In: Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. 2. Baskı, Sim Matbaacılık Ltd., 357-366, Ankara.
- Uygun, Ü. ve Köksel, H. 2010. Gıda güvenliğini tehdit eden kimyasallar. Web Sitesi: <http://www.ggd.org.tr/icerik.php?id=342>, Erişim Tarihi: 18.07.2015.
- Ünlütürk, A. ve Turantaş, F. 2003. *Staphylococcus aureus* intoksikasyonu, In: Gıda Mikrobiyolojisi, Beta Matbaacılık Hizmetleri, 141-145, Bornova, İzmir.
- Waldvogel, F.A. 2000. *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock), In: Mandell, Douglas and Bennet's Principles and Practice of Infectious Diseases, Mandell, G.L., Bennett, J.E. and Dolin, R. (eds), Churchill Livingstone, 2069-2092, New York, the USA.
- Westermeier, R. 2001. Electrophoresis in practice, 3rd edn, Wiley-Vch, 349, Germany.
- Wilson, D.J., Gonzalez, R.N. and Das, H.H. 1997. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: Prevalence and effects on somatic cell count and milk production. *Journal of Dairy Science*, 80(10), 2592-2598.
- Zweifel, C., Rusch, M., Corti, S. and Stephan, R. 2006. Determination of various microbiological parameters in raw milk and raw milk cheese produced by biofarms. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 57:13-16.

EKLER

- EK 1 Çalışmada Kullanılan Besiyerleri
- EK 2 Çalışmada Kullanılan Tampon ve Çözeltiler
- EK 3 Çalışmada Kullanılan Boya Çözeltileri
- EK 4 Çalışmada Kullanılan Kitler
- EK 5 Çalışmada Kullanılan Oligonükleotidler
- EK 6 Çalışmada Kullanılan Jel

EK 1 Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

TSB-MERCK Cat. No. 1.05459

Mikroorganizmaların geliştirilmesinde kullanılmıştır.

Çizelge 1. TSB bileşimi

BİLEŞEN	DERİŞİM (g/L)
Kazein peptonu	17.0
Soya peptonu	3.0
D (+) glukoz	2.5
NaCl	5.0
K ₂ PO ₄	2.5
pH: 7.3 ± 0.2 (sterilizasyon sonrası)	

Hazır karışımdan 30 g tartılarak, 1000 mL destile su içerisinde çözündürülür. Test tüplerine gerekli miktarlarda dağıtılarak, otoklavda 121°C sıcaklıkta 15 dakika süre ile sterilize edilir. Besiyerini içeren tüpler, 4°C sıcaklıkta muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilmelidir (Anonymous 2000).

TSA-MERCK Cat. No. 1.05458

Mikroorganizmaların geliştirilmesinde kullanılmıştır.

Çizelge 2. TSA bileşimi

BİLEŞEN	DERİŞİM (g/L)
Kazein peptonu	17.0
Soya peptonu	3.0
D (+) glukoz	2.5
NaCl	5.0
K ₂ PO ₄	2.5
Agar	15.0
pH: 7.3 ± 0.2 (sterilizasyon sonrası)	

TSB besiyerinin hazır karışımına 15 g agar (Merck Cat. No. 1.01613) eklenerek ya da hazır karışımdan 45 g tartılarak, 1000 mL destile su içerisinde çözündürülür. Erlen veya balon gibi cam kaplara ya da test tüplerine gerekli miktarlarda dağıtılarak, otoklavda 121°C sıcaklıkta 15 dakika süre ile sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası, erlen veya balon gibi cam kaplardaki besiyeri steril petri kaplarına dökülerek katılaşmaya bırakılır

ya da besiyerini içeren tüpler yatık halde katılaşmaya bırakılır. Besiyerini içeren petri kapları, ters olarak, 4°C sıcaklıkta muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi yüzeyleri kurutulmalıdır. Besiyerini içeren tüpler de, 4°C sıcaklıkta muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilmelidir (Anonymous 2000).

