



T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KAHRAMANMARAŞ İLİ MERKEZ VE ÇEVRESİNDEKİ
ÇEŞİTLİ FİRMA VE MANDIRALARDAN TEMİN EDİLEN
ÇİĞ KEÇİ SÜTLERİNDEN *STAPHYLOCOCCUS* TÜRLERİNİN
İZOLASYONU VE VİRLANS FAKTÖRLERİNİN
MOLEKÜLER YÖNTEM İLE ARAŞTIRILMASI

mmĞlsm KÜÇÜKÖNDER UNCU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

KAHRAMANMARAŞ 2024

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**KAHRAMANMARAŞ İLİ MERKEZ VE ÇEVRESİNDEKİ ÇEŞİTLİ
FİRMA VE MANDIRALARDAN TEMİN EDİLEN ÇİĞ KEÇİ
SÜTLERİNDEN STAPHYLOCOCCUS TÜRLERİNİN İZOLASYONU
VE VİRÜLANS FAKTÖRLERİNİN MOLEKÜLER YÖNTEM İLE
ARAŞTIRILMASI**

Ümmügülsüm KÜÇÜKÖNDER UNCU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Kezban Tülay YALÇINKAYA

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Özlem KİRİŞÇİ

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Mustafa Altay ATALAY

KAHRAMANMARAŞ-2024

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, alıntı yapılan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Ümmügülsüm KÜÇÜKÖNDER UNCU



Bu çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince desteklenmiştir.

Proje No: 2022/3-7 YLS

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tezimin hazırlanması sürecinde büyük katkıları olan, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, çok değerli tez danışmanım saygıdeğer hocam Sayın Prof. Dr. Kezban Tülay YALÇINKAYA'ya ilgi ve yardımlarından dolayı sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim sürecinde deneyimlerini ve bilgi birikimleri ile her türlü yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım, Sayın Prof. Dr. Murat ARAL, Prof. Dr. Ekrem KİREÇCİ ve Doç. Dr. Filiz ORAK'a teşekkür ederim.

Tez savunmama katılarak tezin son şeklini almasını sağlayan değerli hocalarım Prof. Dr. Mustafa Altay ATALAY ve Doç. Dr. Özlem KİRİŞÇİ'ye teşekkür ederim.

Tez çalışmam için gerekli olan pozitif kontrol suşlarının teminini sağlayan Prof. Dr. Ömer AKINEDEN'e teşekkür ederim.

Tezimin istatistiksel aşamasında tezime sağladığı katkı ve emeğinden dolayı Sayın Doç. Dr. Öğr. Üyesi Adem DOĞANER'e teşekkür ederim.

Tezimin moleküler çalışma aşamasında yardımda bulunan KSÜ ÜSKİM Merkez Sekans Laboratuvarından Öğr. Gör. İlkay ADANIR'a,

Tez çalışmamı yaparken destek olan yüksek lisans arkadaşım Büşra PEMBE'ye

Destek ve yardımları için Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarının tüm personellerine,

Desteğinden dolayı Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Bugünlere gelmemde büyük payları olan, maddi manevi her anlamda ve koşulda yanımda olan, bana en büyük desteği veren en değerli varlığım canım aileme teşekkür ederim.

Bu araştırma, 2022/3-7 YLS kodlu proje olarak Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.

Eylül, 2024

Ümmügülsüm KÜÇÜKÖNDER UNCU

**KAHRAMANMARAŞ İLİ MERKEZ VE ÇEVRESİNDEKİ ÇEŞİTLİ FİRMA VE
MANDIRALARDAN TEMİN EDİLEN ÇİĞ KEÇİ SÜTLERİNDEN
STAPHYLOCOCCUS TÜRLERİNİN İZOLASYONU VE VİRÜLANS
FAKTÖRLERİNİN MOLEKÜLER YÖNTEM İLE ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Ümmügülsüm KÜÇÜKÖNDER UNCU

ÖZET

Kahramanmaraş ili Türkiye'de keçi varlığının en yoğun bulunduğu Akdeniz bölgesinde yer almaktadır. Keçi sütü, sadece Türkiye'de değil dünyada da tanınan ve sevilerek tüketilen Kahramanmaraş dondurmasının imalinde kullanılmakta, dondurmaya beğenilen tat ve aromayı kazandırmaktadır. Son yıllarda dondurma sanayisinin hızla gelişmesi hem yurtiçi hem de yurtdışı pazarlara açılması sebebiyle mevcut keçi sütü üretimi daha da önem kazanmıştır. Dondurma dışında içme sütü, peynir ve yoğurt üretimi de mevcuttur.

Dünya çapında klinik ya da subklinik mastitli sığır-keçilerden elde edilen *Staphylococcus* türleri ile kontamine süttten çiğ olarak üretilen dondurma, içme sütü, peynir ve yoğurt halk sağlığı açısından büyük risk oluşturmaktadır.

Staphylococcus cinsi bakteriler hareketsiz, sporsuz, düzensiz üzüm salkımı şeklinde yerleşim gösteren, yuvarlak, katalaz pozitif, kapsülsüz veya az miktarda kapsül içeren, 0,5-1,5 µm çapında gram pozitif koklardır. *Staphylococcus aureus* bu cinsin asıl önemli olan ve gıda teknolojisinde dikkatleri üzerine çeken türüdür. *S. aureus* suşlarının gıdalarda gelişmeleri sırasında ürettikleri toksinlerin vücuda alınması ile görülen hastalık en yaygın olan gıda zehirlenmelerinden biridir. *S. aureus* hemolizinler, lökosidin, epidermolitik toksin, enterotoksinler ve toksik şok sendrom toksini-1 (TSST-1) gibi çeşitli toksinleri salgılar. *S. aureus* çok çeşitli enterotoksinler üretir. Stafilokokların neden olduğu gıda zehirlenmelerinde en çok SEA (stafilokokal enterotoksin A) rol oynar. Bakterilerin üremesi ve toksin üretmesi için gerekli koşullar gıda maddesinin kimyasal bileşimine, pH değerine, su aktivitesi değerine, redoks potansiyeli değerine ve üretim sırasındaki ısı ve depolama koşullarına bağlıdır.

Ülkemizde keçi sütü ve ürünlerinin üretimi yüksek olan Kahramanmaraş ilinde çoğu küçük işletmelerde ve mandıralarda üretim kontrolsüz bir şekilde gerçekleştirilmektedir.

Yetersiz üretim koşullarından dolayı süt ve süt ürünleri kaynaklı enfeksiyon ve gıda zehirlenmelerinin riski artmakta ve üretimde kayıplar oluşmaktadır. Üretim-satış kayıpları ve medikal masraflar nedeniyle ciddi ekonomik kayıplara neden olmakta, insanların sağlığını ve yaşam kalitesini olumsuz yönde etkilemekte ve kaygılara yol açmaktadır.

Çalışma kapsamında, ülkemizde keçi üretiminin en yoğun olduğu Kahramanmaraş İli Merkez ve çevresindeki çeşitli firma ve mandıralardan temin edilen 135 çiğ keçi sütü örneğinin *Staphylococcus* türleri ile kontaminasyon düzeyi belirlenmiş ve moleküler yöntem ile stafilocokal virülans faktörleri bakılmıştır.

Bu çalışmada 135 süt örneğinin 98'inde (% 72,5) 122 bakteri izolatu elde edilmiştir. Bu 122 izolatu 94'ü (%77) *Staphylococcus* türü olarak belirlenmiştir. Geriye kalan 16 izolat tanımlanamamış ve 37 örnekte ise bakteriyel üreme görülmemiştir. Araştırmamız sonucunda izole edilen stafilocok türleri, genel olarak koagülaz negatif karakterde olup *S. chromogenes* (36), *S. petrasii subsp. petrasii* (14), *S. caprae* (12), *S. borealis* (4), *S. auricularis* (4), *S. croceilyticus* (3), *S. equorum subsp. equorum* (3), *S. petrasii subsp. jettensis* (3), *S. hominis subsp. novobiosepticus* (2), *S. lugdunensis* (2), *S. epidermidis* (1), *S. succinus* (1), *S. warneri* (1), *S. arlettae* (1), *S. simulans* (1), *S. heamolyticus* (1) olarak belirlenmiştir (toplam 89 izolat). Koagülaz pozitif stafilocok türleri olarak *S. argenteus* (4) ve *S. delphini* (1) izole edilmiştir (toplam 5 izolat). Stafilocok türleri dışında *Staphylococcaceae* ailesine ait *Mammaliicoccus sciuri* (6), *Mammaliicoccus vitulinus* (1) ve *Micrococcus luteus* (5) türleri de izole edilmiştir.

135 çiğ keçi sütü örneğinin hiçbirinde stafilocokal virülans geni (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* ve *see*) varlığına rastlanmamıştır. Örneklerin hiçbirinde insanda patojen olarak sık karşılaşılan *S. aureus* gibi stafilocok türlerinin saptanmaması veya düşük oranda saptanması, çalışmada saptanan türlerin keçi sütünün normal florasını yansıttığını düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler : Çiğ keçi sütü, *Staphylococcus*, virülans faktörleri, moleküler metod

Sayfa Sayısı : 85

Danışman : Prof. Dr. Kezban Tülay YALÇINKAYA

**ISOLATION OF *STAPHYLOCOCCUS* SPECIES FROM RAW GOAT MILK
PROCURED FROM VARIOUS FIRMS AND DAIRIES IN AND AROUND
KAHRAMANMARAŞ PROVINCE AND INVESTIGATION OF VIRULENCE
FACTORS BY MOLECULAR METHOD**

Master Thesis

Ümmügülsüm KÜÇÜKÖNDER UNCU

ABSTRACT

Kahramanmaraş province is in the Mediterranean region, where goats are the most concentrated in Turkey. Goat milk is used in the production of Kahramanmaraş ice cream, which is well-known and loved in Turkey and the world, which adds the popular taste and aroma to the ice cream. Due to the rapid development of the ice cream industry in recent years in domestic and foreign markets, local goat milk production has gained even more importance. Besides ice cream, drinking milk, cheese, and yogurt production are also available.

Worldwide, ice cream, drinking milk, cheese, and yogurt produced from raw milk contaminated with *Staphylococcus* species obtained from cattle goats with clinical or subclinical mastitis pose a severe risk to public health.

Staphylococcus bacteria are gram-positive cocci of 0.5-1.5 µm in diameter, non-motile, sporeless, irregularly located like grape clusters, round, catalase-positive, unencapsulated, or containing a small amount of capsule. *Staphylococcus aureus* is the most important species of this genus and draws the attention of the food industry. The disease caused by the ingestion of toxins produced by *S. aureus* strains during their growth in food is one of the most common food poisonings. *S. aureus* secretes toxins such as hemolysins, leukocidin, epidermolytic toxin, enterotoxins, and toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1). *S. aureus* produces a wide variety of enterotoxins. SEA (staphylococcal enterotoxin A) plays a significant role in food poisoning caused by staphylococci. The conditions required for bacteria to grow and produce toxins depend on the chemical composition of the foodstuff, its pH value, water activity value, redox potential value, temperature, and storage conditions during production.

In Kahramanmaraş, where the production of goat milk and its products is high in our country, production is uncontrolled in most small businesses and dairy farms. Due to unsuitable production conditions, the risk of infection and food poisoning originating from milk and dairy products increases, and losses occur in production. It causes severe economic losses due to production-sales losses and medical expenses, negatively affecting people's health and quality of life, and causes concerns.

Within the scope of the study, the contamination level with *Staphylococcus* species of 135 raw goat milk samples obtained from various companies and dairy farms in Kahramanmaraş Province, where goat production is most intense in our country, was tested, and staphylococcal virulence factors were investigated by molecular method.

In this study, 122 bacterial isolates were obtained from 98 (72.5 %) of 135 milk samples. Of these 122 isolates, 94 (77 %) were identified as *Staphylococcus* species. The remaining 16 isolates could not be identified and no bacterial growth was observed in 37 samples. *Staphylococcus* species isolated as a result of our research were generally coagulase negative and included *S. chromogenes* (36), *S. petrasii* subsp. *petrasii* (14), *S. caprae* (12), *S. borealis* (4), *S. auricularis* (4), *S. croceilyticus* (3), *S. equorum* subsp. *equorum* (3), *S. petrasii* subsp. *jettensis* (3), *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* (2), *S. lugdunensis* (2), *S. epidermidis* (1), *S. succinus* (1), *S. warneri* (1), *S. arlettae* (1), *S. simulans* (1), *S. heamolyticus* (1) (total 89 isolates). *S. argenteus* (4) and *S. delphini* (1) were isolated as coagulase positive staphylococci species (total 5 isolates). Except staphylococcal species, *Mammaliicoccus sciuri* (6), *Mammaliicoccus vitulinus* (1) and *Micrococcus luteus* (5) species belonging to the *Staphylococcaceae* family were also isolated.

None of the 135 raw goat milk samples were found to contain staphylococcal virulence genes (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* and *see*). The fact that staphylococci species such as *S. aureus*, which are frequently encountered as pathogens in humans, were not detected in any of the samples or were detected at low rates suggests that the species detected in the study reflect the normal flora of goat milk.

Keywords : Raw goat milk, *Staphylococcus*, virulence factors, molecular method

Number of Pages : 85

Consultant : Prof. Dr. Kezban Tülay YALÇINKAYA

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
ÖZET	II
ABSTRACT	IV
İÇİNDEKİLER.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR	VIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Süt.....	3
2.1.1. Sütün tanımı	3
2.1.2. Sütün bileşimi ve özellikleri	3
2.2. Stafilocoklar	10
2.2.1. Tarihçesi	10
2.2.2. Sınıflandırma	11
2.2.3. Morfolojik ve kimyasal özellikler	12
2.2.4. Hücre yapıları ve virulans faktörleri.....	13
2.2.4.1. Hücre duvarı	14
2.2.4.2. Kapsül ve slime tabakası	15
2.2.4.3. Yüzey proteinleri.....	16
2.2.4.4. Enzimler	17
2.2.4.4.1. Koagülaz.....	17
2.2.4.4.2. Katalaz.....	17
2.2.4.4.3. Lipaz.....	18
2.2.4.4.4. Hyalüronidaz	18
2.2.4.4.5. Beta-laktamazlar (Penisilnaz).....	18
2.2.4.4.6. Nükleaz.....	19
2.2.4.4.7. Stafilokinaz (Fibrinolizin)	20
2.2.4.5. Toksinler.....	20
2.2.4.5.1. Sitolitik toksinler (membran yıkıcı toksinler)	20
2.2.4.5.2. Eksfoliyatif toksin (Epidermolitik toksin).....	23
2.2.4.5.3. Toksik şok sendromu toksini (TSST-1)	24
2.2.4.5.4. Enterotoksinler	25
2.2.5. Stafilokokal enterotoksinlerin süt ve süt ürünlerindeki varlığı	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. Hayvanlar	30
3.2. Gereç	30

3.2.1. Kullanılan cihaz ve sarf malzemeler	30
3.2.2. Kullanılan besiyerleri	31
3.2.2.1. %5 Koyun kanlı agar	31
3.2.2.2. Baird-Parker agar	32
3.2.3. Kullanılan Çözeltiler	32
3.2.3.1. Fizyolojik tuzlu su	32
3.2.3.2. Single cell lysing buffer (SCLB) solüsyonu.....	33
3.3. Yöntem	33
3.3.1. Süt örneklerinde <i>Staphylococcus</i> izolasyonu	33
3.3.2. İzolatların tanımlanması	34
3.3.2.1. Gram boyama	34
3.3.2.2. Katalaz testi	35
3.3.2.3. Koagülaz testi	36
3.3.3. DNA ekstraksiyonu	37
3.3.4. 16S rDNA PCR ile tür tanımı.....	37
3.3.5. PCR ürünlerinin sekans analizi	40
3.3.6. Multipleks PCR ile virülans genlerinin saptanması	42
3.3.7. İstatistiksel analiz	44
4. BULGULAR	45
4.1. Biyokimyasal Test ve 16S rDNA Dizi Analizi Bulguları	45
4.2. Baird-Parker Agar'da Üreme	48
4.3. Multipleks PCR ile stafilokokal virülans genlerinin saptanması.....	49
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	55
7. KAYNAKLAR.....	56
8. ŞEKİLLER DİZİNİ.....	67
9. TABLOLAR DİZİNİ	68
10. EKLER DİZİNİ.....	69
11. EKLER	70
12. ÖZGEÇMİŞ	71

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACE	: Anjiyotensin-dönüştürücü enzim
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
bp	: Baz çifti
BSA	: Serum albümin
C	: Sitozin
Ca	: Kalsiyum
CAT	: Katalaz
Cl	: Klor
Clf	: Kümeleştirici faktör
Cu	: Bakır
Da	: Dalton
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksiribonükleotidtrifosfat
D-FucNAc	: N-asetil D-fukozamin
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
esp	: Ekstraselüler Yüzey Proteinini
ETA	: Eksfoliyatif toksin A
ETB	: Eksfoliyatif toksin B
ETC	: Eksfoliyatif toksin C
ETD	: Eksfoliyatif toksin D
Fe	: Demir
Fnbp	: Fibronektin bağlayan protein
FTS	: Fizyolojik Tuzlu Su
G	: Guanin
GMP	: Glikomakropeptid
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
hla	: Alfa hemolizini kodlayan gen
hlb	: Beta hemolizini kodlayan gen
hld	: Delta hemolizini kodlayan gen
hlg	: Gama hemolizini kodlayan gen
I	: Litre

I	: İyot
Ig	: İmmunoglobulin
K	: Potasyum
KLA	: Konjuge linoleik asit
KNS	: Koagülaz negatif stafilokok
KPS	: Koagülaz pozitif stafilokok
LF	: Laktoferrin
LP	: Laktoperoksidaz
L-FucNAc	: N-asetil L-fukozamin
mA	: Miliamper
ManNAc	: N-asetil mannosaminüronik asit
Mg	: Magnezyum
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
Mn	: Manganez
MRSA	: Metisiline dirençli <i>S. aureus</i>
MSCRAMM	: Mikrobiyal Yüzey Komponenti Tanıyan Yapıştırıcı Matriks Molekülleri
MSSA	: Metisiline duyarlı <i>S. aureus</i>
Na	: Sodyum
NaCl	: Sodyum Klorür
NAG	: N-asetil glukozamin
NAMA	: N-asetil muramik asit
P	: Fosfor
PBP	: Penisilin bağlayan protein
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PMNL	: Polimorfonükleer lökosit
PVL	: Panton Valentin lökosidin
RNA	: Ribonükleik Asit
rR/DNA	: Ribozomal RNA/DNA
S	: Kükürt
S.	: <i>Staphylococcus</i>
Se	: Selenyum
SE	: Stafilokokal enterotoksin
SCLB	: Single Cell Lysing Buffer

SGZ	: Stafilokokal gıda zehirlenmesi
SHDS	: Stafilokoksik haşlanmış deri sendromu
SOD	: Süperoksit dismutaz
SpA	: Protein A
TAE	: Tris-Asetat-EDTA
TCR	: T hücre reseptörü
TNase	: Termonükleaz
TSST-1	: Toksik şok sendromu toksini-1
TŞS	: Toksik şok sendromu
UV	: Ultraviyole
Zn	: Çinko
αs₁-CN	: α s-1 kazein
αs₂-CN	: α s-2 kazein
α-LA	: α -Laktoalbumin
β-CN	: β -kazein
β-LA	: β -laktoglobulin
κ-CN	: κ -kazein
μl	: Mikrolitre
°C	: Santigrat Derece

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Süt, insan yaşamının her döneminde gerek duyulan mikro ve makro besin öğelerini içeren temel besin maddesi ve koruyucu gıda olarak kabul edilmektedir. Sütün bileşiminde temel karbonhidrat laktozdur. Laktoz, glikoz ve galaktozdan oluşan bir disakkarittir. Süt, emülsiyon şeklinde bulunan yağ globülleri, koloidal ve çözünür yapıda bulunan kazein ve serum proteinler, kalsiyum, fosfor, potasyum, selenyum ve çinko gibi mineraller; A, D, E, K ve B grubu vitaminleri, konjuge linoleik asit ve sfingolipitler gibi birçok potansiyel komponentleri bulundurması açısından çok zengin bir besindir (1). Türk Gıda Kodeksi-Çiğ Sütün Arzına Dair Tebliği'ne göre çiğ süt; çiftlik hayvanlarının (inek, koyun, keçi ve manda) sağılmasıyla elde edilen, 40 °C'nin üzerine ısıtılmış işlem uygulanmamış veya eşdeğer etkiye sahip herhangi işlem görmemiş kolostrum dışındaki meme bezi salgısı olarak tanımlanmaktadır (2). Süt 2 saat içerisinde soğuk zincir altında üretim tesisine ulaştırılmalı ve işletme süt işlenene kadar 6 °C veya altına hızla soğutup muhafazasını sağlamalıdır. Eğer sağımdan itibaren 2 saat içinde işlenecekse soğutma yapılabilir (3).

Son yıllarda keçi sütünün gıda ve kozmetik sektöründe önemi artmıştır. Keçiler, hızlı üreyen hayvanlardır ve erken yaşlarda (10-12 aylık) cinsel olgunluğa ulaşırlar. Keçilerin gebelik süresi kısadır ve 16-17 aylıkken süt vermeye başlar (4). Sığır ve insan sütüyle kıyaslandığında keçi sütü, biyoaktif özellikleri bakımından kendine özgüdür. Bu özellikler keçi sütünün belirgin alkalinite, daha iyi sindirilebilirlik, yüksek tamponlama kapasitesi, farmakolojik etkisi ve besleyici değerlere sahip olması bakımından insan ve sığır sütünden farklıdır (5). İnek sütündeki orta ve kısa zincirli yağ asitleri [kaproik (C6:0), kaprilik (C8:0), kaprik (C10:0) ve laurik (C12:0)] düzeyi keçi sütüne oranla daha az içermektedir. Keçi sütündeki yağ globülleri 2 mikrometre çapa sahip olup insan ve diğer hayvan sütlerinde bulunan yağ globüllerine oranla çok küçüktür. Yağ globüllerinin aglütinin içermemesi ve çapının küçük olması süt içerisinde yağın daha iyi bir şekilde dağılmasını ve sütün daha homojen yapı kazanmasına katkı sağlar, sindirim ve emilimi kolaylaştırır. Keçi sütündeki ana protein β -kazeindir ve diğer sütlerden daha düşük oranda α_{S1} -kazein içeriğine sahip olduğundan asitle pıhtılaşmada daha kırılabilir yapıda pıhtı oluşturmaktadır. Sindirim sistemi enzimleri daha kırılabilir yapı bu pıhtının üzerinde daha hızlı etki göstereceği için daha kolay sindirilebilir özellikte olduğu sonucuna varılmaktadır (6).

İnek ve koyun sütlerinde olduğu gibi, keçi sütünün bileşimi mevsimsel değişimler, çevresel faktörler, hayvanın ırkı, laktasyon periyodu ve hayvanın sağlık durumu gibi parametrelere bağlı olarak değişmektedir (7).

Süt ve süt ürünlerinin tüketimi besleyici ve sağlıklı olmasına rağmen çiğ süt ve pastörize edilmemiş süt ile yapılan ürünlerin tüketimi ciddi halk sağlığı sorunlarına neden olabilmektedir (8). Sütteki nötral pH, yüksek su ve besin maddelerince zengin yapısı insan sağlığını tehdit eden çeşitli mikroorganizmaların gelişmesi için uygun bir ortam sağlar. Sütteki mikrobiyal gelişme; süt toplama koşulları, taşıma teknikleri, sağım ortamının ve yapan kişinin hijyeni, depolama sıcaklığı, mikroorganizmaların cinsi ve bunların metabolik ürünlerinin miktarına bağlı olarak değişmektedir. Mikrobiyal gelişmeyi önleyici ve koruyucu yöntemler uygulanmadığı durumlarda bulaşan mikroorganizmalar sütte hızla gelişerek bozulmaya neden olmaktadır. (9)

Stafilokoklar, insanlarda ve hayvanlarda gıda intoksikasyonlarına ve enfeksiyonlara neden olduğu için halk sağlığı açısından önemli mikroorganizmalardandır. *Staphylococcus aureus*, sütü kontamine eden en önemli patojen mikroorganizmalardan biridir. Stafilokokal intoksikasyonların en önde gelen sebebi *S. aureus* olmakla birlikte bazı enterotoksijenik koagülaz negatif stafilokoklar (KNS) ve koagülaz pozitif stafilokoklar (KPS) tarafından da oluşturulmaktadır. Bu mikroorganizmalar çevreden bula abileceği gibi mastitis (meme iltihabı) olan hayvandan sağılmış sütten de bula abilmektedir (8,10)

Bu tez çalışmasında, çiğ keçi sütü örneklerinde stafilokok türlerinin izolasyonu sağlanmış ve elde edilen stafilokok izolatlarında vir lans faktörlerinin varlığı moleküler yöntemlerle araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Süt

2.1.1. Sütün tanımı

Sütün tanımı Türk Gıda Kodeksi ve Türk Standartları Enstitüsü (TSE) tarafından yapılmıştır. Türk Gıda Kodeksine göre çiğ süt; bir veya daha fazla inek, keçi, koyun veya mandanın sağılmasıyla elde edilen, 40 °C'nin üzerinde ısıtılmamış veya eşdeğer etkiye sahip herhangi işlem görmemiş kolostrum dışındaki meme bezi salgısıdır. TSE'ye göre: Süt; inek, koyun, keçi ve mandaların meme bezlerinden salgılanan, kendine özgü tat ve kıvamda olan, içine başka maddeler karıştırılmamış, içinde herhangi bir maddesi alınmamış, beyaz veya krem renkli sıvıdır (11).