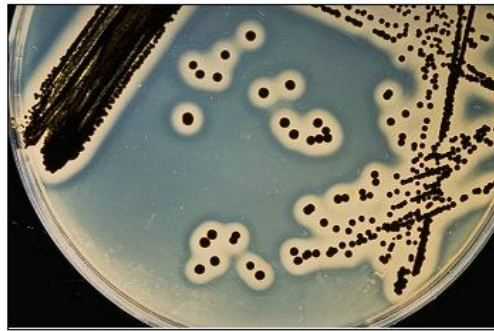
BPA-MERCK Cat. No. 1.05406

EN/ISO 6888-1 (01/2004) yönteminde selektif katı besiyeri olarak kullanılmıştır.

Çizelge 3. BPA bileşimi

BİLEŞEN	DERİŞİM (g/L)
Kazein peptonu	10.0
Et ekstraktı	5.0
Maya ekstraktı	1.0
Sodyum pürivat	10.0
Glisin	12.0
Lityum klorür	5.0
Agar	15.0
pH: 6.8 ± 0.2 (sterilizasyon sonrası)	

Hazır karışımdan 58 g tartılarak, 950 mL destile su içerisinde çözündürülür. Erlen veya balon gibi cam kaplara gerekli miktarlarda dağıtılarak, otoklavda 121°C sıcaklıkta 15 dakika süre ile sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası, bazal besiyeri 45°C sıcaklığa soğutulur ve manyetik karıştırıcıda yavaşça karıştırılırken üzerine önceden oda sıcaklığına getirilmiş 50 mL yumurta sarısı-tellurit emülsiyonu (Merck Cat. No. 1.03785) ilave edilip, steril petri kaplarına dökülerek katılaşmaya bırakılır. Besiyerini içeren petri kapları, ters olarak, 4°C sıcaklıkta muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi yüzeyleri kurutulmalıdır (Anonymous 2000).



Şekil 1 BPA besiyerinde *S. aureus* koloni morfolojisi

Opak sarı renkli bu besiyerinde *S. aureus* kolonileri lipoliz ve proteoliz aktiviteleri sonucunda koloni etrafında tipik zon ve halka oluşturmaları, tellürit'in tellürium'a indirgenmesi sonucunda siyah koloni oluşturmaları gibi tipik karakteristik özellikler ile belirlenmektedirler. 37°C sıcaklıkta 24 saat inkübasyon sonunda *S. aureus*, 1-1.5 mm çapında siyah, parlak konveks koloniler oluşturmaktadır. Koloni çapı, 48 saat inkübasyondan sonra, 1.5-2.5 mm olmaktadır.

BHB-MERCK Cat. No. 1.10493

Mikroorganizmaların geliştirilmesinde kullanılmıştır.

Çizelge 4. BHB bileşimi

BİLEŞEN	DERİŞİM (g/L)
Nutrient substrate (beyin ekstraktı, kalp ekstraktı ve peptonlar)	27.5
D (+) glukoz	2.0
NaCl	5.0
Na ₂ HPO ₄	2.5
pH: 7.4 ± 0.2 (sterilizasyon sonrası)	

Hazır karışımdan 37 g tartılarak, 1000 mL destile su içerisinde çözündürülür. Erlen veya balon gibi cam kaplara ya da test tüplerine gerekli miktarlarda dağıtılarak, otoklavda 121°C sıcaklıkta 15 dakika süre ile sterilize edilir. Besiyerini içeren cam kaplar ya da tüpler, 4°C sıcaklıkta muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilmelidir (Anonymous 2000).

Bactident koagülaz-MERCK Cat No. 1.13306

S. aureus tarafından oluşturulan koagülazın belirlenmesinde kullanılmıştır.

Çizelge 5. Bactident koagülaz bileşimi

BİLEŞEN
EDTA ilave edilmiş liyofilize tavşan plazması

Her şişe üzerine 3 mL steril destile su ilave edilerek, karıştırılır. Sulandırılmış bu plazma, 4°C sıcaklıkta 5 gün ve -20°C sıcaklıkta dondurulmuş olarak 30 gün boyunca stabilitesini korumaktadır. Ancak, dondurulmuş plazma çözöldükten sonra tekrar dondurulmamalıdır (Anonymous 2000).