2.1.2. Sütün bileşimi ve özellikleri

Süt ve süt ürünleri, yenidoğan ve yetişkin bireylerin beslenmesinde önemli olan biyoaktif maddeler ve immün sistemi destekleyici bileşikler içeren temel besin kaynaklarından. Süt opak, mat beyaz veya süt yağındaki beta karoten miktarına göre sarımtırak bir sıvıdır (12). Doğumdan sonra salgılanan süte ağız (kolostrum) denir. Kolostrum, normal süte göre daha koyu ve daha sarı renktedir. İçerdiği besin öğeleri konsantrasyonu daha yüksektir. Doğumdan 4-5 gün sonra normal süt kıvamını alır. Sütün besin ögesi içeriği genel olarak % 87,3'ü su, % 3,5'i yağ, % 3,4'ü protein, % 0,7'si mineral ve % 5'i karbonhidrattır. Sütte suyun dışındaki toplam bileşenler kuru madde olarak isimlendirilir. Bileşim öğelerinin miktarı hayvanın cinsine, yaşına, sağlık durumuna (özellikle mastit gibi meme hastalıkları), laktasyon dönemine, mevsimsel değişim, bakım ve beslenme koşullarına göre değişiklik göstermektedir (13).

Laktoz sütün temel karbonhidratıdır, glikoz ve galaktozdan oluşan bir disakkarittir (6). Sadece sütte bulunur. Sütte yağ dışında kalan kuru maddenin % 54'ünü laktoz oluşturmaktadır. Laktozun sindirimi, laktaz enzimi tarafından glikoz ve galaktoza hidrolize olmasıyla gerçekleşmektedir. Laktaz, ince bağırsakta bulunan epitelyum hücreleri tarafından salgılanır. Glikoz vücut içerisinde daha çok enerji kaynağı olarak, galaktoz ise özellikle bebeklerde nörolojik gelişim, bağışıklık sisteminde, hücreler arası iletişimde ve epitelyum stabilizasyonu gibi birçok farklı amaç için kullanılabilir (14). Laktoz; magnezyum

(Mg), manganez (Mn), fosfor (P) ve kalsiyum (Cl) gibi önemli minerallerin emilimini (daha uzun süreli ve yüksek) düzenler (15). Ayrıca D vitamini emilimini ve kullanımını desteklemektedir (16). Bağırsaklarda asidik (laktik asit tarafından) bir ortam sağlayarak mevcut floranın dengede tutulmasını, patojen inhibisyonunu ve yararlı mikroorganizmaların sayısının artmasını sağlamaktadır (12). Keçi sütünde % 4,2 ve koyun sütünde ortalama % 4,9 oranında bulunmaktadır. İnek sütünün laktoz içeriği keçi sütüne oranla % 0,2-0,5 daha fazladır. Keçi sütü ve koyun sütü laktoz oranları neredeyse aynı düzeyde seyretmektedir. Koyun ve keçi sütü az miktarda glikopeptidler, glikoproteinler, oligosakkaritler ve nükleotid şekeri içermektedir (7,17). Süt oligosakkaritleri yenidoğan bebeklerin beyin ve gastrointestinal sistem (GİS) florasının gelişimini destekleyen önemli bir komponenttir. Ayrıca antijenik özelliktedir (18). Oligosakkarit içeriği en yüksek anne sütünde (0,6-1,1 g/100 ml) bulunmaktadır. Keçi sütünün (26-31 mg/100 ml) sahip olduğu oligosakkarit içeriği, inek sütüyle kıyaslandığında yüksek oligosakkarit düzeyine sahiptir (6). Keçi sütü oligosakkarit çeşitliliği yönünden de koyun ve inek sütüne göre daha zengindir ve bu çeşitliliğin önemli olduğu bildirilmiştir (7). Yapılan bazı çalışmalarda, keçi sütünde var olan oligosakkaritlerin bağırsak yangısını yatıştırıcı özellikte olduğu belirlenmiştir. Keçi sütünün sahip olduğu yüksek oligosakkarit düzeyleri nedeniyle ileride biyofonksiyonel bir gıda olarak önem kazanacağı düşünülmektedir (6). Nükleotid şekerleri ise, süt ve meme salgı bezlerindeki glikozil transferaz için glikozil donörüdür ve glikoproteinler, glikolipitler ve oligosakkaritlerin sütteki biyosentezinde öncü göreve sahiptir. Keçi sütü yüksek nükleotid şeker içeriğine sahiptir (154 μ mol/100 ml). Keçi sütünü, koyun sütü (93 μ mol/100 ml) ve inek sütünün (68 μ mol/100 ml) izlediği bildirilmektedir (16).

Sütün diğer önemli bileşeni olan süt yağı, sütün fiziksel nitelikleri, tat, lezzet ve besin değerleri açısından önemlidir. Rengi beyazdan sarı renge kadar değişebilir. Süt yağı, vücudun gereksinim duyduğu bazı yağ asitlerini ve yağda eriyen vitaminleri (ADEK) içeren temel bir maddedir. Sindirilme yeteneği yüksektir (% 98-99). Sağlamış olduğu yüksek enerji değeri ile enerji temininde ön planda yer alır (12). Süt lipidlerinin büyük bir kısmını % 97-98 oranında trigliseritler oluşturmaktadır. Gliserol ve yağ asitlerinden oluşan trigliseritlerin sentezi, süt alveol hücrelerine ait endoplazmik retikulumların dış yüzeyinde gerçekleşmektedir (19). Trigliseritlerin yanı sıra % 0,3-1,6 oranında digliseritler, % 0,002-0,1 oranında monogliseritler bulunur. Serbest yağ asitlerinin oranı % 0,1-0,4'tür. Fosfolipitler ve steroller % 0,2-0,4 kadar bulunur. Serebrozitler (% 0,1-0,4) ve diğer lipidler içinde mumlar, skualenler, sterol esterleri ve hidrokarbonlar yer almaktadır (12). Sütlerde bulunan beş yağ asidi [kaprik (C10:0), miristik (C14:0), palmitik (C16:0), stearik (C18:0) ve oleik asit (C18:1)] toplam yağ

asitlerinin % 75'inden fazlasını oluşturmaktadır. İnek sütünde bulunan kısa ve orta zincirli yağ asitlerinin düzeyleri [kaproik (C6:0), kaprilik (C8:0), kaprik (C10:0) ve laurik (C12:0)] keçi ve koyun sütlerine kıyasla daha azdır. Keçi sütüne oranla inek sütünde bütirik (C4:0), miristik (C14:0), palmitik (C16:0) ve linoleik (C18:2) asit miktarının daha düşük olduğu ancak stearik (C18:0) ve oleik asit (C18:1) miktarının daha yüksek olduğu bildirilmektedir (7). Bu yağ asitlerinin çok sayıda biyoaktif özelliği bulunmaktadır. Kısa zincirli yağ asiti olan bütirik asit, hücre büyümesi ve farklılaşması üzerine etkilidir. Keçi sütünde bulunan bir diğer önemli biyoaktif bileşenlerden biri olan Konjuge linoleik asit (KLA), keçi sütünde % 0,65, inek sütünde % 1,01 ve koyun sütünde % 1,08 oranında bulunduğu bildirilmiştir. Yapılan deneysel çalışmalarda KLA, diabetes ve karsinogenezisi geriletme, arterioskleroz oluşumunu engelleme ve immün sistemi güçlendirme etkisi olduğuna dair bulgular elde edilmiştir (6).

Koyun ve keçi sütlerinin 3,5 µm'den daha küçük yağ globüllerine sahip olması önemli bir karakteristik özellikleridir (inek sütü yağ globülleri 4,5 µm'dir) (5). Keçi, koyun, inek ve manda yağ globül zarlarının kalınlığı sırasıyla 3,49; 3,30; 4,55 ve 5,92 µm'dir. Keçi sütü yağ globüllerinin küçük çapta olması sayesinde daha kolay sindirilebilmekte ve süt içerisinde daha homojen dağılım göstermektedir. Keçi sütünde aglütinin eksikliğinden kaynaklı kaymak/krema bağlama daha az olmaktadır (16).

Yüksek kalite protein içeren koyun sütünün protein içeriği % 5,8'dir. İnek ve keçi sütünün protein içeriği ise sırasıyla % 3,3 ve % 4,6'dır (7). Süt proteinlerini % 80 oranında kazeinler ve % 20 oranında serum proteinleri oluşturmaktadır (20). Sütte bulunan biyoaktif peptidler; opioid, antihipertansif, bağışıklık sistemini düzenleme, antitrombotik, antioksidan, antimikrobiyal etki ve mineral bağlayıcı gibi birçok biyolojik aktivite gösterebilmektedir (21,22). Biyoaktif peptidler içerisinde anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri en fazla araştırma konusu olmuş antihipertansif peptidlerdir (23).

Sütün esas proteini olarak bilinen kazein, süt proteinlerinin yaklaşık % 80'ini oluşturur. Kazein yapısı α s-1 kazein (α s₁-CN), α s-2 kazein (α s₂-CN), β -kazein (β -CN) ve κ -kazein (κ -CN) olmak üzere dört temel bileşene sahiptir (24). Kazeinler sütte miseller şeklinde bulunmakta ve çeşitli inorganik bileşenlerle (Ca, Mg ve Fe gibi makro ve Zn, Ba, Cr, Ni, Co ve Se gibi mikro elementler) kompleks oluşturmaktadır. Bu nedenle kazein bir fosfoprotein (kazeinofosfopeptid) olarak bilinmektedir (20). Keçi sütü proteinleri inek sütü proteinleriyle kıyaslandığında daha kolay sindirilebilir özellikte olmasıyla birlikte amino asit Emilimi daha etkindir (6). α s₁-CN, kazein fraksiyonları içerisinde en önemli alerjendir (25). Keçi sütünün α s₁-CN (alerji predominant faktör) içeriği düşüktür ve β -kazein ana proteindir. Yapılan incelemelerde inek sütünün en büyük komponenti α s₁-CN, keçi sütünün ise β -kazein olduğu

tespit edilmiştir. Keçi sütünün α -kazein komponenti yüksek miktarda aspartat, lizin ve tirozin içermektedir. Lösin, prolin ve valin oranları ise β -kazeinde daha yüksektir. Anne sütüne oranla daha az lösin içeren keçi sütü, diğer türlerden daha fazla glutamat (% 20) ve prolin içermektedir. Koyun ve keçi sütü, yüksek konsantrasyonlarda glisin, glutamik asit, aspartik asit ve alanin içermektedir (16). Süt alerjisi olan kişilerin büyük çoğunluğu kazein fraksiyonlarının tümüne karşı duyarlı olduğu tespit edilmiş ve kazein fraksiyonlarındaki farklılık nedeniyle oluşan IgE cevaplarının büyük oranda farklı olduğu gözlemlenmiştir (26). Kappa kazein (κ -CN), antitrombotik etki gösterir. κ -CN, kimozin ile etkileşime girer ve fibrinojen ile trombin arasındaki benzer etkiyi gösterir (6). κ -CN, kimozin ile etkileşime girer ve fibrinojen ile trombin arasındaki benzer etkiyi gösterir (27). GMP, fenilalanin, triptofan ve tirozin gibi aromatik aminoasitlerden fakirdir. Bu sebeple fenilketonüri hastaları için güvenilir bir protein kaynağıdır. Ayrıca, prebiyotik olarak da rol oynayan GMP'nin, bifidobakterilerin gelişimini desteklediği belirlenmiştir (21). İçerdiği zengin dallanmış zincirli aminoasitler sayesinde çeşitli karaciğer hastalıklarında karbon kaynağı olarak kullanılabileceği belirtilmiştir. Enterotoksinler, glikozidik yapıları sayesinde GMP'lere bağlanarak kompleks oluştururlar ve böylece bağırsaklardan atılarak vücuttan uzaklaştırılır. Kazein kaynaklı kazokininler, anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitör aktivitesi göstermektedir (28). Keçi sütünde κ -CN oranı diğer sültere göre daha yüksektir (29).

Globüler yapıya sahip olan serum proteinleri, süt proteinlerinin % 20'sini oluşturmaktadır. Serum proteinleri α -laktoalbumin (% 20), β -laktoglobulinler (% 50), serum albümini (% 10), immunoglobulinler (% 10) ve proteoz-peptonlar (% 10) ile diğer minör protein fraksiyonlarını (laktoferrin, ferritin, kalmodulin/kalsiyum bağlayıcı protein, prolaktin ve folat bağlayıcı protein) içermektedir (21). İmmünoglobulin ve serum albümin süte özgü olmakla birlikte, kanda bulunanlarla aynı özelliktedirler (16). Keçi sütü kazeine oranla daha yüksek oranda serum proteini içermektedir (7).

α -Laktoalbumin (α -LA), 67'si esansiyel olmak üzere 123 aminoasitten oluşan globüler bir proteindir. Pepsin enzimi ile hidrolize olabilen α -LA, süt bezleri tarafından üretilmekte olup bugüne kadar analiz edilmiş tüm sülterde bulunmaktadır. α -LA, meme glandında laktozun biyosentezini teşvik etmektedir (20,21,25). α -laktoalbumininin ısıl işlemlere karşı en dirençli serum proteindir. Keçi sütünde var olan α -laktoalbumin metiyoninden fakirdir (16). α -LA kaynaklı α -laktorfinin, opioid ve ACE inhibitörü etkisi bulunduğu bildirilmektedir. Ayrıca α -LA, bağışıklık sistemini güçlendirmekte ve bazı kanser türlerinin riskini düşürmektedir (20).

β -laktoglobulin (β -LG), 84'ü esansiyel olmak üzere 162 aminoasitten oluşan globüler bir proteindir (20). En yüksek β -LG derişimi koyun sütünde bulunmaktadır. Keçi sütünün β -LG yüzdesi, koyun ve inek sütüne oranla daha düşüktür (7) . Esansiyel bir aminoasit olan sistein açısından zengindir. Sistein, karaciğer tarafından üretilen intrasellüler antioksidan olan glutatyonun sentezini teşvik etmektedir. Glutatyon, bağışıklık sisteminin önemli bir bileşenidir ve HIV ile enfekte kişilerin bağışıklık sisteminin iyileşmesinde etkin olarak görev aldığı belirlenmiştir. Bağırsak tümörlerine karşı da koruyucu etkiye sahiptir. Ayrıca güçlü bir antioksidan olan glutatyon, serbest radikallerin nötralizasyonunda doğrudan etkili olmasının yanı sıra dışarıdan alınan antioksidanların da (C ve E vitamini gibi) aktif formda kalmalarında etkilidir (21). Glutatyon, keçi sütünde daha fazla oranda bulunmaktadır (29). β -LG, anne sütünde bulunmamaktadır (25). Globüler yapısı sayesinde β -LG, mide pepsin ve proteolitik enzimlerin hidrolizine ve asitliğe karşı dirençlidir (21). Hidroliz sonucu sindirilemeyen β -LG ve yüksek moleküler ağırlıklı peptidler ortaya çıkar. Bunlar, hiç bozulmadan bağırsak mukozasına ulaşarak bağırsak bariyerini aşar ve alerjenik reaksiyonlara sebep olabilir (26). Yapılan çalışmalar sonucunda β -LG ve kazein alerjeniteleri arasında belirgin farklılık tespit edilmemiş olup özellikle yenidoğanlarda inek sütü yerine keçi sütünün kullanılması bazı alerjik reaksiyonların oluşturduğu semptomları geriletmediği düşünülmektedir (7). Hernandez-Ladesma ve arkadaşları β -LG kaynaklı β -laktorfinin ACE inhibitör aktivitesine sahip olduğunu bildirmiştir. Ayrıca β -laktorfin sütte bulunan opioid peptid olarak bilinmektedir (6).

Serum albümin (BSA), memelilerde karaciğer tarafından sentezlenmekte olup globüler yapıda bir proteindir. Kan plazmasındaki konsantrasyonu 35-55 mg/ml aralığında değişmektedir (20). Meme bezlerinde bulunan kan damarları aracılığıyla süte taşınmaktadır. Kanda çözünemeyen serbest yağ asitlerini, metaller gibi küçük moleküllu bileşiklerin bağlanmasını ve taşınmasını sağlamaktadır. Yüksek sistein içeriği sayesinde karaciğerde gerçekleşen glutatyon sentezi için de önemli bir kaynaktır (21).

Serum proteinlerinden proteoz-pepton, ısıya dayanıklı ve asitte çözünebilir protein fraksiyonudur. β -kazeinin proteolizi sonucu oluşmaktadır (25). Proteoz-peptonun plasmin enzimi ile hidrolizi sonucunda PP 8(f1-28) peptid oluşur. PP 8 peptidin opioid agonist aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca bir fosfopeptid olması nedeniyle Ca bağlama yeteneğine sahip olup kemik sağlığında önemli rol oynadığı bildirilmektedir (21).

Yapılan çalışmalarda serum proteinleri egzersiz ile fiziksel performans düzeyinin artırılmasında (vücut ağırlığı kontrolünde), kalp sağlığının korunmasında, enfeksiyonun

önlenmesi/azalmasında, büyüme ve gelişmeye katkısı dışında kalsiyum emiliminde, kan basıncını ve kanser riskini azaltmada önemli rol oynadıkları belirtilmektedir.

Sütte bulunan antimikrobiyal özellikteki maddeler immunoglobulinler, laktoperoksidaz, lizozim ve laktoferrin gibi bileşiklerdir (12). Kazein fraksiyonlarından (α 1, α 2, β ve k-kazein) açığa çıkan bazı antibakteriyel peptidler de tespit edilmiştir (30). Laktoperoksidaz ve lizozim sütte en çok bulunan antimikrobiyal özellikli enzimler, immunoglobulinler ve laktoferrin ise en çok bulunan antimikrobiyal özellikli peptidlerdir (31).

-İmmunoglobulinler (Ig-spesifik inhibisyon): Süt, kan serumundaki immunoglobulinlerle benzerlik gösteren globüler yapıda antikorlardır (12,20). İnek sütünün salgıladığı başlıca antikor IgG'dir. Kan ve emzirme yoluyla bebeğe geçen IgG, pasif bağışıklığın taşıyıcısı olarak rol oynamaktadır. İnek sütünde ortalama olarak 0,6 g/l, toplam proteinlerin % 2'si düzeyinde bulunurken kolostrumda doğumun ilk saatlerinde 80 g/l düzeyinde ve ilk gün 12 g/l gibi oldukça yüksek düzeylerde bulunur. Doğumun ardından her geçen gün hızla azalır (12). Sütte bulunan diğer immunoglobulinler IgA ve IgM olup anne sütünde bunlara ek olarak IgE ve IgD tespit edilmiştir (20). Süt Ig'lerinin temel görevi bağışıklık sistemini destekleyerek enfeksiyonlara karşı direnci arttırmak ve bağırsak sağlığını iyileştirmektir (21).

- Laktoferrin (LF-spesifik olmayan inhibisyon): Fe^{+3} iyonunu transfer etme ve bağlama yeteneğine sahip bir proteindir. Düşük pH'larda bile demiri bağlama yeteneğine sahiptir (31). İnsan kolostrumunda 6-8 mg/ml ve sütünde 20-200 μ g/ml oranında bulunan laktoferrin, inek kolostrumunda 1,5-5,0 mg/l ve sütünde 100 μ g/ml düzeyindedir. Bebeklerde patojenlere karşı birincil savunma mekanizması olarak görev almaktadır (21). LF, tripsin ve benzeri enzimlerle beraber proteolitik parçalanmaya karşı direnç gösterir. Direnç seviyesi, demir doygunluk derecesi ile orantılıdır. LF, mikrobiyal gelişimi ve oksidatif reaksiyonları önleyici aktiviteye sahiptir. Pepsinle veya asidik pH'da ısıtılarak hidrolize edilen LF'den açığa çıkan peptidlerin de antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir. Bakteriyostatik ajan olmasının yanı sıra bakterisidal (bakteri öldürücü) etkisi bulunmaktadır (31). Antioksidan aktiviteye de sahip olan LF, bu aktivitesi sistein açısından zengin bir protein olması ve demir bağlama yeteneğinden kaynaklanmaktadır (21). Bunların dışında antifungal, antiviral ve antikanserojen aktiviteye de sahiptir (32). Yapılan çalışmalarda kemik dokusunu tahrip edip yıkan hücreleri engelleyerek kemik gelişimini desteklediği de ifade edilmektedir (20).

-Laktoperoksidaz (LP-spesifik olmayan inhibisyon): Meme bezlerinden salgılanan ve porfirin içeren peroksidaz ailesinin bir üyesidir (21). Bu enzim insan ve sığır sütünün normal bir bileşenidir ve bugüne kadar test edilmiş tüm memeli sütlerinde bulunmaktadır. Büyükbaş

hayvanların sütünde 10-30 µg/ml düzeyinde bulunmaktadır. LP, H₂O₂ varlığında tiyosiyanatın (SCN⁻) oksidasyonunu katalizleyerek antibakteriyel etkiye sahip oksidatif ürünlerin (hipotiyosiyanat (OSCN⁻) ve yüksek oksis-asitlerin) oluşmasına yol açar. Gram pozitif bakteriler, gram negatif bakterilere göre laktoperoksidaz sistemi tarafından parçalanmaya daha dirençlidir. Bu durum yüksek ihtimalle hücre duvarı ve kalınlık farklarına bağlıdır (31).

-Lizozim: Serum proteinleri içerisinde yer alan lizozim enzimi, bakteri hücre duvarının en önemli yapısı olan peptidoglikan tabakada bulunan N-asetil müramik asit ile N-asetil glikozamin arasındaki β-1,4 glikozidik bağları yıkarak bakterilerin parçalanmasına yol açan antimikrobiyal bir enzimdir (20). Özellikle Gram pozitif bakterilere (*Clostridium botulinum*, *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus lysodeikticus*, *Listeria monocytogenes* gibi) karşı çok etkilidir. Sütteki çözünür lizozim miktarı hayvanın cinsi, meme sağlığı, beslenme, doğum, laktasyon evresi ve mevsim gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir (31). Lizozimin kolostrumdaki miktarı (0,14-0,70 mg/l) normal sütteki miktarına (0,07- 0,60 mg/l) göre daha yoğundur (21). Lizozim termofilik spor oluşturan bakterilere karşı da etkilidir (31).

Süt, birçok mineral, vitamin ve antioksidan özellik gösteren bileşenleri de yapısında bulundurmaktadır. Keçi sütü inek sütüyle kıyaslandığında daha yüksek oranlarda fosfor (P), kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg), potasyum (K), selenyum (Se) ve klor (Cl) içeriğine sahipken, sodyum (Na) ve kükürt (S) içeriği bakımından daha düşük değerlere sahiptir (6). Yüksek fosfor ve klor içeriği ile keçi sütü diğer sütlerden ön plana çıkmaktadır. Keçi sütünün mineral içeriği anne sütünden daha fazladır. Manganez (0,032 mg/100 g), bakır (0,05 mg/100 g), demir (0,07 mg/100 g) ve çinko (0,56 mg/100 g) keçi sütünde bulunan iz minerallerdir. Keçi ve inek sütleri benzer demir (Fe) miktarı içerirken koyun sütünde daha yüksek miktarda bulunmaktadır. Keçi ve inek sütleri, anne sütünden daha fazla miktarda iyot (I) içermektedir (7). Keçi sütü % 27-28 oranında inek ve anne sütüne oranla daha yüksek selenyum içermektedir (33). Demirin biyoyararlanımının inek sütüne oranla keçi sütünde daha yüksek olduğu belirlenmiş ve bunun yüksek nükleotid miktarından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Çinkonun biyoyararlanımının ise anne sütü için daha yüksek olduğu, inek ve keçi sütü için aynı olduğu, koyun sütü için daha düşük olduğu saptanmıştır. Selenyumun biyoyararlanımı keçi ve insan sütü için benzerdir fakat koyun sütü için daha düşük olduğu bildirilmiştir. Bakır, çinko ve selenyumun biyoyararlanımının inek sütüne kıyasla keçi sütünde daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Genel olarak Fe, Zn ve Cu biyoyararlanımları anne sütünde daha yüksektir. Bunun sebebi küçükbaş hayvan sütlerinde kazein ile assosye olmalarıdır (7).

Mineral içeriği hayvanın ırkına, bireysel özelliklerine, meme sağlığına, beslenme durumuna ve laktasyon dönemine göre değişkenlik göstermektedir (16).

Keçi ve koyun sütü, inek sütüyle kıyaslandığında daha yüksek miktarda A vitamini içermektedir. Keçi sütünde var olan β -karotenin tamamı A vitaminine dönüşür. Keçi sütünün içerdiği yüksek A vitamini ve kazein içeriğine bağlı olarak inek sütüne göre daha beyaz görünür (16). Bebekler için keçi sütünde bulunan A vitamini ve niasin (B3) içeriği yeterli düzeyde bulunurken, tiamin (B1), riboflavin (B2) ve pantotenik asit (B5) yüksek düzeyde bulunmaktadır (7). Keçi sütü inek sütüyle kıyaslandığında B1, B12 vitamini ve folik asit düzeyi daha düşük olmakla birlikte daha fazla B6 (% 25) ve A vitamini (% 47) içeriğine sahiptir (33). Keçi ve inek sütlerinin her ikisi de pridoksin (B6), C ve D vitaminleri açısından yetersizdir. Keçi sütünde 5,48 mg/100 ml miktarlarında iken inek sütünde C vitamini 2,22 mg/100 ml'dir (6).

Sütte bulunan antioksidanlar, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak iki gruba ayrılır. Sütün içerdiği enzimatik antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) olmakla birlikte enzimatik olmayan antioksidanlar; kazein, β -laktoglobulin, laktoferrin, C vitamini, E vitamini, A vitamini ve selenyumdur (34). Gama-tokoferol ve beta-karotenoid enzimatik olmayan antioksidanlardandır ve sadece sütün kaymağında bulunmaktadır (35).

2.2. Stafilocoklar

2.2.1. Tarihçesi

Stafilocoklar 1878 yılında Robert Koch tarafından tanımlanan ilk patojen bakterilerdendir (36). 1884 yılında *Micrococcaceae* familyası içerisinde yer alan ayrı bir soy olarak tanımlanmışlar ancak günümüzde *Bacilli* sınıfından *Bacillales* takımında ve *Staphylococcaceae* familyası içerisinde yer almaktadırlar (37,38).

1881 yılında ilk detaylı çalışma İskoçyalı cerrah ve bakteriyolog Sir Alexander Ongston tarafından gerçekleştirilmiş ve bu mikroorganizmalara benzerliğinden dolayı Yunanca'da üzüm salkımı anlamına gelen *Staphylococcus* adı verilmiştir (*staphyle* = üzüm salkımı *coccus* = tane) (39,40). Ongston, stafilocokların fareler ve kobaylar için patojen olduğunu bildirmiş ve o dönemler için insanlarda ağır klinik tabloya sebep olarak ölümcül enfeksiyonlara neden olduğunu belirtmiştir (41). Ayrıca etkenin sepsis ve apse oluşumundaki rolünü de açıklamıştır (42).

Alman Dr. Friedrich Julius Rosenbach ilk kez 1884 yılında bu bakteriyi saf kültürden izole etmiş ve bakterileri kolonilerinin rengine göre ayırmıştır: *S. aureus* (Latince sarı-altın) ve *S. albus* (Latince beyaz). İnsan derisinde yaygın bulunmasından dolayı *S. albus* daha sonra *S. epidermidis* olarak tekrar adlandırılmıştır (43,44).

1903'te Loeb tarafından bazı stafilokok türlerinin plazmayı bir enzim yardımıyla (stafilokoagülaz) *in vitro* pıhtılaştırabildikleri bildirilmiştir (45).

1884 yılında Vaughan ve Sternberg tarafından ilk kez stafilokok içeren gıda kaynaklı hastalık Michigan'da (Amerika Birleşik Devletleri) araştırıldı ve bu çalışmada stafilokok ile kontamine olmuş peynir kullanıldı (46). 1914 yılında Barber, stafilokokların ürettiği bir toksin maddesinin stafilokokal gıda zehirlenmesine neden olduğu keşfeden ilk araştırmacıdır. Daha sonra 1930'da Dack ve arkadaşları bazı *S. aureus* suşlarının gıda zehirlenmesine yol açtığını kesin olarak göstermişlerdir (47,48)

Günümüzde stafilokokların neden olduğu gıda zehirlenmesinin stafilokokal enterotoksinlere bağlı olduğu bilinmektedir (47).

2.2.2. Sınıflandırma

Önceleri *Staphylococcus* ve *Micrococcus* cinslerinin *Stomatococcus* ve *Planococcus* cinsleri ile birlikte *Micrococcaceae* ailesine ait olduğu düşünülmüştür. Daha sonra moleküler analiz, filogenetik ve kemotaksonomik verilerle stafilokok ve mikrokokların birbiriyle yakın ilişkili olmadığı ortaya çıkarılmıştır. Günümüzde *Staphylococcaceae* familyası içerisinde yer almaktadır (37).

Şu zamana kadar *Staphylococcus* olarak adlandırılan grupta, 30 alt türü içeren toplam 88 türün identifiye edildiği bildirilmiştir (<https://lpsn.dsmz.de/genus/staphylococcus>, erişim tarihi 18 Mart 2024). Stafilokok türleri içerisinde *S. aureus* hariç 11 koagülaz negatif stafilokok (KNS) insanda hastalık yapabilme özelliğine sahiptir. Bunlardan hastalık etkeni olarak en sık rastlanan türler; *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus*'dur (49). Gıda mikrobiyolojisi yönünden en patojen olan tür *Staphylococcus aureus*'dur. *Staphylococcus intermedius* ve *Staphylococcus hyicus* da enterotoksin oluşturma özelliklerinden dolayı gıda kaynaklı intoksikasyonlar açısından önemlidir (37).

2.2.3. Morfolojik ve kimyasal özellikler

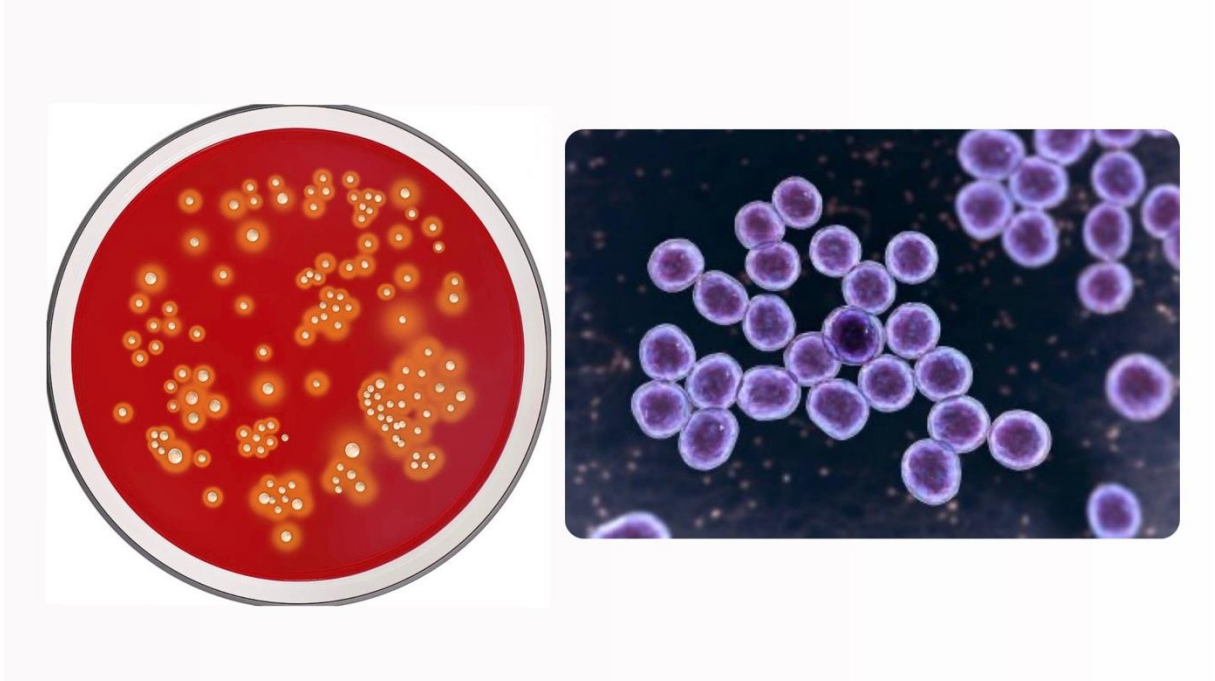
Stafilokoklar genellikle deri, nazofarinks, vajina, rektum, perine ve burnun normal florasında bulunan, spor oluşturmeyen, hareketsiz, kapsülsüz veya az miktarda kapsül içeren, 0,5-1,5 µm çapında, gram pozitif, küresel mikroorganizmalardır (50). Katalaz aktivitesi pozitif ve katalaz testi streptokokları (katalaz negatif) güçlü katalaz üreten stafilokoklardan ayırt etme açısından önemlidir. Kanın içeriğinde katalaz bulunduğu için test kanlı agar üzerinde yapılmamalıdır (51). *S. aureus* subsp. *anaerobius* ve *S. saccharolyticus* (zorunlu anaerob) dışında çoğu tür fakültatif anaeroptur. Bu iki tür anaerobik olarak çoğalır ancak alt kültürlerde daha aerotolerant hale gelir ve fakültatif türlerin aksine genellikle katalaz negatiftir. Metabolik olarak aktiftirler, aerobik ve anaerobik koşullarda karbonhidratları (glikoz, laktoz, maltoz ve mannitol gibi çeşitli şekerler) fermente ederek gaz oluşturmaksızın asit oluştururlar ve besiyerinde beyazdan koyu sarıya kadar değişen çeşitli pigmentler üretirler. En iyi oda sıcaklığında (20-25 °C) pigment oluştururlar (52,53). Stafilokokların 200 µl/mg lizostafine ve 100 µg furazolidona duyarlı oldukları bilinmektedir (54,55). Modifiye oksidaz testi stafilokok türleri için negatiftir.

S. saprophyticus'u klinik önemi olan diğer stafilokoklardan ayıran özellik, 5 µg novobiosin diskinde dirençli olmasıdır. Stafilokoklar 0,04 ünite basitrasin içeren disk deneyinde dirençlidir. Kan ilaveli veya ilavesiz, stafilokokların çoğu % 7,5-10 NaCl içeren basit (klasik) besiyerinde 10-45 °C (toksin oluşturabilmek için minimum ve maksimum sıcaklıkları) ortam sıcaklığında üreyebilmelerine rağmen, 37 °C'de ve pH 7-7,5'te optimum üreme gösterir. Ancak kanlı besiyerinde daha iyi çoğalır (56,57). Katı besiyerinde 24-36 saatlik inkübasyon sonunda yuvarlak, pürüzsüz, 1-4 mm çapında, konveks (kabarık) ve parlak koloniler oluştururlar (53). Stafilokoklar kapsüllü oldukları zaman mukoid koloni oluşturabilmektedir (54).

Mannitol tuzlu agar, lipaz tuzlu mannitol agar, Columbia CNA (kolistin-nalidiksik asit) agar ve Baird-Parker agar yaygın olarak kullanılan seçici besiyerleridir. Bu besiyerleri gram negatif bakterilerin çoğalmasını engeller ancak stafilokokların ve bazı gram pozitif bakterilerin çoğalmasına izin verir. Stafilokoklar MacConkey agarda da üreme yeteneğine sahiptirler. Stafilokoklar çeşitli seçici ve seçici olmayan besiyerleri üzerinde farklı koloniler üretir fakat *S. aureus* ve diğer stafilokoklar arasındaki kesin ayırım için daha fazla test gerekmektedir (58,59).

Patojenik stafilokoklar genellikle kanı hemolize eder, kan plazmasını koagüle eder ve çeşitli hücre dışı enzimler ve toksinler üretir. Mikroskop görünimleri tek, çift, dördü veya kısa zincirler şeklinde bölünebilmeleri ve bölünme sonrasında tam ayrılmanın olmaması

nedeniyle üzüm salkımı şeklindedir (Şekil 1). Patojen stafilokoklar -20 °C’de 3-6 ay, +4 °C’de ise 2-3 ay canlı kalabilir (54).



Şekil 1. Koyun Kanlı Agar besiyerinde ve mikroskop altında *Staphylococcus* bakterileri (53)

2.2.4. Hücre yapıları ve virulans faktörleri

Stafilokokların genom yapısı incelendiğinde tek parça halinde yaklaşık olarak 2.000-3.000 kbp uzunluğunda dairesel bir kromozom ile ek olarak transpozonlar, plazmidler, profajlardan oluşmaktadır. Stafilocoklar mikroskopik incelemede kümeler halinde gözlenen, hareketsiz, gram pozitif, 0,5-1,5 µm çapında koklardır. Stafilokokal hücre duvarı tipik olarak peptidoglikan ve teikoik asit içerir. Stafilokokal DNA’da düşük oranda guanin ve sitozin (G+C) bulunur. G+C içeriği % 30-39 moldür (56).

S. aureus insan ve hayvanların normal floralarında genellikle asemptomatik olarak bulunan fırsatçı bir patojendir ve virülansı en yüksek olan stafilocok türüdür. Hücre duvarının yapısı, yüzey proteinleri, enzimler ve toksinler stafilocokların patojenitesinde etkili olan virülans faktörleridir. Konak organizmaya girdikleri bölgelerde çok sayıda virülans faktörü ile doku içine ya da kana geçerek klinik tablolar ile seyreden enfeksiyonlara neden olabilir. Enfeksiyonun oluşması ya da oluşmaması durumu konak savunma sistemi ve mikroorganizma virülansının oluşturacağı dengeye göre değişkenlik gösterir (54).

Bakterinin direnç ve virülansından sorumlu genler *S. aureus* kökenlerine, diğer stafilocok türlerine ve farklı cins gram pozitif bakterilere en çok transdüksiyon yolu ile aktarılmaktadır. *S. aureus*, hücre duvarı yüzeyinde bulunan özgül faj reseptörleri ile lizise

duyarlıdır. *S. aureus*'un epidemiyolojisinde önemli olan faj tipleri dört grupta toplanır. Grup 1'de 29, 52, 52A, 79 ve 80 faj tipleri bulunur ve toksik şok sendromu toksini-1 (TŞST-1) salgılar. Grup 2; 3A, 3B, 3C, 55 ve 71 faj tiplerini içerir ve bunlar en sık eksfoliyatin salgılayan ve deri infeksiyonlarına neden olan tiplerdir (53). Grup 3; 6, 7, 42E, 47, 53, 54, 75, 77, 83A, 84, 85 faj tiplerini ve Grup 4 de 42D faj tipini içerir (55).

2.2.4.1. Hücre duvarı

Stafilokokların yaşamsal yapılarından biri olan hücre duvarı yaklaşık olarak 80 nm kalınlığında ve esas olarak mukopeptid veya murein olarak da bilinen peptidoglikan, teikoik asit ve yüzey proteinlerinden oluşur (Şekil 2) (56,60).

Hem gram negatif hem de gram pozitif bakterilerde bulunan peptidoglikan, 20-40 nm kalınlığında ve karmaşık yapıya sahip bir makromoleküldür. Gram pozitif bakterilerin hücre duvarının % 50-60'ını peptidoglikan oluşturur (53,61). Bu yapı mikroorganizmaya şeklini verir ve dayanıklılık kazandırır (62). Peptidoglikan kısa peptidler ile çapraz bağlanmış glikan zincirlerinden oluşan bir polimerdir. Glikan, tekrarlayan N-asetil glukozamin (NAG) ve N-asetil muramik asit (NAMA) alt birimlerin birbirlerine β -1,4 glikozid bağları ile bağlanmasıyla meydana gelir. N-asetil muramik asite bağlı olan pentapeptid rezidüleri, bir zincirde D-alanin ile diğer zincirde L-lizin arasındaki pentaglisin köprüleriyle birbirine çapraz bağlanır (53,63).

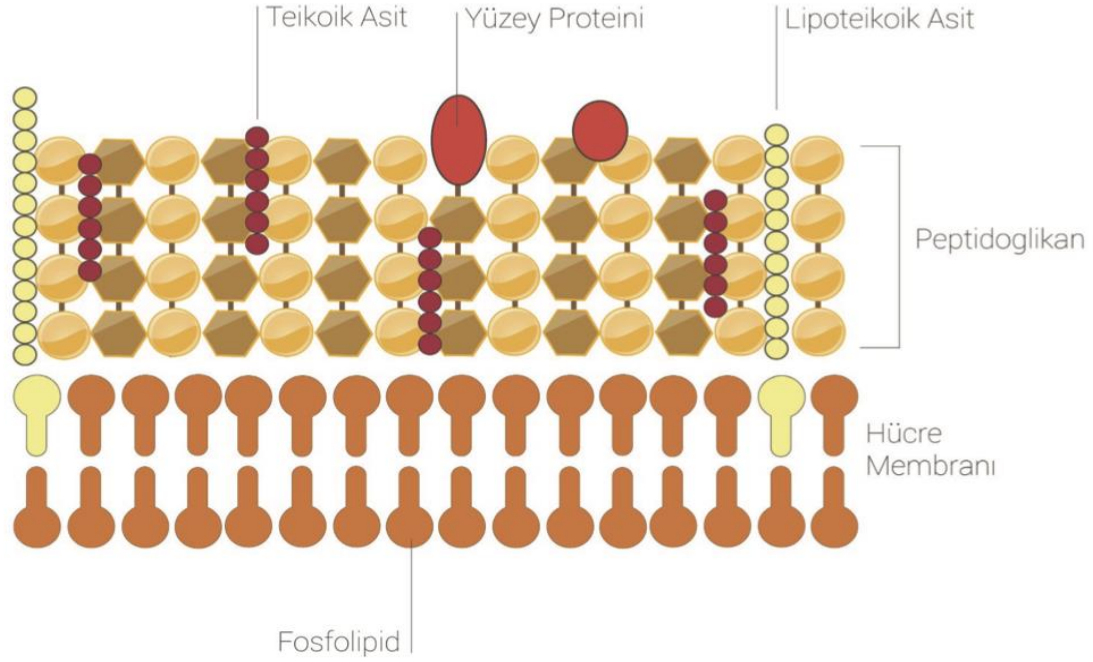
Staphylococcus aureus tüm bakterilerin en kapsamlı çapraz bağlı peptidoglikanını içerir ve bu özellik sayesinde bakteri, lizozim enzimine karşı direnç kazanır (64).

Peptidoglikan endotoksin benzeri etkiye sahiptir, endojen pirojen yapısını uyarmakta, komplemanın aktivasyonuna yol açmaktadır. Monositlerden interlekin-1 salınımını artırarak apse oluşumunu sağlayan polimorfonükleer lökosit agregasyonuna neden olur. Makrofajlardaki *toll-like* reseptörlerle etkileşime girerek fagositik hücrelerden proenflamatuvar sitokinlerin salınımını uyarır (64,54).

Hücre duvarının majör komponentlerinden bir diğeri ise antijenik özelliğe sahip olan teikoik asittir ve sadece gram pozitif bakteri duvarında yer alır. Hücre duvarının % 30-40'ını oluşturan teikoik asit suda eriyebilen şeker-alkol-fosfat polimerlerinden oluşur. Duvar teikoik asit/ribito teikoik asit ve membran teikoik asit/gliserol teikoik asit/lipoteikoik asit olmak üzere iki tiptir. Teikoik asitler, hücrede peptidoglikan tabakanın N-asetilmuramik asit ünitesine, hücre membranındaki lipitlere veya kapsüle bağlı olarak bulunur. Birinci tip peptidoglikan tabakaya kovalent bağlarla tutunmuş olan hücre duvarı teikoik asididir. İkinci tip hücre zarında glikolipitler veya fosfolipitlerle birleşmiş olan membran teikoik asididir. Lipoteikoik

asitlerin biyolojik etkinliği hücre duvarındaki teikoik asitlerden daha çoktur. Teikoik asitler, peptidoglikan sentezini engelleyen otolizinleri bağlar ve bu da bakteriyi otolizinlerin yıkıcı etkisinden korur (60).

Stafilokoklarda çok sayıda hücre duvarı yerleşimleri ve kimyasal yapıları bakımından birbirine benzeyen stafilokoksik yüzey proteinleri tanımlanmıştır. Bunlar; kolajen, protein A, elastin, “clumping” faktör ve fibronektin bağlayan proteinlerdir (53).



Şekil 2. Gram pozitif bakteri hücre duvarı (65)

2.2.4.2. Kapsül ve slime tabakası

Kapsül oluşturma bakteriyi komplemanın etkisinden ve polimorfnükleer lökositlerin fagositozundan koruyan bunun dışında konak hücrelere adherensini sağlayan bir özelliktir (virülans faktörü). Bazı stafilokok suşları ve çoğu *S. aureus*’un özellikle mukoid suşları hücre duvarının en dış tabakasını saran polisakkarit yapıdaki kapsül ile kaplıdır (66). Kapsül materyalinin yapımı hem *in vitro* hem *in vivo* koşullara bağlıdır (53).

Günümüze kadar 13 farklı kapsül serotipi tanımlanmıştır. Stafilokokal enfeksiyonlara en sık neden olan serotip 5 ve 8’dir. Beş ve 8 serotipli kapsüller *N*-asetil mannosaminüronik asit (ManNAc), *N*-asetil L-fukozamin (L-FucNAc) ve *N*-asetil D-fukozaminden (D-FucNAc) oluşan benzer şekilde tekrar eden trisakkarit birimlerine sahiptir. Sadece şekerler ve asetilasyon bölgeleri arasındaki bağlantılarda farklılık gösterir ve bu nedenle serotip 5 ve 8 serolojik olarak farklıdır (66,67,68). Toksik şok sendromu toksini ve metisiline duyarlı *S.*

aureus (MSSA) suşlarının % 60'ı serotip 8 ile ilişkilendirilirken, metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) suşlarının % 64'ünde serotip 5'e ait kapsül polisakkarit yapısı saptanmıştır. Serotip 5 ve 8 aşı araştırma ve geliştirmede kilit öneme sahiptir (66,68).

Biyofilm (*slime*) bazı stafilokoklar tarafından oluşturulur ve ekzopolisakkarit matriks içine gömülü olup amorf kapsül yapılıdır. Yapışkan bir özellikte olmasından dolayı “*slime*” olarak adlandırılmaktadır. *Slime* tabakası; % 90 oranında su, % 2-5 mikroorganizma, % 1-2 protein, % 1-2 polisakkarit, % 1-2 DNA ve iyonlardan oluşmaktadır (69). Biyofilm tabakasının oluşmasında protein, ekzopolisakkaritten oluşan matriks ve tutunma yüzeyi önemli üç etkindir ve birinin eksikliğinde biyofilm oluşmamaktadır. Biyofilm tabakası iki aşamada gerçekleşir. İlk aşamada bakteriler konak hücreye ve katı yüzeylere (kateter, şant, greft, eklem, prostetik kapak vb.) mikrobiyal yapıştırıcı matriks molekülleri olarak tanınan (MSCRAMM-microbial surface components recognizing adhezive matrix molecules) çeşitli yüzey proteinleri ile tutunmayı gerçekleştirmektedir. İkinci aşama ise, bakteriler diğer bakterilere tutunarak çok tabakalı biyofilmi oluşturmaktadır. Konak hücreye tutunma enfeksiyon başlangıcının ilk aşamasıdır (54,70).

Stafilokokların *in vitro* ortamlarda hücre yüzeylerine yapışarak biyofilm oluşturmaları ve ekzopolisakkarit üretimi, opsonofagositoz ve antibakteriyellerden korunarak enfeksiyon oluşturmalarını kolaylaştırır (71). *Slime* pozitif stafilokok suşlarının patojenitesi çok yüksektir ve Amerikan Hastalık Koruma ve Önleme Merkezi (CDC) verilerine göre, insan enfeksiyonlarının % 60'ından sorumludur. Uygulanan antimikrobiyal ajanların etki etmesi için biyofilm tabakasının difüze olması gerekir (72).

2.2.4.3. Yüzey proteinleri

Protein A, “clumping” faktör, kümeleştirici faktör (Clf) A ve B, elastin bağlayan proteinler, kollajen bağlayan proteinler, fibronektin bağlayan proteinler A ve B (FnbpA ve FnbpB) hücre duvarı yerleşimleri ve kimyasal yapıları birbirlerine benzeyen stafilokoksik yüzey proteinleridir ve MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhezive matrix molecules) olarak tanımlanırlar. Stafilokokların konak dokularına kolonize olmasında etkilidir (53).

Bu proteinlerin prototipi protein A (SpA)'dır. Protein A, 42.000 Da moleküler ağırlığında ve en önemli özelliği IgG3 dışındaki bazı immunoglobulinlerin (IgG, IgA2 ve bazı IgM) Fc reseptörleri ile birleşebilmesidir (66). Bu nedenle protein A, immunoglobulinlerin Fc reseptörlerine bağlanarak bakteriyi antikora bağlı fagositozdan (antifagositer) ve hücre dışına salgılanan protein A da Fc reseptörlerine bağlanarak komplemana (antikomplemanter) bağlı

vücut savunmasından korur (57). Protein A, IgG ile bağlanarak antijen-antikor kompleksi yapısında “koaglütinat” oluşturur ve özellik klinik laboratuvarlarda kullanılmaktadır. Protein A, koagülaz negatif stafilokoklar tarafından oluşturulmaz. Protein A, *S. aureus* için spesifik bir tanımlama testi olarak kullanılabilir (73).

2.2.4.4. Enzimler

Stafilokoklar koagülaz, katalaz, lipaz, hiyalüronidaz, penisilinaz (beta-laktamaz), stafilokinaz, fosfataz, proteaz ve nükleaz gibi birçok enzim üretir. Komşu dokulara yayılımını kolaylaştırarak bu enzimler, infeksiyon patogeneğinde rol oynar (53).

2.2.4.4.1. Koagülaz

Koagülaz, ısıya karşı dirençli, filtrelerden geçebilen, antijenik bir enzimdir. Proteolitik enzimlerle kolaylıkla inaktive edilir. Patojen stafilokoklar tarafından sentezi yapılan ve patojeniteyi artıran en önemli proenzimdir.

Stafilokokların bağlı ve serbest olmak iki tip koagülaza sahip oldukları belirlenmiştir. Bağlı koagülaz (“clumping” faktör) adı verilen yapı, hücre duvarına bağlıdır, fibrinojeni fibrine dönüştürür ve stafilokokların birbirine yapışmasını sağlayarak kümelenmesine neden olur. Hücre dışı serbest koagülaz da benzer etki gösterir fakat direk fibrinojene bağlanmaz, globulin plazma faktörü (coagulase reacting factor/CRF) ile etkileşerek trombin benzeri bir madde olan stafilotrombin oluşturur. Bu madde fibrinojenin fibrine dönüşmesini sağlayarak plazmanın pıhtılaşmasına yol açar. Fibrin ile kaplanan mikroorganizma fagositozdan korunabilir ve bu da patojeniteye katkı sağlamış olur (53,57).