EK 2 Çalışmada Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

¼'lük Ringer çözeltisi-MERCK Cat. No. 1.15525

Genel amaçlı bir seyreltme çözeltisi olarak ardışık dilüsyonların hazırlanmasında kullanılmıştır.

Çizelge 6. ¼'lük Ringer çözeltisi bileşimi

BİLEŞEN	DERİŞİM (g/L)
NaCl	2.25
KCl	0.105
Susuz CaCl ₂	0.06
NaHCO ₃	0.05
pH : 6.9 ± 0.1 (sterilizasyon sonrası)	

Bu bileşenleri içeren 1 tablet, 500 mL destile su içerisinde çözündürülür. Erlen veya balon gibi cam kaplara ya da test tüplerine gerekli miktarlarda dağıtılarak, otoklavda 121°C sıcaklıkta 15 dakika süre ile sterilize edilir. Besiyerini içeren cam kaplar ya da tüpler, 4°C sıcaklıkta muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilmelidir (Anonymous 2000).

10 mM Tris-HCl çözeltisi (pH: 8.0)

Lizozim çözeltisinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

Çizelge 7. 10 mM Tris-HCl çözeltisi bileşimi

BİLEŞEN	DERİŞİM (g/L)
Tris	1.211
pH: 8.0 (HCl ile) (sterilizasyon öncesi)	

Belirtilen miktarda tartılan bileşeni içeren çözeltinin pH'sı, HCl çözeltisi ile 8.0'a ayarlanır. Erlen veya balon gibi cam kaplara gerekli miktarlarda dağıtılarak, otoklavda 121°C sıcaklıkta 15 dakika süre ile sterilize edilir. Çözelti, oda sıcaklığında muhafaza edilmelidir (Taban 2007).

10 mg/mL Lizozim çözeltisi

DNA izolasyonu ve saflaştırılması basamağında kullanılmıştır.

Çizelge 8. 10 mg/mL Lizozim çözeltisi bileşimi

BİLEŞEN	DERİŞİM (g/mL)
Lizozim	0.01

Bileşen belirtilen miktarda tartılarak, 1 mL steril 10 mM Tris-HCl çözeltisi (pH: 8.0) içerisinde çözündürülür. Mikrosantrifüj tüpü gibi steril plastik tüplere gerekli miktarlarda dağıtılarak, -18°C sıcaklıkta muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi sıcaklığına getirilmelidir (Taban 2007).

0.5 M Na₂EDTA (Disodyum etilendiamin tetraasetik asit) çözeltisi (pH: 8.0)

Tris-Borik asit-EDTA (TBE) tamponu hazırlanmasında kullanılmıştır.

Çizelge 9. 0.5 M Na₂EDTA çözeltisi bileşimi

BİLEŞEN	DERİŞİM (g/L)
Na ₂ EDTA-2H ₂ O	186.12
pH: 8.0 (NaOH ile) (sterilizasyon öncesi)	

Belirtilen miktarda tartılan bileşeni içeren çözeltinin pH'sı, NaOH çözeltisi ile 8.0'a ayarlanır. Erlen veya balon gibi cam kaplara gerekli miktarlarda dağıtılarak, otoklavda 121°C sıcaklıkta 15 dakika süre ile sterilize edilir. Çözelti, oda sıcaklığında muhafaza edilmelidir (Taban 2007).

Tris-Borik asit-EDTA (TBE) tamponu (1X)

Agaroz jel elektroforezi basamağında, bu tamponun 10 kat seyreltilmiş hali (10X) kullanılmıştır.

Çizelge 10. Tris-Borik asit-EDTA tamponu bileşimi

BİLEŞEN	DERİŞİM (g/L)
Tris	108.0
Borik asit	55.0
0.5 M Na₂EDTA çözeltisi (pH: 8.0)	40.0 mL

Bileşenler belirtilen miktarlarda tartılarak, 1000 mL destile su içerisinde çözündürülür. Erlen veya balon gibi cam kaplara gerekli miktarlarda dağıtılarak, oda sıcaklığında muhafaza edilmelidir (Taban 2007).