Daha sonraları *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. lutrae*, *S. agnetis*, *S. cornubiensis* gibi *S. aureus* dışı türlerin de koagülaz ürettiği keşfedilmiştir. *S. hyicus* ve *S. agnetis* gibi bazı türler koagülaz-değişken özelliktedir (74).

Stafilokoklar dışında *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis* gibi mikroorganizmalar da bu enzimi sentezleyebilmektedir (57).

2.2.4.4.2. Katalaz

Tüm stafilokok türleri katalaz enzimi üretir. Katalaz, tetramerik demir porfirin içeren, hidrojen peroksidi su ve oksijene ayıran, yüksek moleküler ağırlıklı bir enzimdir. Katalaz enzimi 20-50 °C ve pH 4-10 aralığında iyi aktivite göstermektedir. Aerobik ve pek çok fakültatif anaerobik mikroorganizma katalaz enzimine sahiptir (75,76). Katalaz testi,

stafilokoklar ile benzer görünümüne sahip (gram pozitif kok) streptokokların ayırımında kullanılan en önemli yöntemdir (52).

Katalaz enzimi sayesinde bakteriler fagositlerin içinde toksik oksijen radikalleri tarafından öldürülmeye direnç kazanır (53). Bu enzim, hücrelerin reaktif oksijen türlerinden (ROS/ROT) kaynaklanan oksidatif strese korunmasında önemli bir rol oynar.

Bu enzimin, *Mycobacterium tuberculosis*, *Campylobacter jejuni* ve *Helicobacter pylori* gibi bakterilerin hücre içinde hayatta kalması için temel bir faktör olduğu gösterilmiştir (77).

2.2.4.4.3. Lipaz

Lipaz, ekstraselüler bir enzimdir. Bütün *S. aureus* suşları ve koagülaz negatif stafilokokların da yaklaşık 1/3'ü tarafından üretilir. Lipaz enzimi, yağları hidrolize ederek mikroorganizmanın konağın lipid içeren bölgelerinde yaşamasını, deri ve deri altı dokuları invaze ederek fronkül ve karbonkül gibi infeksiyonlarının gelişmesini sağlamaktadır. Özgül antikorları ile nötralize olur (53).

2.2.4.4.4. Hyalüronidaz

Hyalüronidaz enzimi *S. aureus* suşlarının büyük çoğunluğu tarafından üretilir ve bağ dokusunun aselüler matriksindeki asit mukopolisakkaritler olan hylalüronik aside etki ederek hidrolize uğrattır (53,66). Böylece bakterinin doku içerisinde çok geniş bir bölgeye yayılmasını kolaylaştırır. Yayılma özelliği kazandırdığı için, yayılma faktörü olarak da tanımlanan bu enzim antijenik özelliğe sahiptir (57).

2.2.4.4.5. Beta-laktamazlar (Penisilinaz)

Beta laktamazlar, beta laktam antibiyotiklere karşı bakterilerin geliştirdiği en önemli enzim ve patojenite faktörüdür. Penisilinin ilk tedavide kullanıldığı 1940'lı yılların başında stafilokok izolatlarının % 90'dan fazlası bu antibiyotiğe duyarlıydı. Ancak, bu organizmaların penisilinaz (beta-laktamaz) üretebilmeleri ve penisiline direnç geliştirmesi üzerine yaklaşık dört yıl gibi kısa sürede etkinliğini kaybetmiştir. Günümüzde bu duyarlılığın % 5 ve altına indiği bildirilmektedir (78,79).

β -laktamaz enzimi gram pozitif ve gram negatif bakteriler tarafından sentezlenebilir. Beta-laktam antibiyotikler, spesifik olarak karboksipeptidaz ve özellikle transpeptidazları inhibe ederek peptidoglikan sentezini engeller. Bu enzimlere penisilin bağlayan proteinler

(PBP) denir. İnhibasyon beta-laktam antibiyotiklerin bu enzimlere bağlanmasıyla gelişir. PBP'lerin aktif bölgesi üç karakteristik yapısal eleman içerir: SXXK [serin-X (değişken protein)- X-lizin], S(Y)XN [serin-(tirozin)-X-asparajin] ve K(H)T(S)G [lizin-(histidin)-treonin-(serin)-glisin].

Stafilokoklar tarafından salgılanan β -laktamaz enzimi, beta laktam antibiyotiklere bağlanarak onları hidrolize eder ve beta-laktam halkası parçalanır. Bu yolla antibakteriyel etki ortadan kalkarak bakteriyel dirence neden olur. Beta-laktamaz enzimlerinin çoğu indüklenebilir ve ekstrasellüler olarak salınabilir. Stafilokokal beta-laktamazlar genellikle küçük plazmidlerle veya transpozonlarla taşınır fakat büyük plazmidler tarafından kodlanan beta-laktamazlar ve diğer direnç mekanizmaları da bulunmaktadır. Bu beta-laktamaz enzimini kodlayan genler transformasyon, transdüksiyon ve konjugasyon ile diğer mikroorganizmalara aktarılır.

β -laktamaz enzimi genellikle başka antibiyotiklere direnç genlerini de taşıyan plazmid içerisinde bulunan *blaZ* geni tarafından kodlanmaktadır. Penisilinler, sefalosporinler ve monobaktamlara yönelik olarak oluşan bakteriyel direncin en yaygın nedeni β -laktamaz enzimleridir (61).

2.2.4.4.6. Nükleaz

DNase ve RNase olmak üzere ikiye ayrılan nükleazlar, konakçı dokularını ve aynı zamanda bakteri hücresinin DNA ve RNA'larını parçalama yeteneğine sahiptir (57).

Deoksiribonükleaz (DNaz) enzimleri nükleik asitleri 3'- fosfomononükleotidlere parçalayan fosfodiesterazlardır (53). Endo ve ekzonükleaz aktivitesine sahiptir (66). Stafilokokların patojenitesi ile yakından ilişkisi olduğu düşünülmekte ve stafilokokların tanımlanmasında virülans faktörü olarak yararlanılmaktadır (80).

S. aureus'u *S. epidermidis*'ten ayıran en önemli özellik, sıcaklığa dirençli nükleaz enzimine (termonükleaz; TNase) sahip olmasıdır. TNase enzimi, DNA ve RNA'yı parçalama özelliğine sahiptir. Yaklaşık 30 dakika kaynatmaya dirençlidir. *S. aureus* dışında koagülaz pozitif türler olan *S. intermedius*, *S. aureus* subsp. *anaerobius* ve *S. schleiferi* subsp. *coagulaus* ile koagülaz negatif *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. capitis*, *S. sciuri* ve koagülaz değişken *S. hyicus* tarafından da oluşturulmaktadır. Bazı enterokoklar ve aerob spor oluşturan bakterilerde de bulunabilir (37).

Enterotoksin üreten suşların büyük bir çoğunluğunun koagülaz ve termonükleaz oluşturduğu yapılan araştırmalarla ortaya konulmuştur. Yapılan bir çalışmada, incelenen 250 suşun % 93'ünün koagülaz pozitif, % 97'sinin de termonükleaz pozitif olduğu belirlenmiştir. Buna göre birçok suş hem koagülaz hem de termonükleaz enzimi sentezlemektedir (12)

2.2.4.4.7. Stafilokinaz (Fibrinolizin)

Stafilokinaz enzimi plazmada bulunan plazminojene bağlanır ve plazminojenin plazmine dönüşmesi için aktive eder. Fibrinolitik etki bu plazmin sayesinde gerçekleşir. Plazmin, proteolitik bir madde olup fibrini eriterek bakterinin dokular arasında yayılımını sağlar. Stafilokinaz, bazı suşlarda kromozomal genler tarafından kodlanır, bazılarında ise faj genomunun kontrolündedir. Stafilokinaz genellikle koagülaz pozitif olan suşlar tarafından üretilir. Aynı suşların çoğu β -hemolizin de üretir. Koagülaz ve β -hemolizin yönünden negatif olup stafilokinaz üreten bazı suşlar da mevcuttur (51,57).

2.2.4.5. Toksinler

S. aureus, konak hücre morfolojisini ve/veya fonksiyonunu etkileyen çok sayıda ekstraselüler toksin üretebilir. Bunlardan bir kısmı toksik etkilerini enzimatik aktiviteyle gösterirken, diğerleri süperantijen özellikleri nedeniyle sitokin salınımını indükler.

2.2.4.5.1. Sitolitik toksinler (membran yıkıcı toksinler)

Sitolitik toksinler, sitotoksin olarak da adlandırılmaktadır. Stafilokoklar beş farklı sitolitik toksin oluşturmaktadır. Bunlar; hemolizinler (alfa toksin, beta toksin, gama toksin, delta toksin) ve Panton Valentin lökositidin (PVL)'dir (81). Hemoliz yapabilen α , β , δ , γ toksinler eritrositler dışındaki hücreleri de yıkabilmektedir ve etkileri genellikle reseptör aracılıdır. Bu gruba dahil olan Panton Valentin lökositidini ise eritrositleri etkilememektedir. Sitolitik toksinlerin nötrofilleri yıkması sonucu lizozomal enzimler salınır ve sonrasında çevre dokularda hasar meydana gelir.

Alfa-toksin (alfa-hemolizin): Direkt olarak enzimatik hasara yol açan sitotoksinler içerisinde en yoğun şekilde incelenen alfa-toksindir. *S. aureus* suşlarının geneli bu toksini üretir. Bu toksin memeli hücrelerin (eritrosit, lökositler, trombositler, fibroblastlar ve HeLa hücreleri gibi) çoğu için toksiktir fakat eritrositler alfa-toksine en duyarlı hücrelerdir (53). Eritrositleri lize etme kabiliyeti alfa-toksinin belirleyici özelliğidir. Özellikle tavşan eritrositlerine karşı aktif olup tavşanlara 1 μ g alfa-toksin intravenöz verildiğinde letal etki göstermektedir. Aynı zamanda dermonekrotik ve nörotoksin etkiye de sahiptir (82,83).

Alfa-hemolizin *hla* geni tarafından kodlanır ve 33.000 Da moleküler ağırlığa sahiptir. 1984 yılında Gray ve Kehoe tarafından *hla* geni, *S. aureus* kromozomundan klonlanmış ve dizi analizi yapılmıştır. O'Reilly ve arkadaşları bazı suşların *hla* geni içermesine rağmen alfa-toksini üretmediklerini gözlemlemişlerdir.

Alfa-hemolizin monomerleri *S. aureus* tarafından salgılanır ve bu monomerler bir hedef hücrenin membranına entegre olup burada silindirik heptamerler oluştururlar. Bu oligomerik form ökaryotik hücreleri lize etme özelliğine sahiptir. Silindirik heptamer formu hücre membranında oluştuktan sonra 1-2 nm çapında por oluşumuna neden olur. Bu porlar kademeli bir süreçle oluşur. Toksin monomeri başlangıçta hedef hücre membranına bağlanır ve onunla birleşir. Bu bağlanma iki farklı şekilde gerçekleşmektedir. Bunlardan ilki alfa-toksin düşük konsantrasyonlarda mevcut olduğunda, spesifik bir hücre yüzey reseptörü proteini bağlar. Bu hücre yüzey reseptörünün yapısı bilinmemektedir. Bununla birlikte, alfa-toksin daha yüksek konsantrasyonlarda, non-spesifik bir şekilde hücre membranına yapışır. Monomer, lipid çift tabakasına nüfuz etme kabiliyetine sahiptir. Monomerlerin lipid çift tabakasını geçmesi heptamerik porların oluşumuyla sonuçlanır. Sonuçta oluşan bu porlardan potasyum iyonları ile diğer küçük moleküller hücre dışına çıkarken; kalsiyum, sodyum ve düşük moleküler ağırlığa sahip moleküller hücre içine girmektedir. Bu durum hücrede osmotik değişikliğe neden olmakta ve hücrenin lizisiyle sonuçlanmaktadır (64,66,83).

Beta-toksin (beta-hemolizin): Alfa-toksin ile birlikte sfingomiyelin üzerine etkili olan beta-toksin sfingomiyelinaz C (fosfolipaz-C) olarak da bilinmektedir. İnvaziv stafilokok infeksiyonları için tipik olan doku hasarı ve apse oluşumuna neden olan en önemli toksinlerdir (53). 35.000 Da moleküler ağırlığa sahip olan beta-hemolizin, *hly* geni tarafından kodlanır (83). Termolabil bir proteindir. Eritrositler, lökositler ve makrofajlar gibi çeşitli hücreler üzerinde toksik etki gösterir fakat asıl etkisini eritrositler üzerine göstermektedir. Hemolitik aktivitesi bulunup, bu etki hücrelerin duvarındaki sfingomiyelin miktarına bağlıdır (57). En iyi koyun eritrositleri üzerinde etkilidir. İnsan ve tavşan eritrositleri üzerindeki etkinliği daha azdır. Bu etki farklı türlerde eritrositlerin değişen düzeylerde sfingomiyelin içermesinden kaynaklanmaktadır. Katalaz enzimi ile birlikte duyarlı hücrelerin membran fosfolipitlerini hidrolize eder.

Mg⁺² ve Ca⁺² iyonları ile belli oranda sfingomiyelin ve lizo-fosfodikolin varlığında hemolizin gerçekleşir. Sıcak-soğuk hemolizin olarak da bilinen beta-toksin, başlangıçta belli bir miktar ısıda (37 °C) hemolizin oluşturan stafilokokların hemolitik aktiviteleri bu toksin nedeniyle düşük ısılarda (4-10 °C) artar (53).

Beta-hemolizin, alfa-hemolizinden daha az toksiktir ve bu nedenle kendi başına öldürücü etki göstermeyebilir. Hayvan orjinli stafilokokların hemen hepsi beta-toksine sahipken, insan orjinli stafilokoklar da bu toksinin bulunması değişkenlik gösterir. Beta-toksine sahip bir stafilokok, B grubu streptokoklar ve *Listeria monocytogenes* tarafından üretilen CAMP faktörünün tespitinde kullanılır. B grubu streptokok ve *Listeria*

monocytogenes CAMP faktörüne sahipse, kanlı agarda beta-toksinli stafilokoka dik olarak ekim yapıldığında iki bakterinin birbirine yaklaştığı noktalarda semi sirküler bir hemoliz zonu oluştuğu görülür (57,82).

Delta-toksin (delta-hemolizin): 26 aminoasitten oluşan delta-hemolizin, *S. aureus* suşlarının çoğu (% 97) ve diğer bazı (*S. epidermidis*, *S. haemoliticus* gibi) stafilokoklar tarafından üretilir. Ortalama 3.000 Da moleküler ağırlıkta olan delta-hemolizin, *hld* geni tarafından kodlanır. Bu toksin, eritrosit ve diğer memeli hücrelerin yanı sıra membrana bağlı organelleri, sferoplast ve protoplast gibi hücre içi membran yapılarını da içeren oldukça geniş spektrumlu bir sitolitik aktiviteye sahiptir (84). Bu durum, deterjan benzeri etki ile biyolojik membranlar üzerine hasar oluşturunca etki göstermesiyle ilgilidir (64). Geniş bir sitolitik aktivitesi olmasına rağmen diğer sitolitik toksinler kadar etkin değildir. Yapılan çalışmalar incelendiğinde deney hayvanlarında yüksek konsantrasyonlarda dermonekrotik aktivitenin yanı sıra letal aktivite de gözlemlenmiştir fakat bu aktivitelerin çok küçük miktarlarda alfa-toksin ile kontaminasyondan kaynaklanması da mümkündür. Fosfolipitlerin varlığı delta-hemolizin aktivitesini inhibe eder (84). Bu toksin ayrıca adenilat siklazı aktive ederek CAMP salınımına neden olur. Bu enzimatik aktivitenin stafilokokal gıda zehirlenmeleri ve toksik şok sendromu gibi hastalıklarda görülen ishalin oluşumunda etkili olduğu düşünülmektedir (53).

Gama-toksin (gama-hemolizin) ve PV-lökositidin: Gama-toksin çoğu *S. aureus* suşu tarafından sentezlenebilmektedir ve insan dahil birçok canlının eritrositlerine sitolitik etki gösterir. PV-lökositidin *S. aureus*'ların yalnızca % 2 ila 3'ü tarafından sentezlenir ancak ağır seyreden dermonekrotik dokulardaki lezyonlardan elde edilen izolatlarda % 90 oranında bulunmaktadır. PVL, sitolitik etki göstermesine rağmen diğer toksinlerin aksine hemolitik etki göstermemektedir. Her iki toksin de S ve F komponentleri olarak bilinen iki adet antijenik özellikteki protein komponenti tarafından oluşmuştur. Bu komponentler lökositleri tahrip edip fagositozun gerçekleşmesini engelleyerek patojeniteyi arttırırlar. Tek başlarına hareket ettiklerinde bu bileşenler lökositler üzerinde herhangi bir etki oluşturmazlar ama birbirlerine bağlandıklarında lökositlerin hücre membranlarında geçirgenliği arttırarak şişip yuvarlak ve granüler bir form haline gelmesine, hareket yeteneğini kaybetmesine ve sonrasında da yavaşça parçalanmasına neden olur (82,83,84). Prevost ve ark. bu iki komponentin, *S. aureus*'un genomundaki farklı iki bölgeden meydana geldiğini ortaya koymuştur. Bu iki sitotoksini birarada bulunduran *S. aureus* suşlarında üç adet S komponenti (HlgA, HlgC ve LukS-PV) ve iki F adet komponenti (HlgB ve LukF-PV) bulunmaktadır (85).

Üç adet S komponenti ve iki adet F komponenti aralarında birleşerek altı farklı gama hemolizin/PV-lökositidin toksini oluşmaktadır. Yapılan çalışmalarda alt ünitelerin tek başlarına

lökotoksik ve hemolitik aktiviteye sahip olmadıkları, çiftler halinde eritrositlere eklendiklerinde farklı seviyelerde aktivasyona sahip oldukları saptanmıştır. HlgA-LukF-PV ve HlgC-HlgB yüksek düzeyde hemolitik aktiviteye sahipken, HlgA-HlgB çifti içlerinde en yüksek hemolitik aktiviteye sahip olanıdır. Diğer kombinasyonların daha düşük hemolitik aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Toplam oluşan altı olası kombinasyon da lökositleri lize etme özelliğine sahiptir (83).

Gama-hemolizin, kromozomal olarak bulunan *hlg* lokusundaki *hlgA*, *hlgB* ve *hlgC* genleri tarafından kodlanır. Bu üç genin kodladığı proteinler birleşerek olgun, salgısal toksini oluştururlar (84).

PVL'yi *lukS-PV* ve *LukF-PV* genleri kodlar. PV-lökosidinin etki mekanizması, hedef hücrelerde por oluşumuna neden olarak hücrenin başta potasyum olmak üzere katyonlara geçirgenliğinin artırılmasıdır. Buna bağlı olarak da insan granülosit sitoplazmalarında degranülasyona, lökositlerin yıkımına ve doku nekrozuna yol açmaktadır (53).

2.2.4.5.2. Eksfoliyatif toksin (Epidermolitik toksin)

Eksfoliyatif toksinler, eksfoliyatinler veya epidermolitik toksinler olarak da bilinmektedir. Bazı *S. aureus* kökenlerinin salgıladığı eksfoliyatif toksin en yaygın stafilokoksik haşlanmış deri sendromu (SHDS)'na neden olur. İntradermal dokunun ayrılmasına (separasyonuna) ve derinin pul pul dökülmesine (eksfoliyasyonuna) neden olur (53,86). SHDS dışında eksfoliyatif toksinin yapmış olduğu hastalık tablosu içerisinde en iyi bilinenler; Ritter hastalığı, pemfigus neonatorum, dermatitis eksfoliativa ve Lyell hastalığı'dır (83).

S. aureus tarafından birbirinden antijenik ve yapısal olarak farklı dört eksfoliyatif toksin serotipi sentezlenir. Bunlardan eksfoliyatif toksin A (ETA) ve eksfoliyatif toksin B serotipleri çoğu SHDS vakalarından sorumludur. ETA ve ETB biyokimyasal özellikler ve immünolojik yapı bakımından birbirinden farklı, fakat aynı biyolojik aktiviteye sahip iki bölümden oluşur (83). S1 ve S2 adlı her iki bölge altı iplikli β yumağına ve C-terminal α -heliksine sahiptir. Toksinlerin S1 bölgesinin N-terminal kısmının ortasında ise treonin ve histidin aminoasitleri bulunmaktadır (87). ETA 26 kDa moleküler ağırlığa sahip, kromozomal kökenli, ısıya dirençli/termotabil (100 °C'de 20 dakika) fakat EDTA'ya (etilendiamintetraasetik asit) dirençsiz bir proteindir. ETB ise 27 kDa moleküler ağırlığa sahip, plazmid kökenli, ısıya dayanıksız/termolabil (60 °C'de 20 dakika) ve EDTA'ya dirençlidir (57,66). Bu toksinlerin ortak özellikleri proteolitik (serin proteazlar) aktivite ve süperantijen özelliğine sahip olmalarıdır (88). Bu proteazlar epidermis stratum basale ve granulosum tabakalarında bulunan desmoglein I'i parçalar. Desmoglein, bir adezyon

molekölü olup epidermal hücreleri birbirine bağlar (89,90,91). Yapılan epidemiyolojik çalışmalar sonucunda ETA'nın ABD ve Avrupa'da baskın serotip olduğu, Japonya'da ise ETB'nin yaygın serotip olduğu gözlemlenmiştir (90). Her iki toksin de insan için immünojenik özelliktedir ve toksinlere karşı üretilen antikorlar nötralizan ve koruyucu etkiye sahiptir (53).

S. aureus bunların dışında eksfoliyatif toksin C (ETC) ve eksfoliyatif toksin D (ETD) serotiplerini de sentezlemektedir. ETC, 27 kDa moleküler ağırlığa sahip, termolabil (ısıya duyarlı) bir toksindir. Deri enfeksiyonu olan bir attan izole edilmiş olup hem yenidoğan farelerde hem de civcivlerde intraepidermal bölünmeye neden olduğu gözlemlenmiştir.

ETD, 27 kDa moleküler ağırlığa sahiptir. % 59 oranında ETB'ye, % 40 oranında ETA'ya ve % 13 oranında ETC'ye genetik yapı yönünden benzerlik göstermektedir. Toksin yeni doğmuş fare yavrulara deri içi enjekte edildiğinde epidermisin iç kısmında lezyonlar, deride kabuklanma ve döküntüler oluşmaktadır fakat bir günlük civcivlerde bu etki görülmemektedir. Yapılan çalışmalarda araştırmacılar ETD'nin SHDS ile güçlü şekilde ilişkili olmadığı, EDT'nin cilt epitel bariyerini bozmak ve organizmanın lokal dokularda daha geniş alanlara yayılmasına yardımcı olduğu bildirmektedir (83).

2.2.4.5.3. Toksik şok sendromu toksini (TSST-1)

İlk defa 1978 yılında tanımlanan toksik şok sendromu (TŞS) derin refrakter hipotansiyon, ishal, eritrodermi, mental konfüzyon, renal yetmezlik ve yüksek ateşle karakterize bir tablodur. 1981 yılında TŞS'li hastalardan izole edilen *S. aureus* kökenlerinin pirojenik ekzotoksin tip C ve stafilokoksik enterotoksin F adlı iki toksin ürettiği saptanmıştır. Ardından yapılan birtakım çalışmalar sonucunda bu iki toksinin içeriğinde aynı protein olduğu sonucuna varılmış ve toksik şok sendromu toksini-1 (TŞST-1) adı verilmiştir (53).

TŞST-1, süperantijen özelliğe sahip olup, 22 kDa moleküler ağırlıkta ve *tstH* (H insan izolatu olduğunu ifade eder) tarafından kodlanan ekzotoksindir. Toksin ısı ve proteolizise karşı dirençlidir. Uzun süre tripsinle muamele edilmesine rağmen yapısında bir bozulma olmaz. TŞST-1, A ve B bölgesi olmak üzere iki yakın bölgeden oluşmaktadır. A bölgesi, beş iplikli β -yumağıyla çevrilmiş uzun bir α -heliks'e sahiptir. B bölgesi ise pençe şeklinde beş adet β -ipliğinden oluşmaktadır. Hurley ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada TŞST-1 üzerindeki T hücre reseptörü (TCR) ve MHC sınıf II moleküllerinin bağlanma bölgeleri tespit edilmiş ve TŞST-1'in süperantijenik aktivitesi için MHC sınıf II molekülüne bağlanması gerekli olduğu anlaşılmıştır (83,84). Klasik antijen sunumundan farklı olarak direkt monosit ve lenfositlere bağlanarak monokin ve lenfokin salınımına neden olur. Bunun yanı sıra TSST-1'in çok küçük

miktarlarda da olsa gram negatif bakterilerin endotoksinlerine karşı vücutta oluşan yanıtı oldukça güçlendirici etkisi de bulunmaktadır. Buna bağlı olarak TŞS'de görülen hızlı multisistemik tutulum ve klinik bulguların ortaya çıktığı kabul edilmektedir (53).

2.2.4.5.4. Enterotoksinler

Stafilokoksik besin zehirlenmeleri, enterotoksijenik aktiviteye sahip olan stafilokokların gıdalarda 10^6 kob/g veya daha yüksek sayıya ulaşmasıyla sentezlenen enterotoksinin, alimenter yol ile alımı sonucu oluşmaktadır. Enterotoksinler aslında bir ekzotoksindir ve sindirim sistemini etkiledikleri için enterotoksin olarak adlandırılırlar (37,92).