EK 3 Çalışmada Kullanılan Boya Çözeltileri

1 mg/mL Etidyum bromür çözeltisi

Agaroz jel elektroforezi basamağında kullanılmıştır.

Çizelge 11. 1 mg/mL Etidyum bromür çözeltisi bileşimi

BİLEŞEN	DERİŞİM (mg/mL)
Etidyum bromür	1

Bileşen belirtilen miktarda tartılarak*, 1 mL steril destile su içerisinde çözündürülür. Mikrosantrifüj tüpü gibi steril plastik tüplere gerekli miktarlarda dağıtılarak, 4°C sıcaklıkta ve karanlıkta muhafaza edilmelidir (Taban 2007).

* Etidyum bromür son derece mutajenik ve toksik bir madde olduğundan, tartım esnasında mutlaka eldiven giyilmeli ve maske kullanılmalıdır.

6X Yükleme boya çözeltisi

Agaroz jel elektroforezi basamağında kullanılmıştır.

Çizelge 12. 6X Yükleme boya çözeltisi bileşimi

BİLEŞEN
10 mM Tris-HCl çözeltisi (pH: 7.6)
% 0.03 bromfenol mavisi (v/v)
% 0.03 ksilen siyanol FF (v/v)
% 60 gliserol (v/v)
60 mM EDTA çözeltisi

Çözelti, -18°C sıcaklıkta muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi 4°C sıcaklıkta tutularak çözündürülmelidir (Taban 2007).

EK 4 Çalışmada Kullanılan Kitler

HPPTP kit-ROCHE Cat. No. 11 796 828 001

DNA izolasyonu ve saflaştırılması basamağında kullanılmıştır.

Çizelge 13. HPPTP kit içeriği

İÇERİK	MİKTAR
Doku eritme tamponu (pH: 7.4)*	20 mL
Bağlama tamponu (pH: 4.4)**	20 mL
Proteinaz K***	100 mg
Inhibitör uzaklaştırma tamponu (pH: 6.6)****	33 mL
Yıkama tamponu (pH: 7.5)*****	20 mL
Ayırma tamponu (pH: 8.5)*****	40 mL
Steril filtre başlık	100 adet
2.0 mL'lik steril toplama tüpü	400 adet

* Doku eritme tamponu (pH: 7.4); 4 M üre, 200 mM Tris, 20 mM NaCl, 200 mM EDTA içermektedir. Tampon, oda sıcaklığında muhafaza edilmelidir (Anonymous 2004b). Bu kitin memeli kanı ve dokularından nükleik asit izolasyonu ve saflaştırılması işlemlerinde de kullanılabilirliğinden dolayı, kit içeriğinde bu tampon da yer almaktadır ancak çalışma esnasında kullanılmamıştır.

** Bağlama tamponu (pH: 4.4); 6 M guanidin-HCl, 10 mM üre, 10 mM Tris-HCl, % 20 triton X-100 (v/v) içermektedir. Tampon, oda sıcaklığında muhafaza edilmelidir.

*** Proteinaz K, liyofilize halde bulunmaktadır ve 4.5 mL ultra saf su ile karıştırılarak çözelti haline getirilir. Çözelti, -18°C sıcaklıkta muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi 4°C sıcaklıkta tutularak çözdürülmelidir.

**** İnhibitör uzaklaştırma tamponu (pH: 6.6), 20 mL saf etanol ile karıştırılarak kullanılmaktadır. Bu durumda, 5 M guanidine-HCl ve 20 mM Tris-HCl içermektedir. Tampon, oda sıcaklığında muhafaza edilmelidir.

***** Yıkama tamponu (pH : 7.5), 80 mL saf etanol ile karıştırılarak kullanılmaktadır. Bu durumda, 20 mM NaCl ve 2 mM Tris-HCl içermektedir. Tampon, oda sıcaklığında muhafaza edilmelidir.