İlk kez 1914 yılında Barbera tarafından stafilokokal mastitli bir ineğin sütünün içilmesi sonucu mide bulantısı ile kendini gösteren akut gastrointestinal bir enfeksiyonun oluşmasıyla fark edilmiş, 1930'da Dack tarafından yapılan çalışmalarla stafilokok suşlarının sentezlediği enterotoksinlerin sindirim yolu ile vücuda alınması sonucunda besin zehirlenmesi meydana geldiğini göstermiştir (37).

Stafilokokal enterotoksinler (SE) molekül ağırlığı 26-35 kDa (kilodalton) arasında değişim gösteren, hidroliz yoluyla 18 aminoasit üreten ve yapısında yüksek miktarlarda lizin, tirozin, aspartik asit ve glutamik asit bulunduran tek zincirli proteinlerdir. Stafilokoksik besin zehirlenmelerinden sorumlu olan stafilokokal enterotoksinler SEA, SEB, SEC, SED ve SEE olmak üzere beş temel serolojik tipten oluşur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SES, SET, SEU ve SEV gibi farklı birçok enterotoksinlerin varlığı da bildirilmiş ancak bu enterotoksinlerin gıda zehirlenmeleri ile olan ilişkileri hala araştırılma konusudur (83). Daha önce enterotoksin F olarak adlandırılan toksinin enterotoksin olmadığı anlaşılmaması üzerine Toksik Şok Sendromu Toksin 1 (TSST-1) olarak tanımlanmıştır. F tipi toksinle yapılan hayvan deneylerinde klasik stafilokok intoksikasyonlarında görülen tipik belirtiler görülmemiştir (37).

Bu toksinlerin etki mekanizması tam olarak açıklanamasa da sempatik aktivasyon ile bağırsak peristaltizmini arttırdıkları düşünülmekte ve stafilokoksik besin zehirlenmelerinde görülen kusmalar nedeniyle santral sinir sistemini de etkileyerek nörotoksik etki gösterdiği kabul edilmektedir. SE'ler su ve tuzlu solüsyonlarda çözünerek higroskopik özellik gösterirler. Enterotoksinler pH <2'de pepsin hariç insan intestinal sisteminin proteolitik enzimlerine (tripsin, kimotripsin, kimozen ve papain gibi), 100 °C'de 30 dakika ısıtılmaya (yüksek sıcaklığa) ve dondurma işlemine karşı dirençlidir. Stafilokokal enterotoksinlerin en önemli özellikleri ısıya dayanıklılık olup, gıdalardaki enterotoksinlerin pastörizasyon, pişirme ya da diğer ısı uygulamaları ile tamamen inaktive edilemedikleri bildirilmektedir.

Enterotoksinlerin yüksek sıcaklığa olan direncini etkileyen bazı faktörler bulunmaktadır. Bunlar; enterotoksinin tipi, gıdanın yapısı, pH değeri ve tuz konsantrasyonudur. Yapılan çalışmada (Tibana ve ark.) SEA ve SEB'nin 100 °C'de 90 dakikada, 120 °C'de 30 dakikada, SEC'nin 100 °C'de 180 dakikada, 120 °C'de 60 dakikada tamamen inaktive olduğu bildirilmiştir. Enterotoksinler gama ışınlarına ve kurumaya dirençlidir. *Staphylococcus aureus*'un üremesi için gerekli optimum sıcaklık derecesi 37 °C'dir ancak enterotoksin üretimi için optimum sıcaklık derecesi 40-45 °C arasında değişmektedir. Enterotoksinlerin oluşumu için optimum pH değerleri 6-7 arasındır. SEA ile SEB oluşumu kıyaslandığında SEA, pH değişikliklerine daha toleranslıdır (83,91).

Stafilokokal enterotoksinler gıda içerisinde enterotoksijenik özellikteki stafilokok hücrelerinin çoğalması sırasında sentezlenir. SEA ve kısmen SED logaritmik faz sırasında SEB ve SEC ise geç logaritmik faz ile erken duraklama fazında üretilir (8). *S. aureus*'un virülans faktörlerinin düzenlenmesinden *agr* (accessory gene regulator) geni sorumludur. Bu *agr* geninde oluşacak mutasyonlar birçok stafilokokal enterotoksinler ve diğer ekzoproteinlerin oluşumunun azalmasına sebep olur. *Agr* sayesinde gen translasyon ve transkripsiyon olarak düzenlenebilir. Bazı SE'ler *agr* tarafından regüle edilebilmektedir. SEA ve SED erken oluşturulduğu için *agr* mutasyonlarından etkilenmemekte fakat SEB ve SEC geç oluşturulduğu için *agr* tarafından transkripsiyon düzeyde regüle edilmektedir (91). Gıda zehirlenmelerinde en sık rastlanan enterotoksin SEA'dır ve bunu SED izlemektedir. SEB ise nadir görülen stafilokoksik psödomembranöz enterokolit tablosuna neden olmaktadır. Özellikle A kısmen D tipi intoksikasyonlara sık rastlanmasının nedenleri:

- i. SEA toksinlerinin esas kaynağının insanlar olması,
- ii. Logaritmik üreme fazında birincil metabolit olarak oluşturulması,
- iii. SEA toksinlerinin zor koşullar altında üretilebilmesidir.

SEB ve SEC logaritmik üreme fazının sonunda olduğu için sekonder metabolit olarak ortaya çıkmaktadır. Bu durumda SEB ve SEC oluşabilmesi için en az 20 saatlik bir inkübasyon sürecine ihtiyaç vardır (37).

Staphylococcus genusunda *S. aureus*'tan başka enterotoksin oluşturan türler de vardır. Bunlar: *S. haemolyticus*, *S. xylosus*, *S. equorum*, *S. lentus*, *S. capitis*, *S. hyicus*, *S. epidermidis* ve *S. intermedius* dur. Ancak *S. aureus* enterotoksijenik stafilokoklar içerisindeki en önemli türdür ve koagülaz pozitif stafilokoklardan *S. hyicus* ve *S. intermedius*'un sentezledikleri enterotoksin miktarı *S. aureus*'a göre çok düşüktür (8).

SE'ler kuvvetli gastrointestinal toksin olmalarının yanı sıra nonspesifik T hücre proliferasyonunu ve sitokin salınımını uyaran süperantijenlerdir. Süperantijenler MHC sınıf II

molekülleri ve T hücre reseptörlerinin spesifik V β bölgelerine bağlanarak antijen sunan hücreler ve T lenfositlerin aktivasyonuna yol açar. Diğer bir ifadeyle bilinen antijenden farklı olarak süperantijenler, antijen sunan hücreler tarafından küçük peptid parçalara ayrılmadan MHC sınıf II moleküllerine bağlanır ve T hücre reseptörleri (TCR-T cell reseptör) ile bir trimoleküler form oluştururlar. Gıda zehirlenmeleri dışında toksik şok benzeri sendroma, alerjik reaksiyonlara, otoimmün hastalıklara ve artrite de neden olmaktadır (8).

Tablo 1. *S. aureus*'un üreme ve toksin oluşturma koşulları (37)

Faktör	Üreme		Toksine Oluşturma	
	En Uygun	Spektrum	En Uygun	Spektrum
Sıcaklık (°C)	37	6,7-47,8	40-45	10-47,8
pH	6,7	4-10	6-7	4,5-9,8
a_w (su aktivitesi)	0,98	0,83-0,99	0,98	0,86- >0,99
%NaCl	0	0-20	0	0-10
Redoks Potansiyeli (mV)	> +200	-200/+200	> +200	-100/+200
Atmosfer	Aerob	Aerob-anaerob	Aerob	Aerob-anaerob

Stafilokokal Enterotoksin A (SEA): SEA, *entA* geni tarafından kodlanır. 771 baz çiftinden oluşan *entA* geni bir bakteriyofaj tarafından taşınır. SEA prekürsör proteinleri 257 aminoasitten oluşur. Stafilokokal gıda zehirlenmesine sebep olan en kuvvetli toksindir (84,91). Duyarlı insanlarda 1 μ g alınması zehirlenme belirtilerinin ortaya çıkması için yeterlidir (37).

Stafilokokal Enterotoksin B (SEB): SEB, *entB* geni tarafından kodlanır. 900 nükleotid içeren SEB, 267 prekürsör aminoasitten oluşur. *S. aureus*'un gıda zehirlenmelerinden sorumlu tutulan *entB* geni krozomal yapıdadır (84).

Stafilokokal Enterotoksin C (SEC): SEC, antijenik olarak SEC1, SEC2 ve SEC3 olmak üzere üç alt tipten oluşmaktadır. 801 baz çiftinden oluşan *entC3* ve *entC2* geni 267 aminoasitlik prekürsör proteini kodlar. *entC1* geni ise 801 baz çiftinden oluşup 266 aminoasitlik prekürsör proteini kodlar (84). SEB ile SEC aminoasit bileşimi yönünden benzerlik göstermektedir. Bu benzerlik özellikle metiyonin ve lösin aminoasitlerinin içerikleri açısından (91).

Stafilokokal Enterotoksin D (SED): Stafilokokal gıda zehirlenmesine sebep olan diğer bir önemli toksin SED'dir. SED, *entD* (*pIB485*) geni tarafından kodlanır. *entD* geni penisilinaz plazmidinde taşınmaktadır. Bu gen 258 aminoasitlik prekürsör proteini kodlar (84). Süperantijen SED, yüksek düzeylerde afinite göstermek için MHC sınıf II molekülleri ile Zn^{+2} ye bağlanır ve SED ile Zn^{+2} birlikte kristalize olur (84,91).

Stafilokokal Enterotoksin E (SEE): SEE, *entE* geni tarafından kodlanır. *entE* geni 771 baz çiftinden oluşup 26.000 Da moleküler ağırlığına sahip prekürsör proteini kodlar. Sekans analizleri sonucunda SEA, SED ve SEE'nin aminoasit bileşimi yönünden birbirlerine benzer olduğu belirtilmiştir (84,91).

2.2.5. Stafilokokal enterotoksinlerin süt ve süt ürünlerindeki varlığı

Stafilokokların gıda içerisinde üremesi sonucu oluşan enterotoksinler, stafilokok intoksikasyonuna neden olur (57). Stafilokok intoksikasyonları kısa inkübasyon süresi ile karakterize olup enterotoksin içeren gıdanın alınmasından yaklaşık 2-4 saat sonra mide bulantısı, kusma, karın bölgesinde oluşan kramplar ve ishal gibi semptomlar ile ortaya çıkar. Toksinlerin yeri abdominal viseradır. Toksinlerin mide çeperini tahriş etmelerine bağlı olarak nöral reseptörlerin uyarılması sonucu kusma reaksiyonu oluşur. Bu yolla toksinlerin vücuttan emilmeden atılması sağlanır. Stafilokokal gıda zehirlenmelerinde (SGZ) kusma sıklıkla görülen bir semptomdur. Enterotoksinler, bağırsağın bazal lümenindeki suyun absorpsiyonunu ya da lümen içindeki sıvının geçiş hızını inhibe ederek diyareye neden olur. Stafilokok zehirlenmelerinde ateşin görülmediği, hatta bazı vakalarda düşük ateş gözlemlendiği bilinmektedir. Sağlığa yeniden kavuşulması yaklaşık 24-48 saat sürer. Çok ender durumlarda çocuklarda ve yaşlı insanlarda akut dolaşım kollapsına bağlı ölüm görülebilir (37,57).

Dünya çapında SE'ler halk sağlığı açısından ciddi risk oluşturmaktadır (92). Enterotoksin oluşumu birçok faktöre bağlıdır. Bunlar; su aktivitesi, pH, ortam sıcaklığı, tuz miktarı, rutubet, gıdanın özelliği ve rekabetçi floradır. Oluşan toksin miktarı gıda çeşidiyle yakından ilgilidir (8).

Stafilokok zehirlenmelerinden sorumlu tutulan gıdalar arasında genellikle proteince zengin ve işlem görmüş et ve et ürünleri, yumurta, et suyu ile yapılmış çorbalar ve soslar, salatalar, süt ve süt ürünleri, kremalı ürünler ve dondurmalar yer alır. Bu kapsamda stafilokok intoksikasyonunda sorumlu tutulan gıdalar arasında ilk sırada süt ve süt ürünleri yer almaktadır. Süt ve süt ürünleri, içeriğindeki zengin besin maddeleri ve nötral pH'sı sayesinde *S. aureus*'un çoğalması ve enterotoksin üretimi için uygun bir ortamdır. Özellikle mastitli veya subklinik mastitli süt hayvanlarından temin edilen sütün normal sütlere karıştırılması, pastörizasyon öncesi ve sonrası bulaşma ile muhafaza sıcaklığı ve süresine bağlı olarak toksin oluşmaktadır. Pastörizasyon işlemi çiğ sütteki *S. aureus*'u etkisiz hale getirebilir ancak SE'ler ısıl işleminden sonra bile stabil/etkin kalabilir. Rall ve ark. pastörizasyon işleminden sonra bile enterotoksijenik stafilokokların varlığını gözlemlemiştir (8,37,93)

SGZ salgınlarının büyük bir kısmı, Fransa ve İtalya gibi pastörize edilmemiş süt tüketiminin yaygın olduğu ülkelerde rapor edilmiştir (92).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, İl Tarım ve Orman Müdürlüğü tarafından 26.11.2021 tarihli ve 10059539-77507 sayılı yazı ile onaylanmıştır (Ek1). Bu çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (proje numarası: 2022/3-7 YLS).

Bu tez çalışmasında, Kahramanmaraş ili merkez ve çevresindeki çeşitli firma ve mandıralarda satışa sunulan çiğ keçi sütü örneklerinden elde edilen *Staphylococcus* türleri dahil edildi. Çalışmada toplam 135 keçiden alınan süt örnekleri, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına soğuk zincir taşıma (2-8 °C) ile bekletilmeden analiz yapılmak üzere getirilmiştir. Fenotipik identifikasyon testleri ardından izole edilen suşlar belirlenen çalışma sayısına ulaşana kadar eksi 20 °C'de stoklandı. İzolatların toplama işlemi tamamlandıktan sonra tüm izolatların taze kültürleri yapılarak tür düzeyinde analizi yapıldı.

3.1. Hayvanlar

Bu çalışmada tür olarak Kıl keçilerinden yararlanılmıştır. 135 keçiden alınan süt numuneleri araştırmanın materyalini oluşturmuştur. Keçilere sağım öncesi ve sonrası meme dezenfeksiyonu yapıldı. Sağım için sabah ya da akşam saatleri tercih edildi.

3.2. Gereç

3.2.1. Kullanılan cihaz ve sarf malzemeler

Kullanılan Cihazlar

- Biyogüvenlik kabini (Esco Class II BSC, Singapur)
- Buzdolabı (Altus AL 380, Türkiye)
- Termal Döngü Cihazı (Applied Biosystems GeneAMP PCR System 9700, Singapur)
- Hassas Terazı (Radwag AS 220 RR, Polonya)
- Vorteks (Dragon MX-F, Çin)
- Mini Santrifüj (Myfuge C1012, Kore)
- Jel Elektroforez Tankı (Thermo Owl EasyCast B2, ABD)

- Güç Kaynağı (Thermo EC 300 XL, Malezya)
- Jel Görüntüleme Sistemi (Vilber Lourmat Quantum ST4, Fransa)
- İnkübatör (Heraeus B12, Almanya)
- Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı (IKA C-Mag HS 7, Almanya)
- Mikrodalga Fırın (Arçelik, Türkiye)
- Otomatik Ayarlanabilen Pipetler (Eppendorf Research Plus, Almanya)
- Otoklav (Hanshin HS 60 SL, Güney Kore)
- DNA Dizi Analizi Cihazı (Applies Biosystems 3130 Genetic Analyzer, Japonya)

Sarf Malzemeler

- %5 Koyun Kanlı Agar (Becton Dickinson, ABD, Katalog No: PA-254005.06)
- Baird-Parker Agar (OR-BAK, Türkiye, Katalog No: OR-PET 03)
- Centrifuge Tube 15 ml (Microcult, Türkiye, Katalog No: 231110)
- Eppendorf Tüp
- Taq DNA Polimeraz (Hibrogen, Türkiye, Katalog No: MG-KTAQ-01)
- dNTP Mix (Hibrogen, Türkiye, Katalog No: MG-DNTP-10-1)
- Agaroz (Hibrogen, Türkiye, Katalog No: MG-AGRZ-01)
- Ethidium Bromide (Vivantis, Malezya, Katalog No: PC0707-10 ml)
- 6X Blue Loading Dye (Hibrogen, Türkiye, Katalog No: MG-YBM-01)
- Tris-Asetat-EDTA (TAE) Buffer (Merck, Almanya, Katalog No: 1.06174.1000)
- 100 bp DNA Ladder (Hibrogen, Türkiye, Katalog No: MG-LDR-100)
- PCR pürifikasyon kiti (ExoSAP-IT Express PCR Product Cleanup Reagent, kat no: 78205.10.ML, Applied Biosystems, Vilnius, Litvanya)
- Sodyum klorür (Sigma, Almanya, Katalog No: 13423)
- Hidrojen peroksit (Merck, Almanya, Katalog No: 1.08600.1000)
- Primer dizileri (Tablo 8 ve 10)

3.2.2. Kullanılan besiyerleri

3.2.2.1. %5 Koyun kanlı agar

%5 koyun kanlı agar kullanıma hazır plak besiyeri olarak temin edildi.

Tablo 2. % 5 Koyun Kanlı Agar İçeriği

Bileşenler	İçerik
Kazeinin Pankreatik Dijesti	12,0 gr
Hayvan Dokularının Peptik Dijesti	5,0 gr
Maya Ekstraktı	3,0 gr
Sığır Eti Ekstraktı	3,0 gr
Mısır Nişastası	1,0 gr
Sodyum Klorür	5,0 gr
Agar	13,5 gr
Defibrinleştirilmiş Koyun Kanı	%5

3.2.2.2. Baird-Parker agar

Baird-Parker agar kullanıma hazır plak besiyeri olarak temin edildi.

Tablo 3. Baird-Parker Agar İçeriği

Bileşenler	İçerik
Kazein enzimatik hidrolizatı	10 g
Sığır eti ekstresi	5 g
Maya ekstresi	1 g
Sodyum piruvat	10 g
Glisin	12 g
Lityum klorür	5 g
Potasyum tellürit	0,1 g
Yumurta emülsiyonu	50 ml
Sülfametazin	0,05 g
Agar	15 g

3.2.3. Kullanılan Çözeltiler

3.2.3.1. Fizyolojik tuzlu su

1000 ml distile su ve 8,5 g tartılan sodyum klorür (NaCl) 2000 ml’lik içerisinde manyetik balık bulunan erlenmayere aktarıldı (Tablo 4). Manyetik karıştırıcı üzerinde homojen hale getirildi. Otoklava konularak 121 °C’de 15 dakika steril edildi.

Tablo 4. Fizyolojik Tuzlu Su İçeriği

Bileşenler	İçerik
Sodyum Klorür	8,5 g
Distile Su	1000 ml

3.2.3.2. Single cell lysing buffer (SCLB) solüsyonu

1 ml TE (Tris-EDTA, pH 7,4) tamponu ve 10 µl proteinaz K 5 mg/ml olacak şekilde stok SCLB solüsyonu hazırlandı (Tablo 5)

Tablo 5. SCLB Solüsyon İçeriği

Bileşenler	İçerik
Proteinaz K, 5 mg/ml	10 µl
Tris-EDTA Tamponu, pH 7,4	1 ml

3.3. Yöntem

3.3.1. Süt örneklerinde *Staphylococcus* izolasyonu

Soğuk zincir altında (+4 °C) laboratuvara getirilen süt örnekleri çalışma zamanına (en geç 24 saat) kadar +4 °C’de buzdolabında saklandı. Biyogüvenlik kabininde, analiz için alınan süt örneklerinden 10 ml steril idrar kabına aktarıldı ve üzerine 90 ml steril fizyolojik tuzlu su ilave edilip 2 dakika boyunca karıştırılarak homojenize edildi. Steril cam şişe içersine 1 ml hazırlanan homojenattan ve 9 ml steril fizyolojik tuzlu su eklenerek 1/10 seyreltme dilüsyonu hazırlandı. Dilüsyondan 100 µl alınıp koyun kanlı agara drigalski öze yardımıyla yüzeye yayma yöntemi ile ekim yapılarak besiyeri 37 °C’de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda besiyeri üzerinde oluşan kolonilerin üremeleri, makroskopik morfolojileri ve hemoliz özellikleri kontrol edildi. Besiyerinde 1-3 mm çapında, krem-sarı renkte, hafif konveks, düzgün (S) koloniler şüpheli olarak değerlendirildi. Saf kültür eldesi için stafilokok olduğu düşünölen kolonilerden öze ile alınarak koyun kanlı agara pasajlandı ve 37 °C’de 24-48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucu gelişen koloniler fenotipik identifikasyon testlerine (Gram boyama, katalaz testi, koagölaz testi) tabi tutuldu. Pozitif sonuç veren şüpheli koloniler *Staphylococcus* olarak değerlendirildi.

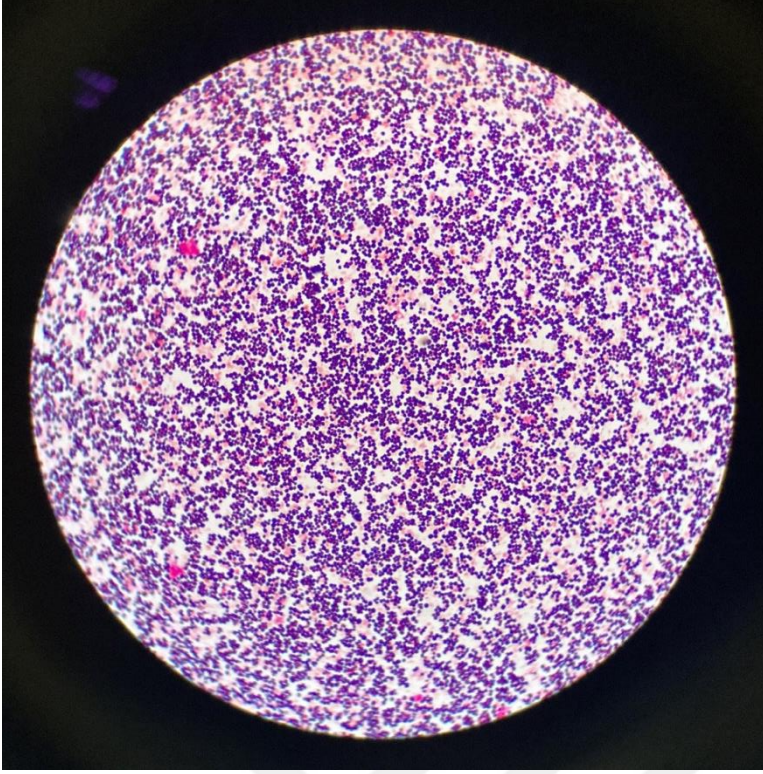


Şekil 3. Koyun kanlı agar besiyerindeki muhtemel *Staphylococcus* kolonilerinin kültür görünümü

3.3.2. İzolatların tanımlanması

3.3.2.1. Gram boyama

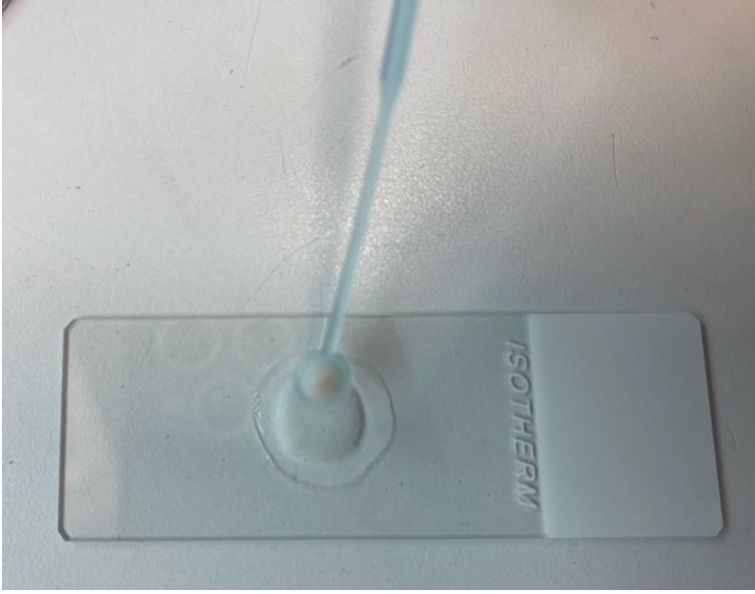
Staphylococcus türlerine ait olduğu düşünülen ve bir gün öncesinde saflaştırılan kolonilere Gram boyama yapıldı. Lam üzerine bir damla % 0,9'luk NaCl alınarak şüpheli koloniler öze ile fizyolojik tuzlu su içerisinde homojen bir şekilde dağıtıldı. Oda sıcaklığında kurutulduktan sonra lam alevden 2-3 kez geçirilerek tespit edildi. Preparatlar üzerine kristal viyole damlatıldı ve 1-2 dakika bekletildikten sonra su ile yıkandı. Aynı şekilde 1-2 dakika lügol çözeltisi uygulandıktan sonra preparatlar su ile yıkandı. % 96'lık etanol ile 10 saniye muamele edildikten sonra preparatlar su ile yıkandı. Son olarak preparatların üzerine sulu fuksin boya çözeltisi eklenerek 30 saniye bekletildi ve su ile yıkandı. Preparatlar dik tutulup bir süre kendi kendine kuruması beklendi. Mikroskop altında immersiyon yağı damlatılarak 100'lük objektif ile incelendi. Mor renkli, yuvarlak, tek tek ya da küçük gruplar şeklinde görülen mikroorganizmalar gram pozitif koklar olarak tanımlandı.



Şekil 4. On numaralı süt örneğinin Gram boyama sonrası mikroskoptaki görünümü

3.3.2.2. Katalaz testi

Gram pozitif kok olan kolonilere katalaz testi uygulandı. Katı besiyerinde üretilen şüpheli *Staphylococcus* türlerine ait koloni eküvyon yardımıyla dikkatlice alınarak temiz bir lam üzerinde bir damla serum fizyolojik ile süspanse edildi ve üzerine bir damla % 35'lik H_2O_2 ilave edildi. Lamda hidrojen peroksitin ayrışması ve serbest oksijenin gaz kabarcıkları halinde gözlenir hale gelmesi katalaz enziminin varlığını gösterdi. Streptokok türleri katalaz negatiftir. Böylelikle streptokoklardan ayrımı gerçekleştirildi.

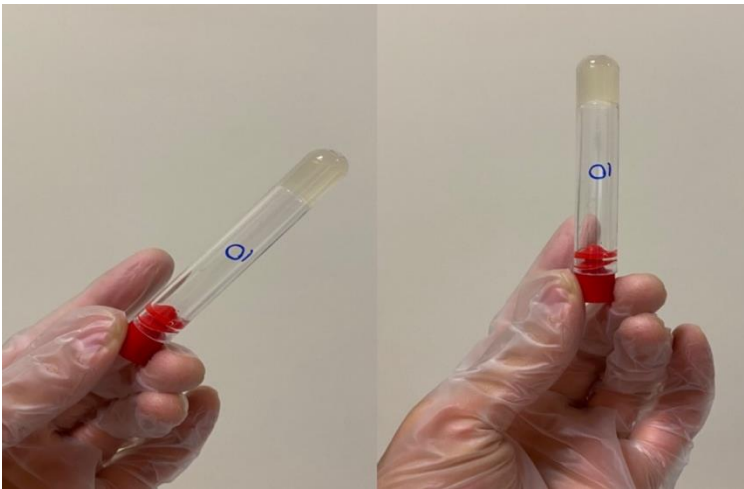


Şekil 5. Katalaz testi pozitif olan on numaralı örneğin görünümü

3.3.2.3. Koagülaz testi

Gram boyamada gram pozitif kok görünümü veren ve katalaz testi pozitif olan tüm izolatlara yapıldı.

Polistiren test tüpüne 1.000 µl serum fizyolojik ve 200 µl steril taze insan plazması eklenerek sulandırıldı. 1/5 oranında sulandırılmış plazma üzerine katı besiyerinden alınmış bir-iki saf koloni eklendi. Tüp 37 °C’de 4-5 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüpteki sıvının jelleşmesi koagülaz testinin pozitif olduğunu gösterdi. Tüpte pıhtı oluşmaması durumunda inkübasyon 24 saate kadar uzatıldı. 24 saat sonunda pıhtı oluşumu görülmeyen tüpler koagülaz negatif olarak değerlendirildi.



Şekil 6. Tüp koagülaz testi pozitif olan on numaralı örneğin görünümü

3.3.3. DNA ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu Single Cell Lysing Buffer (SCLB) prosedürü ile yapıldı:

1. 1 ml TE (Tris-EDTA, pH 7,4) tamponu ve 10 µl Proteinaz-K (5 mg/ml) kullanılarak Single Cell Lysis Buffer (SCLB) hazırlandı.
2. PCR tüpü içerisine 40 µl SCLB ve üzerine bakterinin katı saf kültüründen öze ile bir koloni alınıp tüpün içinde bakteri homojenize edildi.
3. Sonra PCR tüpü ısı döngü cihazına yerleştirildi.
4. Isı döngü cihazında Tablo 6'da gösterilen program uygulandı.
5. Isı döngü cihazından çıkarılan PCR tüpüne 80 µl deiyonize steril distile su ilave edildi.
6. Vortekslenerek homojenize edildi.
7. Tüpler 7.000 rpm de 3,5 dakika santrifüj edildi ve üstte kalan sıvı (DNA ekstraktı) PCR'da kullanıldı.

Tablo 6. Single Cell Lysing Buffer Programı

1. Basamak	2. Basamak	3. Basamak	Bekletme
80 °C 10 dk (1 döngü)	55 °C 10 dk (1 döngü)	8 °C 7 dk (1 döngü)	8 °C ∞

3.3.4. 16S rDNA PCR ile tür tanımı

İzolasyonu yapılan örneklerin tür düzeyinde tanımını yapabilmek için 16S rDNA PCR ve dizi analizi yöntemi kullanıldı. DNA örnekleri Tablo 8'deki primer dizileri kullanılarak çoğaltıldı.

Tablo 7. 16S rDNA PCR Yönteminde Kullanılan Primer Dizileri

Primer	Primer dizileri	Kaynak
27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	(94)
1492R	5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3'	

PCR'da;

1. Tablo 8'e göre her bir örnek için 48 mikrolitre PCR karışımı hazırlandı ve üzerine 2 mikrolitre SCLB DNA ekstraksi eklendi. Her çalışmaya pozitif ve negatif kontrol (su) dahil edilmiştir.

Tablo 8. Multipleks PCR Yönteminde PCR Karışımı

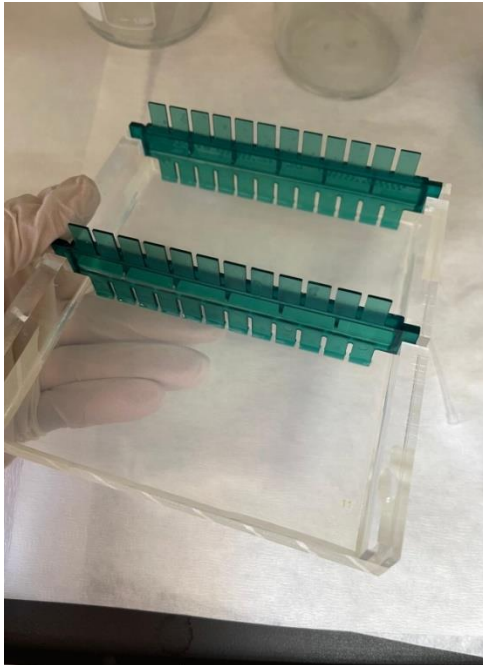
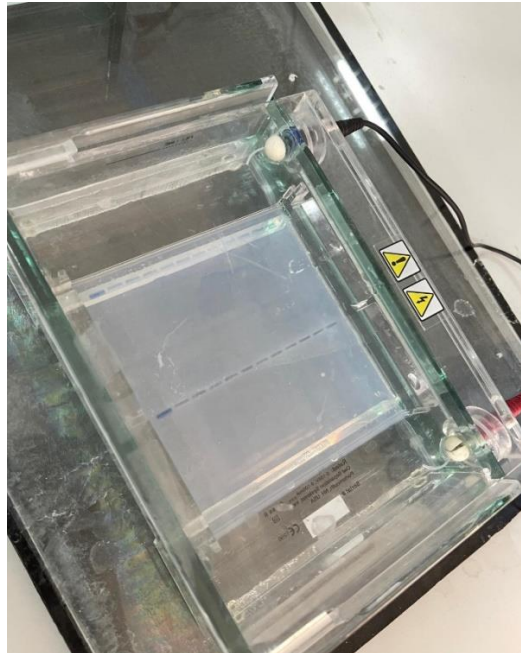
Reagen	Hacim (mikrolitre)
Su	36
10x PCR tamponu	5
MgCl ₂ (25 mM)	4
dNTP karışımı (20 mM)	0,5
Primer 27F (10 mikromolar)	1
Primer 1492R 10 mMol	1
HIBRIGEN 5 U/ μ l <i>Taq</i> DNA Polymerase	0,5
SCLB DNA Ekstrakt	2
TOPLAM	50

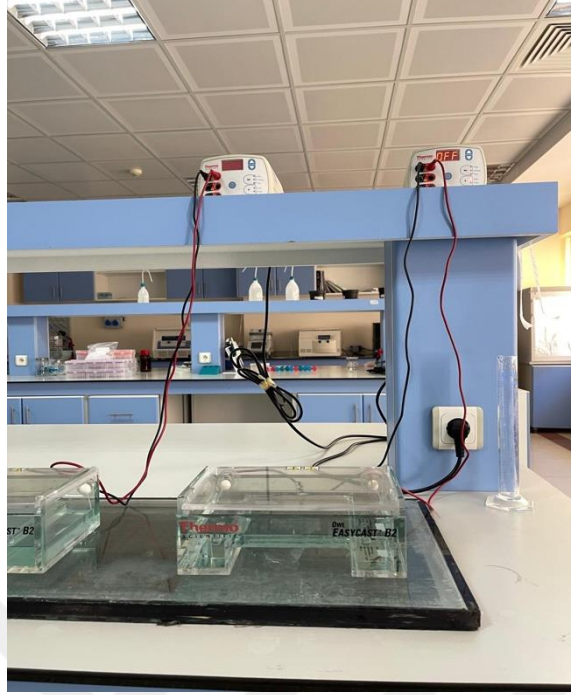
2. Isı döngü cihazında amplifikasyon programı Tablo 9' da belirtilen şekilde uygulandı.

Tablo 9. 16S rDNA PCR Programı

1. Basamak	2. Basamak	3. Basamak	Bekletme
94 °C 3 dk	94 °C 30 sn 55 °C 30 sn 72 °C 1 dk 30 sn 40 döngü	72 °C 10 dk	8 °C ∞

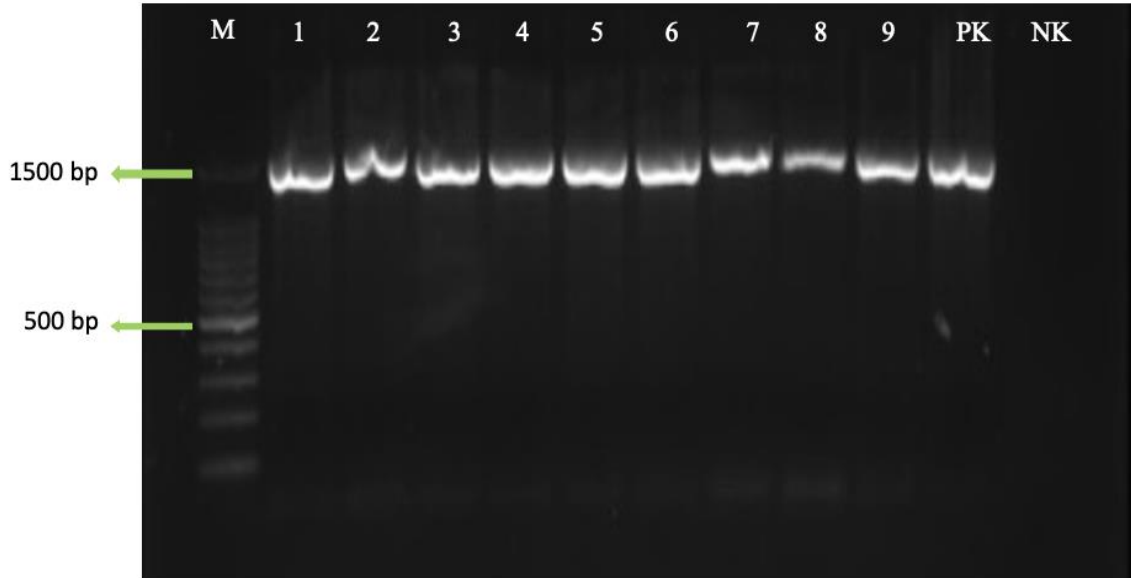
3. Amplifikasyon ürünleri % 2'lik agaroz jelde 70 mA'de 45 dakika yürütüldü.

**Şekil 7.** Hazırlanan % 2'lik agaroz jelin, PCR jel dökme kabında donmuş görüntüsü**Şekil 8.** % 2'li agaroz jele yüklemesi yapılan ürünlerinin tank içerisindeki görüntüsü



Şekil 9. Jel elektroforez tankı ve güç kaynağı

4. Jeldeki bantların UV ışık altında görüntüsü alındı (Şekil 10).



Şekil 10. 1-9 numaralı örneklerin 16S rDNA PCR amplifikasyon görüntüsü

3.3.5. PCR ürünlerinin sekans analizi

PCR ürünlerinin sekans analizi ÜSKİM (Üniversite-Sanayi-Kamu İşbirliği Geliştirme, Uygulama ve Araştırma Merkezi)'den alınan hizmet ile yapıldı. 16S rDNA PCR ile keskin ve belirgin bant paternine sahip örneklerle dizi analizi yapıldı.

PCR Pürifikasyon işlemi:

Ekzonükleaz/alkalen fosfataz enzim karışımı ile yapıldı. 5 µl 16S rDNA PCR ürünü üzerine 2 µl enzim karışımı (ExoSAP-IT Express PCR Product Cleanup Reagent, kat no: 78205.10.ML, Applied Biosystems, Vilnius, Litvanya) eklendi. Isı döngü cihazında 37 °C'de 15 dakika (inkübasyon evresi) ve 80 °C 15 dakika (enzim inaktivasyon evresi) bekletildi.

Sekans PCR: 2 µl pürifiye edilmiş PCR ürünü, 2 µl -Forward veya Reverse (2 pikomol), 2 µl BigDye Terminator (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, kat. no: 4337455, Applied Biosystems, Austin, ABD), 2 µl BigDye 5X Buffer, 2 µl deiyonize ultra saf su kullanılarak yapıldı.

Sekans PCR sonrası pürifikasyon Sefadex ile yapıldı. 700 µl Sefadex kolondan geçirilen sekans PCR ürünleri 4.600 rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek dizileme cihazına (3130 xl Genetic Analyzer, Applied Biosystem, Hitachi 628-0040, Japonya) yüklendi (Şekil 11).

Forward ve *reverse* primerlerle elde edilen diziler Sequencher 5.4.6 yazılımı (Ann Arbor, ABD) ile birleştirildi (Şekil 12). EzBioCloud veritabanı (<https://www.ezbiocloud.net/>) ile analiz edildi ve bakteri tür tanımı yapıldı.



Şekil 11. Dizileme Cihazı



Şekil 12. Sequencher 5.4.6 yazılımı ile diziler

3.3.6. Multipleks PCR ile virölans genlerinin saptanması

Stafilokokal virölans genleri (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* ve *see*) multipleks PCR yöntemi ile bakılmıştır. Multipleks PCR’da kullanılan pirmerlerin nükleotid dizileri ve ampikon uzunlukları Tablo 10’da verilmiştir.

Tablo 10. Multipleks PCR Yönteminde Kullanılan Virölans Genlerinin Primer Dizileri (95).

Primer Adı	Primer dizileri	Hedef Gen	Ampikon Uzunluğu (bp)
Sea1-F Sea2-R	CCTTTGGAACGGTTAAAACG TCTGAACCTTCCCATCAAAAAC	<i>sea</i>	127
Seb1-F Seb2-R	TCGCATCAAACGACAAAACG GCAGGTACTCTATAAGTGCCTGC	<i>seb</i>	477
Sec1-F Sec2-R	CTCAAGAACTAGACATAAAAGCTAGG TCAAAATCGGATTAACATTATCC	<i>sec</i>	271
Sed1-F Sed2-R	CTAGTTTGGTAATATCTCCTTTAAACG TTAATGCTATATCTTATAGGGTAAACATC	<i>sed</i>	319
See1-F See2-R	CAGTACCTATAGATAAAGTTAAAACAAGC TAACTTACCGTGGACCCTTC	<i>see</i>	178

1. Toplam hacmi 50 µl olacak şekilde PCR karışımı hazırlandı (Tablo 11). Her çalışmaya pozitif ve negatif kontrol (su) dahil edilmiştir.

Tablo 11. Multipleks PCR Yönteminde PCR Karışımı

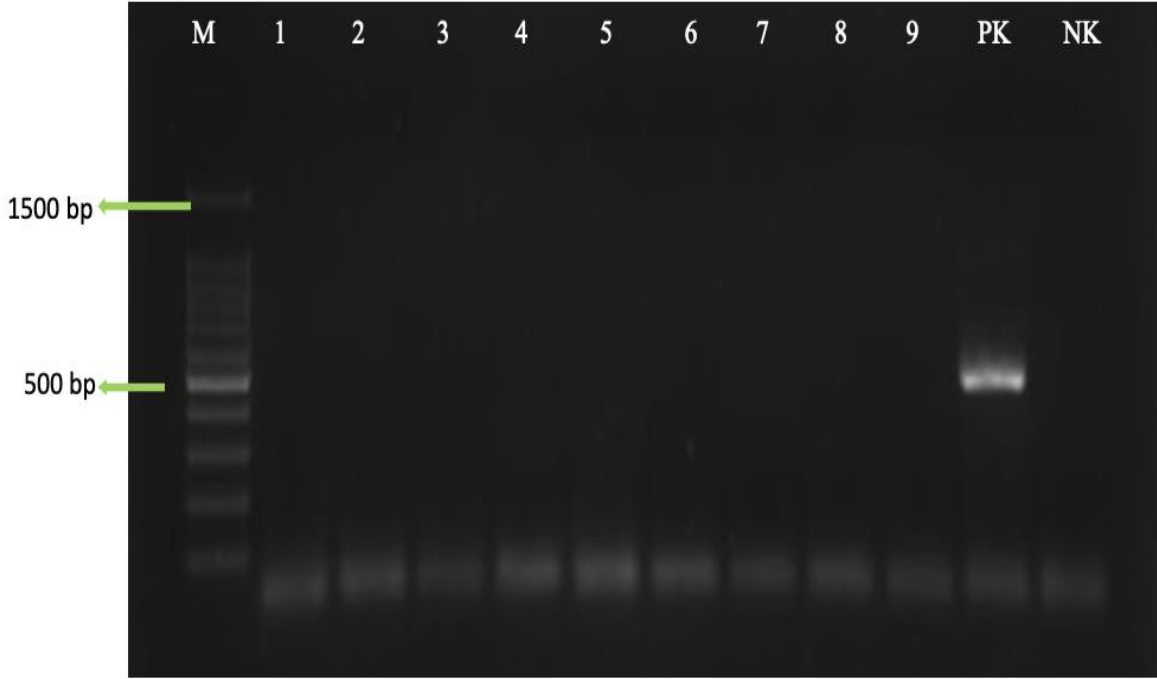
Reagen	Hacim (mikrolitre)
Su	28
10x PCR tamponu	5
MgCl ₂ 25 mM	4
dNTP karışımı 20 mM	0,5
Sea1-F 10 mMol	1
Sea2-R 10 mMol	1
Seb1-F 10 mMol	1
Seb2-R 10 mMol	1
Sec1-F 10 mMol	1
Sec2-R 10 mMol	1
Sed1-F 10 mMol	1
Sed2-R 10 mMol	1
See1-F 10 mMol	1
See2-R 10 mMol	1
HIBRIGEN 5 U/μl <i>Taq</i> DNA Polymerase	0,5
SCLB DNA Ekstrakt	2
TOPLAM	50

2. Amplifikasyon programı Tablo 12' de belirtilen şekilde uygulandı.

Tablo 12. Virülans Genlerin Tespiti için Amplifikasyon Programı

1. Basamak	2. Basamak	3. Basamak	Bekletme
94 °C 3 dk	94 °C 30 sn 55 °C 30 sn 72 °C 45 sn 40 döngü	72 °C 10 dk	8 °C ∞

3. Amplifikasyon ürünleri % 2'lik agaroz jelde 70 mA'de 45 dakika yürütüldü.
4. Jeldeki bantların UV ışık görüntüleri alındı ve moleküler ağırlık standardı ile karşılaştırılarak değerlendirildi (Şekil 11).



Şekil 13. 1-9 numaralı örneklerin Multipleks PCR görüntüsü

3.3.7. İstatistiksel analiz

Verilerin değerlendirilmesinde nitel değişkenler arasındaki dağılımsal farklılık Chi Square testi ve Fisher exact testi ile incelendi. İstatistik parametreleri sayı (n) ve oran (%) ile ifade edildi. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edildi. Verilerin değerlendirilmesinde IBM SPSS versiyon 22 programı ve Jamovi 2.3.16 programından yararlanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Test ve 16S rDNA Dizi Analizi Bulguları

Muhtemel *Staphylococcus* türüne ait kolonilere sırasıyla katalaz, Gram boyama ve koagülaz testi uygulanmıştır. Çiğ keçi sütlerinden izole ettiğimiz 16s rDNA pozitif 122 izolatın dizi analizi yöntemi ile tiplendirilmesi yapılmıştır.

Tablo 13. İzolatların biyokimyasal test ve 16S rDNA analiz sonuçları

Numune No	Biyokimyasal Test					16S rDNA Dizi Analizi Sonucu
	İzolat No	Katalaz	Gram Boyama	Koagülaz	Beta Hemoliz	
1	Üreme yok					
2		+	Gram (-) Basil			
3	S1	+	Gram (+) Kok	-	+	<i>S. borealis</i>
4	S2	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. succinus</i>
5	S3	+	Gram (+) Kok	-	+	<i>S. croceilyticus</i>
6	S4	+	Gram (+) Kok	+	+	<i>S. argenteus</i>
7	S5	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i>
	S6	+	Gram (+) Kok	-		<i>Micrococcus luteus</i>
8	S7	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. borealis</i>
	S8	+	Gram (+) Kok	-	+	<i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i>
9	S9	+	Gram (+) Kok	-	+	<i>S. borealis</i>
10	S10	+	Gram (+) Kok	+	+	<i>S. argenteus</i>
	S11	+	Gram (+) Kok	-	+	<i>S. chromogenes</i>
11	Üreme yok					
12	S12	+	Gram (+) Kok	-		<i>Mammaliococcus vitulinus</i>
		+	Gram (+) Basil	-		
		+	Gram (+) Basil	-		
13	S13	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. croceilyticus</i>
		+	Gram (-) Basil	-		
14		+	Gram (-) Kok	-		
15	Üreme yok					
16	S14	+	Gram (+) Kok	-		<i>Micrococcus luteus</i>
	S15	+	Gram (+) Kok	-		Tanımlanamadı.
17	S16	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. equorum</i> subsp. <i>equorum</i>
18	S17	+	Gram (+) Kok	-		<i>Micrococcus luteus</i>
19	S18	+	Gram (+) Kok	+	+	<i>S. argenteus</i>
	S19	+	Gram (+) Kok	-		Tanımlanamadı.
20		+	Gram (+) Basil	-		
21	S20	+	Gram (+) Kok	-	+	<i>S. petrasii</i> subsp. <i>petrasii</i>
	S21	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. chromogenes</i>
	S22	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. chromogenes</i>
22	S23	+	Gram (+) Kok	-		<i>Mammaliococcus sciuri</i>
23		+	Gram (-) Kok	-		
		+	Gram (-) Basil	-		
24	S24	+	Gram (+) Kok	-		<i>Mammaliococcus sciuri</i>
25	S25	+	Gram (+) Kok	-	+	<i>Micrococcus luteus</i>
	S26	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. chromogenes</i>
26		+	Gram (-) Basil	-		
27	Üreme yok					
28	S27	+	Gram (+) Kok	-		<i>Mammaliococcus sciuri</i>

29	Üreme yok					
30	S28	+	Gram (+) Kok	-		<i>Mammaliicoccus sciuri</i>
31	S29	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. caprae</i>
	S30	+	Gram (+) Kok	-		<i>Mammaliicoccus sciuri</i>
32		+	Gram (-) Kok	-		
33	S31	+	Gram (+) Kok	-	+	<i>S. chromogenes</i>
34	Üreme yok					
35	Üreme yok					
36	Üreme yok					
37	S32	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. chromogenes</i>
	S33	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. chromogenes</i>
38	S34	+	Gram (+) Kok	-		<i>Mammaliicoccus sciuri</i>
	S35	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. arlettae</i>
39	Üreme yok					
40	Üreme yok					
41	S36	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. aquorum</i> subsp. <i>equorum</i>
42	Üreme yok					
43	S37	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. caprae</i>
44	Üreme yok					
45	S38	+	Gram (+) Kok	-	+	<i>S. borealis</i>
	S39	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. caprae</i>
46	Üreme yok					
47	S40	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. equorum</i> subsp. <i>equorum</i>
48	S41	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. chromogenes</i>
49	Üreme yok					
50	Üreme yok					
51	S42	+	Gram (+) Kok	-	+	<i>S. petrasii</i> subsp. <i>petrasii</i>
	S43	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. chromogenes</i>
	S44	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. chromogenes</i>
52	S45	+	Gram (+) Kok	-	+	<i>S. caprae</i>
	S46		Gram (+) Kok	-		<i>S. chromogenes</i>
53	Üreme yok					
54	S47	+	Gram (+) Kok	+	+	<i>S. argenteus</i>
	S48	+	Gram (+) Kok	-	+	<i>S. petrasii</i> subsp. <i>petrasii</i>
	S49	+	Gram (+) Kok	-	+	<i>S. petrasii</i> subsp. <i>jettensis</i>
55	S50	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. auricularis</i>
56	Üreme yok					
57	Üreme yok					
58	Üreme yok					
59	Üreme yok					
60	S51	+	Gram (+) Kok	-	+	<i>S. petrasii</i> subsp. <i>petrasii</i>
61		+	Gram (-) Kok	-		
62	Üreme yok					
63	S52	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. auricularis</i>
	S53	+	Gram (+) Kok	-		Tanımlanamadı.
	S54	+	Gram (+) Kok	-	+	Tanımlanamadı.
64	S55	+	Gram (+) Kok	-	+	<i>S. petrasii</i> subsp. <i>petrasii</i>
65	S56	+	Gram (+) Kok	-	+	<i>S. petrasii</i> subsp. <i>petrasii</i>
	S57	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. chromogenes</i>
66	S58	+	Gram (+) Kok	-		Tanımlanamadı.
67	S59	+	Gram (+) Kok	-	+	<i>S. petrasii</i> subsp. <i>petrasii</i>
68	S60	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. chromogenes</i>
	S61	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. chromogenes</i>
69	S62	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. chromogenes</i>
70	S63	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. chromogenes</i>
71	S64	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. chromogenes</i>
	S65	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. chromogenes</i>
72	S66	+	Gram (+) Kok	-	+	<i>S. petrasii</i> subsp. <i>petrasii</i>
	S67	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. chromogenes</i>
73	S68	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. chromogenes</i>
	S69	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. chromogenes</i>
74	S70	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. chromogenes</i>
75	S71	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. chromogenes</i>
76	S72	+	Gram (+) Kok	-		Tanımlanamadı.