***** Ayırma tamponu (pH: 8.5), 10 mM Tris içermektedir. Tampon, oda sıcaklığında muhafaza edilmelidir (Taban 2007).

EK 5 Çalışmada Kullanılan Oligonükleotidler

nuc-1 ve nuc-2 primerleri-Integrated DNA Technologies

PZR basamağında kullanılmışlardır.

Çizelge 14. nuc-1 primerinin özellikleri

BİLEŞİM

5'-GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT-3'

UZUNLUK : 21 baz

MOLEKÜL AĞIRLIĞI : 6532.3 g/mol

T_m (50 mM NaCl) : 55.4°C

GC İÇERİĞİ : % 47.6

MİKTAR : **0.18 mg, 26.9 nmol**

nuc-1 primeri, liyofilize halde bulunmaktadır ve 269 µL ultra saf su ile karıştırılarak 100 pmol/µL'lik çözelti haline getirilir. Ancak çalışma esnasında kullanılmak üzere, 10 pmol/µL'lik stok çözeltisi hazırlanır. Stok çözelti, -18°C sıcaklıkta muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi 4°C sıcaklıkta tutularak çözündürülmelidir.

Çizelge 15. nuc-2 primerinin özellikleri

BİLEŞİM

5'-AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC-3'

UZUNLUK : 24 baz

MOLEKÜL AĞIRLIĞI : 7339.8 g/mol

T_m : 59.8°C

GC İÇERİĞİ : % 50.0

MİKTAR : **0.18 mg, 23.9 nmol**

nuc-2 primeri, liyofilize halde bulunmaktadır ve 239 µL ultra saf su ile karıştırılarak 100 pmol/µL'lik çözelti haline getirilir. Ancak çalışma esnasında kullanılmak üzere, 10 pmol/µL'lik stok çözeltisi hazırlanır. Stok çözelti, -18°C sıcaklıkta muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi 4°C sıcaklıkta tutularak çözündürülmelidir.

SEA-1 ve SEA-2 Primerleri-Integrated DNA Technologies

PZR basamağında kullanılmışlardır.

Çizelge 16. SEA-1 primerinin özellikleri

BİLEŞİM

5'-AAA GTC CCG ATC AAT TTA TGG CTA-3'

UZUNLUK : 24 baz

MOLEKÜL AĞIRLIĞI : 7335,8 g/mol

T_m (50 mM NaCl) : 54.4°C

GC İÇERİĞİ : % 37.5

MİKTAR : **0.23 mg, 31.3 nmol**

SEA-1 primeri, liyofilize halde bulunmaktadır ve 313 µL ultra saf su ile karıştırılarak 100 pmol/µL'lik çözelti haline getirilir. Ancak çalışma esnasında kullanılmak üzere, 10 pmol/µL'lik stok çözeltisi hazırlanır. Stok çözelti, -18°C sıcaklıkta muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi 4°C sıcaklıkta tutularak çözündürülmelidir.

Çizelge 17. SEA-2 primerinin özellikleri

BİLEŞİM

5'-GTA ATT AAC CGA AGG TTC TGT AGA-3'

UZUNLUK : 24 baz

MOLEKÜL AĞIRLIĞI : 7415.9 g/mol

T_m : 52.2°C

GC İÇERİĞİ : % 37.5

MİKTAR : **0.22 mg, 29 nmol**

SEA-2 primeri, liyofilize halde bulunmaktadır ve 290 µL ultra saf su ile karıştırılarak 100 pmol/µL'lik çözelti haline getirilir. Ancak çalışma esnasında kullanılmak üzere, 10 pmol/µL'lik stok çözeltisi hazırlanır. Stok çözelti, -18°C sıcaklıkta muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi 4°C sıcaklıkta tutularak çözündürülmelidir.

SED-1 ve SED-2 Primerleri-Integrated DNA Technologies

PZR basamağında kullanılmışlardır.