	S73	+	Gram (+) Kok	-		Tanımlanamadı.
77	S74	+	Gram (+) Kok	-	+	<i>S. petrasii</i> subsp. <i>petrasii</i>
78		+	Gram (-) Kok	-		
79	S75	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. chromogenes</i>
80	S76	+	Gram (+) Kok	-	+	<i>S. petrasii</i> subsp. <i>petrasii</i>
81		+	Gram (-) Kok	-		
82	S77	+	Gram (+) Kok	-	+	<i>S. petrasii</i> subsp. <i>petrasii</i>
83	S78	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. simulans</i>
84	S79	+	Gram (+) Kok	-	+	<i>S. petrasii</i> subsp. <i>petrasii</i>
	S80	+	Gram (+) Kok	-	+	<i>S. caprae</i>
	S81	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. chromogenes</i>
85	Üreme yok					
86	S82	+	Gram (+) Kok	-	+	<i>S. petrasii</i> subsp. <i>jettensis</i>
87	Üreme yok					
88	Üreme yok					
89	S83	+	Gram (+) Kok	-	+	<i>S. caprae</i>
	S84	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. chromogenes</i>
	S85	+	Gram (+) Kok	-	+	<i>S. heamoliticus</i>
90	S86	+	Gram (+) Kok	-	+	<i>S. caprae</i>
	S87	+	Gram (+) Kok	-	+	<i>S. caprae</i>
91	Üreme yok					
92	S88	+	Gram (+) Kok	-	+	<i>S. petrasii</i> subsp. <i>petrasii</i>
93	S89	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. warneri</i>
94	S90	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. chromogenes</i>
95	Üreme yok					
96	S91	+	Gram (+) Kok	-	+	<i>S. croceilyticus</i>
97	S92	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. chromogenes</i>
98	S93	+	Gram (+) Kok	-	+	<i>S. caprae</i>
	S94	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. chromogenes</i>
99	Üreme yok					
100	S95	+	Gram (+) Kok	-	+	<i>S. petrasii</i> subsp. <i>jettensis</i>
101	Üreme yok					
102	Üreme yok					
103		-	Gram (+) Kok	-		
104	S96	+	Gram (+) Kok	-	+	<i>S. auricularia</i>
105	S97	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. chromogenes</i>
106		-	Gram (+) Kok	-		
107		-	Gram (+) Kok	-		
108	Üreme yok					
109	Üreme yok					
110	S98	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. epidermidis</i>
111		+	Gram (-) Basil	-		
112		+	Gram (-) Basil	-		
	S99	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. chromogenes</i>
113	S100	+	Gram (+) Kok	-	+	<i>S. caprae</i>
114	S101	+	Gram (+) Kok	-	+	<i>S. caprae</i>
115	S102	+	Gram (+) Kok	-	+	<i>S. petrasii</i> subsp. <i>petrasii</i>
116	Üreme yok					
117	Üreme yok					
118	S103	+	Gram (+) Kok	-		Tanımlanamadı.
		+	Gram (+) Basil	-		
119	S104	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. chromogenes</i>
120		+	Gram (-) Basil	-		
		+	Gram (+) Basil	-		
121	Üreme yok					
122		+	Gram (-) Basil			
123	S105	+	Gram (+) Kok	-	+	<i>S. caprae</i>
	S106	+	Gram (+) Kok	-		<i>Micrococcus luteus</i>
124		+	Gram (-) Kok	-		
125	S107	+	Gram (+) Kok	-	+	Tanımlanamadı.
	S108	+	Gram (+) Kok	-		Tanımlanamadı.
	S109	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. chromogenes</i>
126	S110	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. chromogenes</i>
127	S111	+	Gram (+) Kok	-		Tanımlanamadı.

128	S112	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. chromogenes</i>
129	S113	+	Gram (+) Kok	-		Tanımlanamadı.
	S114	+	Gram (+) Kok	-		Tanımlanamadı.
130	S115	+	Gram (+) Kok	-	+	<i>S. lugdunensis</i>
	S116	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. auricularis</i>
	S117	+	Gram (+) Kok	+		<i>S. delphini</i>
131	S118	+	Gram (+) Kok	-		<i>S. chromogenes</i>
	S119	+	Gram (+) Kok	-	+	<i>S. lugdunensis</i>
	S120	+	Gram (+) Kok	-		Tanımlanamadı.
132	S121	+	Gram (+) Kok	-	+	Tanımlanamadı.
	S122	+	Gram (+) Kok	-	+	Tanımlanamadı.
133	Üreme yok					
134	Üreme yok					
135	Üreme yok					

Onbeş farklı koagülaz negatif ve iki farklı koagülaz pozitif stafilocok türü izole edildi. İzole edilen organizmalar arasında KNS en yaygın bakteri olarak saptandı (Tablo14). Koagülazdaki dağılımsal farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$).

Tablo 14. İzole edilen KNS ve KPS

KNS (Sayı)	KPS (Sayı)	p
<i>S. auricularis</i> (4)	<i>S. argenteus</i> (4)	
<i>S. arlettae</i> (1)	<i>S. delphini</i> (1)	
<i>S. borealis</i> (4)		
<i>S. caprae</i> (12)		
<i>S. chromogenes</i> (36)		
<i>S. croceilyticus</i> (3)		
<i>S. epidermidis</i> (1)		
<i>S. equorum</i> subsp. <i>equorum</i> (3)		
<i>S. heamolyticus</i> (1)		
<i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> (2)		$p<0,001$
<i>S. lugdunensis</i> (2)		
<i>S. petrasii</i> subsp. <i>petrasii</i> (14)		
<i>S. petrasii</i> subsp. <i>jettensis</i> (3)		
<i>S. simulans</i> (1)		
<i>S. succinus</i> (1)		
<i>S. warneri</i> (1)		
Toplam: 89	Toplam: 5	

4.2. Baird-Parker Agar'da Üreme

Çalışmadan önce *S. aureus*'un tanımlanmasında seçici besiyeri olarak Baird-Parker agarın kullanılması planlandı, ancak yapılan denemelerde diğer stafilocok türlerinden ayrımı sağlanamadığından kullanımından vazgeçildi (Şekil 13). Deneme çalışması Mikrobiyoloji

Laboratuvarı'nda rutin uygulamadan izole edilen ve BD Phoenix otomatik identifikasyon sisteminde tanımlanan stafilocok suşları ile yapılmıştır.



Şekil 14. *Staphylococcus* türlerinin Baird-Parker agarda koloni görüntüleri

4.3. Multipleks PCR ile stafilocokal virölans genlerinin saptanması

Multipleks PCR analizi sonucunda incelenen 135 örneğin hiçbirinde stafilocokal virölans geni (SEA, SEB, SEC, SED ve SEE) varlığı saptanmamıştır.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, Kahramanmaraş ilindeki farklı firma ve mandıralardan temin edilen çiğ keçi sütü örneklerinde stafilocok türlerinin izolasyonu ve elde edilen stafilocok izolatlarında virülans faktörlerinin varlığının moleküler yöntemle tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Süt, yaşamın her döneminde gerek duyulan mikro ve makro besin öğelerini içeren bir gıda maddesidir. Beslenme uzmanlarına göre süt ve süt ürünleri sağlıklı ve dengeli bir diyetin önemli bir parçasıdır (1,96). Süt aynı zamanda mikroorganizmaların kolayca gelişebileceği pH değerlerinde (6,4-6,8 pH) olması ve yapısal olarak önemli bileşikler içermesi nedeniyle mikroorganizmaların gelişimi için ideal bir üreme ortamı oluşturmaktadır. Sağım koşulları, depolama ve süte uygulanan işlemler sonucunda sütte mikrobiyal kontaminasyon gelişebilir. Kontaminasyon sonucunda mikroorganizma tehlikeli sayılara ulaşarak insanlarda çeşitli enfeksiyon ve gıda zehirlenmelerine neden olmaktadır.

Staphylococcus spp. çeşitli enfeksiyonlara ve gıda kaynaklı zehirlenmelere neden olabilen halk sağlığı açısından önemli mikroorganizmalardır. Koagülaz pozitif olan *Staphylococcus aureus*, süt ve süt ürünlerinde sıklıkla görülen ve dünya çapında gıda kaynaklı zehirlenmelere yol açan bir patojendir. Koagülaz negatif stafilocoklar uzun süredir kommensal ve kontaminant bakteriler olarak değerlendirilmesine karşın, insanlarda patojenik etkilerinin olduğu ve çeşitli enfeksiyonlara sebep oldukları bilinmektedir. KNS içerisinde en sık izole edilen türler *S. epidermidis*, *S. xylosus*, *S. chromogenes* ve *S. simulans*'tır. Bu türlerin dışında *S. caprae*, keçilerde yaygın olarak bulunan türdür. *S. aureus* özellikle klinik ve/veya subklinik mastitli hayvanlardan sağılan sütler enteropatojenik stafilocok suşlarının önemli kaynağını oluşturmaktadır (97, 98) Günümüzde *S. hyicus* ve *S. intermedius* gibi diğer koagülaz pozitif stafilocokların (KPS) ve az da olsa *Staphylococcus epidermidis* ve *Staphylococcus xylosus* gibi koagülaz negatif stafilocokların (KNS) enterotoksin ürettiği belirlenmiştir (99).

Bakteriler; mikroskopi, belirli besiyerlerinde üreme, biyokimyasal ve serolojik testler, antibiyotik duyarlılık testleri gibi geleneksel mikrobiyoloji yöntemleri kullanılarak sınıflandırılabilir. Son yıllarda, moleküler mikrobiyoloji yöntemleri bakteriyel tanımlamada devrim yaratmıştır. 16S ribozomal DNA (rDNA) gen dizilemesi popüler bir yöntemdir. Bu yöntem geleneksel yöntemlerden daha hızlı ve daha doğru olmakla kalmayıp, aynı zamanda laboratuvar koşullarında yetiştirilmesi zor olan suşların tanımlanmasına da

olanak sağlamaktadır. Ayrıca, suşların moleküler düzeyde farklılık göstermesi, fenotipik olarak aynı bakteriler arasında ayırım yapılmasını sağlamaktadır.

16S rRNA, kompleks protein bir yapı ile birleşerek bakteriyel ribozomun 30S alt birimini oluşturmaktadır. Ribozomun oluşumundaki temel işlevi nedeniyle tüm bakterilerde mevcut olan ve yüksek oranda korunan 16S rDNA geni tarafından kodlanmaktadır, aynı zamanda belirli türler için parmak izi görevi görebilecek değişken bölgeler de içermektedir. Bu özellikleri nedeniyle 16S rDNA geni, bakterilerin tanımlanması, karşılaştırılması ve filogenetik sınıflandırılmasında kullanılmaktadır (100).

Bakteri ve arkeler için 16S rDNA gen dizilerinin tip suşlarının çoğu Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) gibi halka açık veritabanlarında mevcuttur. Ancak, bu veritabanlarında bulunan dizilerin kalitesi genellikle doğrulanmamaktadır. Bu nedenle, yalnızca 16S rDNA dizilerini toplayan ikincil veritabanları yaygın olarak kullanılmaktadır (101). Bu nedenle çalışmamızda stafilocok izolatlarımızın tiplendirilmesi için EzBioCloud veritabanı tercih edilmiştir.

Araştırmamız sonucunda izole edilen stafilocok türleri, genel olarak koagülaz negatif karakterde olup *S. chromogenes* (36), *S. petrasii* subsp. *petrasii* (14), *S. caprae* (12), *S. borealis* (4), *S. auricularis* (4), *S. croceilyticus* (3), *S. equorum* subsp. *equorum* (3), *S. petrasii* subsp. *jettensis* (3), *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* (2), *S. lugdunensis* (2), *S. epidermidis* (1), *S. succinus* (1), *S. warneri* (1), *S. arlettae* (1), *S. simulans* (1), *S. heamolyticus* (1) olarak belirlenmiştir (toplam 89 izolat). Koagülaz pozitif stafilocok türleri olarak *S. argenteus* (4) ve *S. delphini* (1) izole edilmiştir (toplam 5 izolat). *S. argenteus*, fenotipik ve genotipik olarak *S. aureus*'la benzerlik gösteren, yeni tanımlanmış koagülaz pozitif bir stafilocok türüdür. Stafiloksantin eksikliği olan *S. argenteus*, *S. aureus* gibi besiyerinde karakteristik altın rengi göstermez. Tayvan'dan bir grup ClinProTools yazılımı kullanarak MALDI-TOF MS yöntemi ile *S. argenteus*'u *S. aureus*'tan başarıyla ayırdığını bildirmiştir. MALDI-TOF MS yönteminin yanısıra tanımlama için *S. argenteus*'ta 60 aminoasitlik kısmı eksik nonribozomal peptid sentaz genini hedefleyen PCR yöntemi bu iki türün ayrımını yapmada başarılı bulunmuştur. Japonya'da *S. argenteus* enterotoksinlerinin neden olduğu besin zehirlenmesi vakaları bildirilmiştir. Yapılan *in vitro* bir çalışmada *S. argenteus*'un sitotoksik alfa hemolizin toksini *S. aureus*'tan daha yüksek virülans göstermiştir (102). Çalışmamızda izole edilen *S. argenteus* izolatlarında enterotoksin A-E saptanmamıştır. Çalışmamızda stafilocok izolatlarında enterotoksin geni saptanmasında konvansiyonel multipleks PCR kullanılmıştır. Çalışma öncesi yapılan güç analizinde minimum örnek sayısı 135 olarak belirlenmiştir. Erişilebilen yayınlarda gerçek zamanlı PCR yöntemi, tekli/her bir

toksin için ayrı ya da internal kontrol dahil edildiğinde en az üç ayrı tüpte test edilmesi gereken multipleks PCR olarak kurgulanmış olduğundan ekonomik nedenle bu yöntemin kullanılmasından vazgeçilmiştir.

Stafilokok türleri dışında *Staphylococcaceae* ailesine ait *Mammaliicoccus sciuri* (6), *Mammaliicoccus vitulinus* (1) ve *Micrococcus luteus* (5) türleri de izole edilmiştir. Bu çalışmada farklı türde koagülaz negatif stafilokok izole edilmesinin sebebinin, keçilerin genel olarak hijyenik olmayan çevre koşullarında barındırılması olabileceği düşünülmektedir.

Çiğ keçi sütlerinde yapılan çalışmalarda *Staphylococcus* türleri açısından farklı izolasyon oranları bildirilmiştir. Bu çalışmada 135 süt örneğinin 98'inde (% 72,5) 122 bakteri izolatu elde edilmiştir. Bu 122 izolatu 94'ü (% 77) *Staphylococcus* türü olarak belirlenmiştir. Geriye kalan 16 izolat tanımlanamamış ve 37 örnekte ise bakteriyel üreme görülmemiştir. Ayrıca izole edilen organizmalar arasında KNS en yaygın bakteri olarak saptanmıştır. Benzer şekilde Bochev ve ark. (2005) Bulgaristan'da yaptıkları çalışmada 96 çiğ keçi sütü örneğinin % 19,8'inin *S. aureus* (19 adet) ve % 80,2'sinin KNS (77 adet) ile kontamine olduğunu bulmuşlardır (103).

Alian ve ark. (2012) İran'ın çeşitli eyaletlerinde rastgele seçilen sürülerden 80 çiğ keçi sütü örneği toplayarak yaptıkları çalışmada 5 örnekte (% 6,3) *S. aureus* izole etmişlerdir (104).

Qian ve ark. (2019) Çin'de yaptıkları çalışmada 289 çiğ keçi sütü örneğinden 68'inin (% 23,5) koagülaz pozitif *S. aureus* içerdiğini belirtmişlerdir (105).

Coimbra-e-Souza ve ark. (2019) Brezilya'da 176 çiğ keçi sütü örneği ile yaptıkları çalışmada sekiz farklı *Staphylococcus* türü tanımlamışlardır. Sıklık sırasıyla; *S. epidermidis* (15/51, % 29) ve ardından *S. lugdunensis* (11/51, % 22), *S. aureus* (7/51, % 14), *S. simulans* (6/51, % 12), *S. caprae* (3/51, % 6), *S. capitis* (2/51, % 4) ve *S. pausteri* (1/51, % 2) tespit etmişlerdir (106).

Diğer bir çalışmada Chai ve ark. (2020), Malezya'da 332 emziren keçiden toplam 664 (sol ve sağ meme) keçi sütü örneğinin 198'inde (% 29,8) *S. aureus* saptamışlardır (107).

Silva Junior ve ark. (2021) Brezilya'da yaptıkları bir araştırmada 510 adet çiğ keçi sütü örneğinin 98'i (% 22,6) *S. aureus* ve 71'i *S. epidermidis* olmak üzere toplam 161 (% 37,1) KPS ve 273 (% 62,9) KNS içerdiğini gözlemlemişlerdir. En çok izole edilen *S. aureus* ve *S. epidermidis* dışında 22 örnekte *S. hyicus* (% 5,1), 41 örnekte *S. intermedius* (% 9,4), 46 örnekte *S. simulans* (% 10,6), 32 örnekte *S. haemolyticus* (% 7,4), 14 örnekte *S. hominis* subsp. *hominis* (% 3,2), 10 örnekte *S. saprophyticus* (% 2,3), 16 örnekte *S. lugdunensis* (% 3,2) olarak saptanmıştır.

3,7), 21 örnekte *S. sciuri* (% 4,8), 21 örnekte *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* (% 4,8), 7 örnekte *S. cohnii* subsp. *cohnii* (% 1,6), 16 örnekte *S. xylosus* (% 3,7), 9 örnekte *S. auricularis* (% 2,1), 9 örnekte *S. warneri* (% 2,1) ve 1 örnekte *S. cohnii* subsp. *urealyticum* (% 0,2) olmak üzere 3 farklı KPS ve 13 farklı KNS içerdiğini belirtmişlerdir (108).

Yapılan çalışmalar incelendiğinde genel olarak çiğ süt örneklerinde yüksek oranlarda *Staphylococcus* türlerinin izole edilebilebildiği görülmektedir. Araştırmamızda 15 farklı KNS ve 2 farklı KPS tür tanımlanmıştır. Bu çalışmada tespit edilen *Staphylococcus* türleri mevcut çalışmalar ile benzerlik göstermektedir. *Staphylococcus* türlerinin farklılığı hayvanın türü, coğrafya, süt sağım-işleme koşulları ve kontaminasyon noktalarının farklılıkları ile açıklanabilir.

Enterotoksijenik stafilokokların besin maddesinde 10^6 veya daha fazla kob/g düzeylerine ulaşmış olması enterotoksin üretmek için yeterli bir miktar olarak kabul edilir ve genellikle gıda kaynaklı zehirlenmeye neden olur. İntoksikasyonun klinik belirtilerinin görülmesi için 100 gr gıda içerisinde en az 100 ng stafilokokal enterotoksin içermesi gerektiği bildirilmektedir. Toksinlerin oluşumunda suşun tipi, gıdanın yapısı ve bileşimi, sıcaklık, diğer fiziksel ve kimyasal parametreler ile inhibitörlerin varlığı rol oynar (8,37). Çiğ keçi sütleri ile yapılan çalışmalarda farklı düzeylerde enterotoksin varlığı bildirilmiştir.

Valle ve ark. (1990) yaptıkları çalışmada sağlıklı keçilerden izole ettikleri 70 KPS ve 272 KNS olmak üzere toplamda 342 stafilokok izolatu elde etmişlerdir. Çalışmada kullanılan 133 adet keçinin 17'sinin sütünde SEA, SEB ve SEC tespit etmişler ve izolatların en çok SEC yönünden pozitif olduğunu bildirmişlerdir (109).

Rahimi ve ark. (2013) İran'da 50 inek, 40 koyun, 40 keçi, 30 deve ve 40 manda olmak üzere toplamda 200 çiğ süt numunesinden elde ettikleri 22 *S. aureus* suşunun 15 tanesinin enterotoksijenik olduğunu bildirmişlerdir. 40 keçi sütü örneğinin 3'ünde *S. aureus* pozitifliği ve 2'sinde SEC toksini tespit edildiğini belirtmişlerdir. En yüksek *S. aureus* prevalansının manda sütünde (% 17,5) bulunduğunu ve bu sırayı inek (% 16,0), koyun (% 10,0), keçi (% 7,5) ve deve sütünün (%3,4) izlediğini belirlemişlerdir. Numunelerdeki SE'lerin 6'sının (% 27,3) SEA, 4'ünün (18,2) SEC, 3'ünün (% 13,6) SED, 1'inin (% 5,0) SEB ve 1'inin hem SEA hem SEC olduğunu saptamışlardır (110).

Cavicchioli ve ark. (2015) Brezilya'da inceledikleri 53 çiğ keçi sütü örneğinin hepsinde *Staphylococcus* spp. üremesi tespit etmişler ancak bunların 48'inin enterotoksijenik olduğu ve en çok SEC toksini yönünden pozitif olduğunu saptamışlardır (111).

Omwenga ve ark. (2019) Kenya’da toplamda 603 çiğ süt numunesi olmak üzere 57 sığır, 346 keçi, 8 koyun, 4 deve ve 188 havuzlanmış süt kullanmışlardır. Toplanan süt numunelerin 85’inde enterotoksik genler barındıran potansiyel olarak patojenik *S. aureus* tespit etmişlerdir. En sık karşılaşılan gen SEE olup bunu SEA ve SEC izlemiş olup SED genini hiç tespit etmemişlerdir (112).

Widianingrum ve ark. (2021) Endonezya’da 46 inek ve 29 keçi olmak üzere toplam 75 sütte *S. aureus* izole etmişlerdir. SEH genini 21 inek sütü örneğinde izole ederek en sık gözlenen gen olduğunu tespit etmişlerdir. SEH geni dışında SEA (8 izolatta), SEG ve SEI (her biri 4 izolatta) genlerini izole etmişlerdir. Keçi sütü örneklerinin 2’sinin enterotoksijenik *S. aureus* içerdiğini ve bunların da SEC pozitif olduğunu saptamışlardır (113).

Ülkemizde ise Bilgin ve ark. (2022) yaptıkları çalışmada 50 çiğ keçi sütü örneğinin 5’inde, 25 keçi kreması örneğinin 2’sinde ve 25 keçi peyniri örneğinin 6’sında olmak üzere toplam 100 örneğin 13’ünün enterotoksijenik *S. aureus* içerdiğini belirtmişlerdir. 13 suşun SEA, 9 suşun SEC, 8 suşun SED ve 2 suşun SEB yönünden pozitif olduğu bildirilmiştir (114).

Günday (2017) Aydın’da yapmış olduğu araştırmada toplam 86 adet çiğ süt örneğini stafilokokal enterotoksin yönünden analiz etmiş ve örneklerin hiçbirinde stafilokokal enterotoksin saptamamışlardır (115).

Çalışmamızda toplanan 135 çiğ keçi sütü örneğinin hiçbirinde stafilokokal virülans geni (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* ve *see*) varlığına rastlanmamıştır. Örneklerin hiçbirinde insanda patojen olarak sık karşılaşılan *S. aureus* gibi stafilokok türlerinin saptanmaması veya düşük oranda saptanması, çalışmada saptanan türlerin keçi sütünün normal florasını yansıttığını düşündürmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda çiğ keçi sütü örneklerinin hiçbirinde stafilokokal enterotoksin varlığına rastlanmamakla birlikte *Staphylococcus* türlerinin yüksek oranda izole edildiği görülmektedir. Günümüzde yoğun olarak tüketilen süt ve süt ürünleri yüksek besin içeriği nedeniyle mikroorganizma ile kontaminasyona maruz kalarak insan sağlığı için zararlı olabilmektedir. Bu nedenle üretimin her aşamasında hijyen kurallarına uyulması ve sürekli kontrol ile stafilokoklar yanısıra diğer etkenlerin de bulaşmasının önüne geçeceği düşünülmektedir.