Çizelge 18. SED-1 primerinin özellikleri

BİLEŞİM

5'-CTA GTT TGG TAA TAT CTC CT-3'

UZUNLUK : 20 baz

MOLEKÜL AĞIRLIĞI : 6073 g/mol

T_m (50 mM NaCl) : 45.7°C

GC İÇERİĞİ : % 35

MİKTAR : **0.17 mg, 28.4 nmol**

SED-1 primeri, liyofilize halde bulunmaktadır ve 284 µL ultra saf su ile karıştırılarak 100 pmol/µL'lik çözelti haline getirilir. Ancak çalışma esnasında kullanılmak üzere, 10 pmol/µL'lik stok çözeltisi hazırlanır. Stok çözelti, -18°C sıcaklıkta muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi 4°C sıcaklıkta tutularak çözündürülmelidir.

Çizelge 19. SED-2 primerinin özellikleri

BİLEŞİM

5'-TAA TGC TAT ATC TTA TAG GG-3'

UZUNLUK : 20 baz

MOLEKÜL AĞIRLIĞI : 6146.1 g/mol

T_m : 42.7°C

GC İÇERİĞİ : % 30.0

MİKTAR : **0.13 mg, 20.4 nmol**

SED-2 primeri, liyofilize halde bulunmaktadır ve 204 µL ultra saf su ile karıştırılarak 100 pmol/µL'lik çözelti haline getirilir. Ancak çalışma esnasında kullanılmak üzere, 10 pmol/µL'lik stok çözeltisi hazırlanır. Stok çözelti, -18°C sıcaklıkta muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi 4°C sıcaklıkta tutularak çözündürülmelidir.

EK 6 Çalışmada Kullanılan Jel

% 1.5'lik agaroz jeli (w/v)

PZR yönteminin agaroz jel elektroforezi basamağında kullanılmıştır.

Çizelge 20. % 1.5'lik agaroz jeli (w/v) bileşimi

<i>BİLEŞEN</i>	<i>DERİŞİM (g/100mL)</i>
Agaroz	1.5

Bileşen belirtilen miktarda tartılarak, 100 mL TBE tamponu (1X) içerisinde kaynar su banyosunda çözündürülür. Bu agaroz çözeltisi, 60°C sıcaklığa soğutularak, 1 mg/mL etidyum bromür çözeltisinden* 3 µL eklenir ve karıştırılarak, uygun ebatlardaki jel tablasına dökülür. Hemen ardından tabla üzerindeki ilgili yere, uygun ebatlardaki jel tırağı yerleştirilerek, katılaşması için belli bir süre beklenir ve katılaşma süreci sonunda tarak, tabla üzerindeki jelin hasar görmemesine dikkat edilerek, yavaşca yerinden çıkartılır. Oluşturulan agaroz jel, vakit kaybetmeksizin, elektroforez işleminde kullanılır (Taban 2007).

* Etidyum bromür çözeltisi son derece mutajenik ve toksik bir çözelti olduğundan, kullanımı esnasında mutlaka eldiven giyilmelidir.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sahar KARIMIHACHEHSOO

Doğum Yeri : IRAN

Doğum Tarihi : 26.09.1983

Yabancı Dili : İngilizce, Farsca, Azerice

Eğitim Durumu

Lise : Narges (2002)

Lisans : Urmia Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü (2006)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Süt Teknolojisi Anabilim Dalı (Eylül 2012-Ocak 2016)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Seller Ltd. Şti. Şeker Fabrikası (21.07.2008-21.10.2009)

Ulusal Kongre Sunum

Karimihachehsoo, S. ve Taban, B. 2015. Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel potansiyeli. 5. Gıda Güvenliği Kongresi Bildiri Özeti Kitabı, 7-8 Mayıs, 87, İstanbul.

Uluslararası Kongre Sunum

Karimihachehsoo, S. and Mercanoglu-Taban, B. Effect of mastitis on raw milk composition and dairy products quality. 2nd International Congress on Food Technology Abstract Book, 5-7 Kasım 2014, 95, Kuşadası, Türkiye.