7. KAYNAKLAR

1. Mert İ, Artık N, Dellal G, Şireli UT. Süt kalitesi ve süt-sağlık ilişkisi. Ulusal Süt Konseyi, Ankara, 2020.
2. Çiğ Sütün Arzına Dair Tebliğ. Tebliğ No: 2017/20 Resmi Gazete, Sayı 30050, Ankara, 2017.
3. Hayvansal Gıdalar için Özel Hijyan Kuralları Yönetmeliği. Resmi Gazete, Sayı 28155, Ankara, 2011.
4. Bhattarai RR. Importance of goat milk. Journal of Food Science and Technology 2012; 7: 107-111.
5. Lad SS, Aparnathi KD, Mehta B, Velpula S. Goat milk in human nutrition and health-A Review. Int J Curr Microbiol App Sci 2017; 6(5): 1781-1792.
6. Telli EA, Doğruer Y. Keçi sütünde biyoaktif bileşenler. Animal Health Prod and Hyg 2014; 3(1): 264-271.
7. Önür ZY. Keçi ve koyun sütlerinin kimyasal bileşimleri. GIDA 2015; 40(6): 363-370.
8. Çakıcı N, Demirel Zorba NN, Akçalı A. Gıda endüstrisi çalışanları ve stafilocokal gıda zehirlenmeleri. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi 2015; 72(4): 337-350.
9. Yerlikaya O, Kınık Ö. Gıda güvenliği ve insan sağlığı açısından çiğ ve ısıtılmış içme sütü tüketimi. Gıda ve Yem Bilimi-Teknoloji Dergisi 2019; 22(2): 1-10.
10. Yıldırım T, Sırken B, Yavuz C. Çiğ süt ve peynirlerde koagülaz pozitif stafilocoklar. Vet Hekim Der Derg 2016; 87 (2): 3-12.
11. Ünal RN, Besler T. Beslenmede sütün önemi. s. 8-18, 2. Basım, Sağlık Bakanlığı Yayın No 727, Ankara, 2012.
12. Kılıç S. Süt Mikrobiyolojisi. s. 68-79, Sidas Yayınları, İzmir, 2010.
13. Baysal A. Beslenme. s. 294-300, 16. Basım, Hatiboğlu Yayınevi, Ankara, 2015.
14. Akal C, Yetişemiyen A. Probiyotik ve prebiyotik tüketiminin laktoz intoleransı üzerine etkileri. GIDA 2020; 45 (2): 380-389.

15. Gbadamonsi AA, Ahmed AS, Saloum Cisse A, Seidouy AFH, Taşkın T, Engindeniz S ve ark. Süt tüketiminde laktoz duyarlılığının (İntolerans) analizi: İzmir ili bornova ilçesi örneği. J Anim Prod 2020; 61 (2): 127-134.
16. Pamuk Ş. Koyun ve keçi sütü. Atasever M, editör. Süt ve Süt Ürünleri. s. 44-51, 1. Baskı, Ankara: Türkiye Klinikleri, 2019.
17. DüNDAR S, KÜÇÜKERSAN S. Ruminantlarda beslenmenin süt verimi ve kalitesi üzerine etkisi. Akademik Et ve Süt Kurumu Dergisi 2021; 2: 57-70.
18. Özdemir MB, Acar Tek N. Bileşimi ve sağlık üzerine etkileri açısından; eşek ve keçi sütü. ACU Sağlık Bil Derg 2015; 6 (4): 189-193.
19. Gürler H, Çiftçi G, Salar S, Baştan A. Subklinik mastitis'in Anadolu mandalarının süt kompozisyonundaki bazı biyokimyasal parametrelere etkisi. Etlik Vet Mikrobiyol Derg 2018; 29 (2): 151-156.
20. Arslaner A, Salık MA. Sütün fonksiyonel nitelikli biyoaktif bileşenleri. Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 2019; 12 (1): 124-135.
21. Gür F, Güzel M, Öncül N, Yıldırım Z, Yıldırım M. Süt serum proteinleri ve türevlerinin biyolojik ve fizyolojik aktiviteleri. Akademik Gıda 2010; 8 (1): 23-31.
22. Kınık Ö, Gürsoy O. Süt proteinleri kaynaklı biyoaktif peptitler. Mühendislik Bilimleri Dergisi 2002; 8 (2): 195-203.
23. Koçak A, Şanlı T. Süt proteini kaynaklı ACE-Inhibitör peptitleri: oluşumu, etki mekanizması ve biyoyararlılıkları. GIDA 2016; 41 (4): 275-282.
24. Öner Y, Elmacı C. Keçilerde süt proteinleri polimorfizmi. Hayvansal Üretim 2007; 48 (2): 49-54.
25. Erkaya T, Şengül M. İnek sütü alerjenleri ve kontrol yöntemleri. Akademik Gıda 2012; 10 (1): 114-124.
26. Cesur RP. Çocuklarda inek sütü proteini alerjisi. TOGÜ Sağlık Bilimleri Dergisi 2022; 2 (2): 314-322.
27. Edebalı E, Özdemir S, Özdemir C. Süt ve süt ürünlerinde bulunan biyoaktif peptitler ve insan sağlığı üzerine etkileri. Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 2021; 11 (1): 268-280.

28. Bulca S, Güvenç B. Süt ve süt ürünlerinde bulunan biyoaktif peptitler, antimikrobiyal özellikleri ve insan sağlığı üzerine etkileri. Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi 2020; 8 (1): 158-164.
29. Altun D, Sarıcı SÜ. Keçi Sütü: bebek beslenmesinde ilk tercih mi olmalı. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi 2017; 60 (1): 22-33.
30. Ünal G, Akalın SA. Süt proteini kaynaklı peptidlerin antibakteriyel aktivitesi. Türkiye 10. Gıda Kongresi, s. 753-754, Erzurum, 21-23 Mayıs 2008.
31. Yılmaz B, Tosun H. Sütte bulunan doğal antimikrobiyal sistemler ve bunların gıda sanayinde kullanımı. Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi 2012; 8(1): 11-20.
32. Nalbant D, Karagül Yüceer Y. İnek ve keçi sütü kullanılarak üretilen probiyotik fermente süt ürünlerinin karakteristik özellikleri. GIDA 2020; 45 (2): 315-328.
33. Coşkun H, Öndül E. Keçi sütü ve insan beslenmesindeki önemi. GIDA 2004; 29 (6): 411-418.
34. Usta B, Yılmaz Ersan L. Sütün antioksidan enzimleri ve biyolojik etkileri. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 2013; 27 (2): 123-130.
35. Ergin Eğritağ H, Şahin İN, Çolakoğlu E, Telli AE. Farklı hayvan türlerinden elde edilen sütlerin total antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2018; 3 (2): 102-105.
36. Sezener MG, Fındık A, Ergüden VE, Akgöz S, Gülhan T, Çiftçi A. Mastitis izolatu *Staphylococcus aureus* suşlarında antibiyotik dirençliliğinin ve bazı virülens genlerinin araştırılması. Anadolu Çevre ve Hayvancılık Bilimleri Dergisi 2019; 4 (2): 182-187.
37. Erol İ. Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi. s. 157-167, 2. Basım, Ankara Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara, 2022.
38. Yüksekdağ ZN, Baltacı N. *Staphylococcus aureus* türlerinde biyofilm ve biyofilm oluşumundan sorumlu genler. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2013; 43 (3): 77-83.
39. Adesanwo VA, Adejuwon AO, Bamkefa BA, Umezurike ET, Oluwale ME, Odeleye OD. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from selected individuals in lead City University, Ibadan, Nigeria. World Rural Observations 2018; 10 (1): 61-68.
40. Chakma V, Barman DN, Das SC, Hossain A, Momin MB, Tasneem M, Gupta SD. In silico analysis of a novel hypothetical protein (YP_498675.1) from *Staphylococcus*

- aureus* unravels the protein of tryptophan synthase beta superfamily (Try-synth-beta_II). Journal of Genetic Engineering and Biotechnology 2023; 21(1): 1-14.
41. Elçi SD. Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları ve Pulsed Field Jel Elektroforez Yöntemi ile tiplendirilmeleri. Ankara Ecz Fak Derg 2018; 42 (2): 1-14.
 42. Akyol AD. Yoğun bakımda stafilokok enfeksiyonları ve kontrol önlemleri. Yoğun Bakım Hemşireliği Dergisi 2006; 10 (1-2): 26-35.
 43. Pal M, Shuramo MY, Tewari A, Srivastava JP, Steinmetz CHD. *Staphylococcus aureus* from a commensal to zoonotic pathogen: a critical appraisal. International Journal of Clinical and Experimental Medicine Research 2023; 7(2): 220-228.
 44. Skovdal SM, Jorgensen NP, Meyer RL. Rifampicin-containing combinations are superior to combinations of vancomycin, linezolid and daptomycin against *Staphylococcus aureus* biofilm infection in vivo and in vitro. Journal of Medical Microbiology 2022; 71: 1-5.
 45. Bonar E, Miedzobrodzki J, Wladyka B. The staphylococcal coagulases. Ed: Savini V, Pet-to-Man Travelling Staphylococci: A World in Progress. pp. 95-102, Elsevier, Poland, 2018.
 46. Kadariya J, Smith TC, Thapaliya D. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: An Ongoing Challenge in Public Health. BioMed Research International 2014; 2014(1): 1-9.
 47. Rajkovic A. *Staphylococcus*: food poisoning. Ed: Caballero B, Finglas PM, Toldra F. Encyclopedia of Food and Health, Elsevier, pp. 133-139, Amsterdam, 2016.
 48. Bergdoll MS, Wong ACL. Staphylococcal intoxications. Ed: Riemann HP, Cliver DO. 3th Edition, Foodborne Infections and Intoxications. pp.523-552, Elsevier, California, 2006.
 49. Oruç O, Seyfettin İ, Çömlekçioğlu N, Aygan A. Yatan hastaların kan örneklerinden izole edilen *Staphylococcus* spp. bakterilerin antibiyotik dirençliliği. Van Sag Bil Derg 2021; 14 (2): 144-152.
 50. Fontana C, Favaro M. Coagulase-positive and coagulase-negative staphylococci in human disease. Ed: Savini V, Pet-to-Man Travelling Staphylococci: A World in Progress. pp. 25-42, Elsevier, Poland, 2018.

51. Todar's Online Textbook of Bacteriology, 2005, <http://textbookofbacteriology.net> Erişim tarihi 12.05.2023.
52. Tünger A. *Staphylococcus aureus*: mikrobiyoloji, patogenezi ve epidemiyoloji. Ed: Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. 2. Baskı, Gram-Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. s. 1-18, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2012.
53. Dündar D. Stafilocoklar. Ed: Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi: Sistemlere Göre Enfeksiyonlar. s. 1804-1813, 4. Basım, Nobel Tıp Kitabevleri, 2017.
54. Bilgehan H. Gram olumlu koklar. Klinik Mikrobiyoloji Tanı. s. 495-506, 5. Basım, Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, İzmir, 2009.
55. Gherardi G, Bonaventura GD, Savini V. Staphylococcal taxonomy. Ed: Savini V, Petto-Man Travelling Staphylococci: A World in Progress. pp. 1-6, Elsevier, Poland, 2018.
56. Gülhan T, Boynukara B. Stafilocokkal toksin ve enzimler. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 1997; 3 (1): 82-90.
57. Kasproicz A, Bialecka A, Bialecka J. Diagnostics: routine identification on standard and chromogenic media, and advanced automated methods. Ed: Savini V, Petto-Man Travelling Staphylococci: A World in Progress. pp. 185-198, Elsevier, Poland, 2018.
58. Peacock S. *Staphylococcus aureus*. Ed: Gillespie SH, Hawkey PM. Principles and Practice of Clinical Bacteriology. pp. 41-58, John Wiley & Sons Ltd, England, 2006.
59. Winn WC, Allen SD, Hall GS. Medical bacteriology: taxonomy, morphology, physiology, and virulence. Ed: Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PG, Woods GL. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. pp. 501-585, Wolters Kluwer, China, 2017.
60. Ünal S, Yazgan Aksoy D. *Staphylococcus aureus*: direnç mekanizması. Ed: Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. Gram-Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. s. 20-40 , 2. Basım, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2012.
61. Gülay Z. Hücre duvar sentezini etkileyen antibakteriyeller. ANKEM Derg 2003; 17 (3): 192-204.

62. Giesbrecht P, Kersten T, Maidhof H, Wecke J. Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1998; 62(4): 1371-1414.
63. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Tıbbi Mikrobiyoloji (Çev: Başustaoğlu AC, Yıldırım ŞT, Tanyüksel M, Yapar M). s. 209-223, 6. Basım, Atlas Kitapçılık, Ankara, 2010.
64. Arabacı Ç, Ak K. Gram boyama ve metilen boyama. Ed: Dal T, Yanılmaz Ö, Cevahir N, Batirel S. *Güncel Laboratuvar Tıbbı*. s. 57-63, İstanbul Tıp Kitabevi, İstanbul, 2021.
65. Winn WC, Allen SD, Hall GS. Gram-positive cocci. Ed: Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PG, Woods GL. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. pp. 670-732, Wolters Kluwer, China, 2017.
66. Watts A, Ke D, Wang Q, Pillay A, Nicholson-Weller A, Lee JC. *Staphylococcus aureus* strains that express serotype 5 or serotype 8 capsular polysaccharides differ in virulence. *Infection and Immunity* 2005; 73(6): 3502-3511.
67. O'Riordan K, Lee JC. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clinical Microbiology Reviews* 2004; 17(1): 218-234.
68. Dıanı M, Ariafar MN, Akçelik N. İnsan ve hayvan sağlığı açısından risk oluşturan enterokokal biyofilm yapısının doğası. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 2016; 73(1): 71-80.
69. Cengiz SA, Us E, Cengiz AT. *Slime* faktörünün klinikteki yeri ve önemi. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2006; 13(3): 193-197.
70. Rozalska B, Sadowska B. In vivo resistance mechanisms: staphylococcal biofilms. Ed: Savini V, Pet-to-Man Travelling Staphylococci: A World in Progress. pp. 237-251, Elsevier, Poland, 2018.
71. Çelik İ, Cihangiroğlu M, Sevim E, Çabalak M, Akbulut A. Sağlık çalışanlarının burunlarından izole edilen koagülaz pozitif ve negatif stafilokoklarda metisilin direnci ve *slime* pozitifliği. *Fırat Tıp Dergisi* 2005; 10 (3): 123-126.
72. Bahar G. Biofilmler, tolerans ve antimikrobiyal direnç. *Mikrobiyol Bült* 2002; 36: 343-351.

73. Levinson W, Chin-Hong P, Joyce EA, Nussbaum J, Schwartz B. Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmünoloji (Çev. Şener B, Esen B) 14. Baskı, s. 109-127, Güneş Kitabevi, Ankara, 2018.
74. González-Martín M, Corbera JA, Suárez-Bonnet A, Tejedor-Junco MT. Virulence factors in coagulase-positive staphylococci of veterinary interest other than *Staphylococcus aureus*. Vet Q. 2020; 40(1): 118–131. doi: 10.1080/01652176.2020.1748253).
75. Mandell GL, Catalase, superoxide dismutase, and virulence of *Staphylococcus aureus*. The Journal of Clinical Investigation 1975; 55(3): 561-566.
76. Keskin A, Koluman A. Hidrojen peroksit dekontaminasyon etkinliğinin belirlenmesine yönelik mikrofluidik katalaz biyosensörü: mikrobiyal optimizasyon. Etlik Vet Mikrobiyol Derg 2021; 32(2): 157-163.
77. Martinez-Pulgarin S, Dominguez-Bernal G, Orden JA, Fuente R. Simultaneous lack of catalase and beta-toxin in *Staphylococcus aureus* leads to increased intracellular survival in macrophages and epithelial cells and to attenuated virulence in murine and ovine models. Microbiology 2009; 155: 1505-1515.
78. Doğan B, Palaz M, İzgür M. Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* ve önemi. Etlik Vet Mikrobiyol Derg 2018; 29(2): 157-161.
79. Tunalı Y, Karaca H, Öztürk Y, Korkmaz S. Yeni beta-laktamaz inhibitörlerinin araştırılması. Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi 2009; 10(2): 565-575.
80. Gündoğan N, Ataol Ö. Et örneklerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* ve koagülaz negatif stafilokokların biyofilm üretimi ve DNaz aktivitelerinin belirlenmesi. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi 2012; 69(3): 135-142.
81. Yılmaz S, Kılıç A, Karagöz A, Bedir O, Üsküdar Güçlü A, Başustaoğlu AC. Hastane ve toplum kaynaklı *Staphylococcus aureus* izolatlarında çeşitli virülans faktörlerinin gerçek zamanlı PCR yöntemiyle araştırılması. Mikrobiyol Bul 2012; 46(4): 532-545.
82. Pontieri E. The staphylococcal hemolysins. Ed: Savini V, Pet-to-Man Travelling Staphylococci: A World in Progress. pp. 103-112, Elsevier, Poland, 2018.
83. Müştak HK, Esenal ÖM. *Staphylococcus aureus* ekzotoksinleri. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Derg 2008; 19: 69-74.

84. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clinical Microbiology Reviews 2000; 13(1): 16-34.
85. Prevost G, Cribier B, Couppie P, Petiau P, Supersac G, Finck-Barbançon V, Monteil H, Piemont Y. Panton-valentine leucocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. Infection and Immunity 1995; 63(10): 4121-4129.
86. Bukowski M, Wladyka B, Dubin G. Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. Toxins 2010; 2(5): 1148-1165.
87. Ladhani S. Understanding The mechanism of action of the exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. FEMS Immunol Med Microbiol 2003; 39(2): 181-189.
88. Tunç E. Metisiline dirençli stafilokoklarda vankomisine karşı azalmış duyarlılığın araştırılması. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Uzmanlık Tezi, Malatya, 2014.
89. Bozdoğan B, Dabanoğlu İ, Güney Kaya K, Erdem Aynur Z, Avcı H. Eksfoliyatif toksin genlerinin klonlanması ve toksin ekstraktının psoriasis oluşturulmuş farelerdeki etkisinin araştırılması. Tübitak, Aydın, 2017.
90. Oliveira D, Borges A, Simoes M. *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases. Toxins 2018; 10(6): 252.
91. Erol İ, İşeri Ö. Stafilokokal enterotoksinler. Ankara Üniv Vet Fak Derg 2004; 51: 239-245.
92. Oliverira R, Pinho E, Almeida G, Azevedo NF, Almeida C. Prevalence and diversity of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw milk from Northern Portugal. Frontiers in Microbiology 2022; 13: 1-12.
93. Keyvan E, Yurdakul O, Sen E. Staphylococcal enterotoxins and enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in raw milk: a screening study. Kocatepe Vet J 2020; 13(2): 104-109.
94. Fukuda K, Ogawa M, Taniguchi H, Saito M. Introduction it is important to detect and identify the molecular approaches to studying microbial communities: targeting the 16S ribosomal RNA gene. J UOEH 2016; 38(3): 223-232.

95. Omoe K, Hu DL, Takahashi-Omoe H, Nakane A, Shinagawa K. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. FEMS Microbiology Letters 2005; 246: 191-198.
96. Demirgöl F, Sağdıç O. Fermente süt ürünlerinin insan sağlığına etkisi. Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi 2018; 13: 45-53.
97. Durlu F, Cömert M. Gıda zehirlenmelerinde etken faktörler. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi 2008; 65(3): 149-158.
98. Keyvan E. Çiğ süt örneklerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* izolatlarında antibiyotik direnç özelliklerinin tespiti. Veteriner Hekimler Derneği Dergisi 2019; 90(1): 9-14.
99. Yücel N, Anıl Y. Çiğ süt ve peynir örneklerinden *Staphylococcus aureus* ve koagülaz negatif stafilocokların identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılığı. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi 2011; 68(2): 73-78.
100. JoVE Science Education Database. Microbiology. 16S rRNA sequencing: a PCR-based technique to identify bacterial species. JoVE, Cambridge, MA, (2023).
101. Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (June 1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1990;87 (12): 4576-4579.
102. Chen JHK, Leung H, Wong CMC, Yuen K, Cheng VCC. Prevalence and characteristics of invasive *Staphylococcus argenteus* among patients with bacteremia in Hong Kong, China. Microorganisms 2023; 11(10): 1-12.
103. Bochev I, Russenova N. Resistance of *Staphylococcus* spp. strains isolated from goats with subclinical mastitis. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine 2005; 8(2): 109-118.
104. Alian F, Rahimi E, Shakerian A, Momtaz H, Riahi M, Momeni M. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine, sheep and goat raw milk. Global Veterinaria 2012; 8(2): 111-114.
105. Qian W, Shen L, Li X, Wang T, Liu M, Wang W, Fu Y, Zeng Q. Epidemiological characteristics of *Staphylococcus Aureus* in raw goat milk in Shaanxi Province, China. Antibiotics 2019; 8 (3): 2-12.

106. Coimbra-eSouza V, Rossi CC, Jesus-de Freitas LJ, Brito MA, Laport MS, Giambiagi-de Marval M. Short communication: diversity of species and transmission of antimicrobial resistance among *Staphylococcus* spp. isolated from goat milk, Brazil. *J Dairy Sci* 2019; 102: 5518-5524.
107. Chai MH, Faiq TAM, Ariffin SMZ, Suhaili Z, Sukiman MZ, Ghazali MF. Prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in raw goat milks from selected farms in Terengganu, Malaysia. *Tropical Animal Science Journal* 2020; 43(1): 64-69.
108. Silva Júnior AE, Vasconcelos PC, Saraiva MMS, Santos Filho L, Silva NMV, Givisiez PEN, Oliveira CJB. Antimicrobial susceptibility profiles of *Staphylococcus* spp. contaminating raw goat milk. *Veterinary World* 2021; 14(5): 1074-1079.
109. Valle J, Gomez-Lucia E, Piriz S, Goyache J, Orden JA, Vadillo S. Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. *Applied and environmental microbiology* 1990; 56(5): 1323-1326.
110. Rahimi E, Alian F. Presence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in cow, camel, sheep, goat, and buffalo bulk tank milk. *Veterinary Archives* 2013; 83(1): 23-30.
111. Cavicchioli VQ, Scatamburlo TM, Yamazi AK, Pieri FA, Nero LA. Occurrence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, and enterotoxigenic *Staphylococcus* in goat milk from small and medium-sized farms located in Minas Gerais State, Brazil. *Journal of Dairy Science* 2015; 98(12): 8386-8390.
112. Omwenga I, Aboge GO, Mitema ES, Obiero G, Ngaywa C, Ngwili N, Wamwere G, Wainaina M, Bett B. *Staphylococcus aureus* enterotoxin genes detected in milk from various livestock species in northern pastoral region of Kenya. *Food Control* 2019; 103(141): 126-132.
113. Widianingrum DC, Windria S, Aziz F, Isrina S, Salasia O. Classical enterotoxin genes of *Staphylococcus aureus* isolated from the raw milk of cows and goats in Yogyakarta Indonesia. *Advances in Biological Sciences Research* 2021; 12: 15-19.
114. Bilgin M, Atasever M. Determining the enterotoxin genes and methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from goat milk and its products. *MANAS Journal of Engineering* 2022; 10(2): 151-158.

115. Günday H. Aydın bölgesinde ürüne işlenecek çiğ sütlerde *Staphylococcus aureus* ve enterotoksin varlığının araştırılması. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2017.



8. ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Koyun Kanlı Agar besiyerinde ve mikroskop altında Staphylococcus bakterileri	13
Şekil 2. Gram pozitif bakteri hücre duvarı	15
Şekil 3. Koyun kanlı agar besiyerindeki muhtemel Staphylococcus kolonilerinin kültür görünümü.....	34
Şekil 4. On numaralı süt örneğinin Gram boyama sonrası mikroskoptaki görünümü.....	35
Şekil 5. Katalaz testi pozitif olan on numaralı örneğin görünümü	36
Şekil 6. Tüp koagülaz testi pozitif olan on numaralı örneğin görünümü.....	36
Şekil 7. Hazırlanan % 2'lik agaroz jelin, jel dökme kabında donmuş görüntüsü	38
Şekil 8. % 2'li agaroz jele yüklemesi yapılan PCR ürünlerinin tank içerisindeki görüntüsü ..	38
Şekil 9: jel elektroforez tankı ve güç kaynağı.....	39
Şekil 10. 1-9 numaralı örneklerin 16S rDNA PCR amplifikasyon görüntüsü	39
Şekil 11. Dizileme Cihazı	41
Şekil 12. Sequencher 5.4.6 yazılımı ile diziler	41
Şekil 13. 1-9 numaralı örneklerin Multipleks PCR görüntüsü.....	44
Şekil 14. Staphylococcus türlerinin Baird-Parker agarda koloni görüntüleri	49

9. TABLOLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. S. Aureus'un üreme ve toksin oluşturma koşulları	27
Tablo 2. %5 Koyun Kanlı Agar İçeriği	32
Tablo 3. Baird-Parker Agar İçeriği.....	32
Tablo 4. Fizyolojik Tuzlu Su İçeriği	33
Tablo 5. SCLB Solüsyon İçeriği.....	33
Tablo 6. Single Cell Lysing Buffer Programı.....	37
Tablo 7. 16S rDNA PCR Yönteminde Kullanılan Primer Dizileri	37
Tablo 8. Multipleks PCR Yönteminde PCR Karışımı.....	38
Tablo 9. 16S rDNA PCR Programı	38
Tablo 10. Multipleks PCR Yönteminde Kullanılan Virülans Genlerinin Primer Dizileri	42
Tablo 11. Multipleks PCR Yönteminde PCR Karışımı.....	43
Tablo 12. Virülans Genlerin Tespiti için Amplifikasyon Programı	43
Tablo 13. İzolatların biyokimyasal test ve 16S rDNA analiz sonuçları	45
Tablo 14. İzole edilen KNS ve KPS	48

10. EKLER DİZİNİ

Ek-1. Tarım ve Orman Bakanlığı İzin Belgesi.....	70
--	----



11. EKLER

Ek-1. Tarım ve Orman Bakanlığı İzin Belgesi

