



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

**ÇEVRE, GIDA ve İNSAN KAYNAKLI METİSİLİN
DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SUŞLARININ
KLONAL İLİŞKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Yunus KILIÇOĞLU

**Samsun
Aralık-2018**



T.C
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

**ÇEVRE, GIDA ve İNSAN KAYNAKLI METİSİLİN
DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SUŞLARININ
KLONAL İLİŞKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Yunus KILIÇOĞLU

Danışman

Prof. Dr. Mustafa ALIŞARLI

**Samsun
Aralık-2018**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Yunus KILIÇOĞLU tarafından Prof. Dr. Mustafa ALIŞARLI danışmanlığında hazırlanan “Çevre, Gıda ve İnsan Kaynaklı Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* Suşlarının Klonal İlişkilerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 28/12/2018 tarihinde yapılan sınav ile Veterinerlik Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalında DOKTORA Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ahmet GÜNER, Selçuk Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Mustafa ALIŞARLI, Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi (Danışman)

Üye : Prof. Dr. Mustafa ATASEVER, Atatürk Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Göknur TERZİ GÜLEL, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Timur GÜLHAN, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

ONAY

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

.... / /.....

Prof. Dr. Ahmet UZUN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimde, tez konumun tasarlanması ve tez çalışmalarımın uygulanmasında, değerli fikir ve tecrübeleriyle devamlı surette destek olan danışman hocam Prof. Dr. Mustafa ALIŞARLI'ya, Tez İzleme Komitemde yer alıp fikir ve önerileri ile yol gösterici olan Prof. Dr. Göknur TERZİ GÜLEL ve Prof. Dr. Timur GÜLHAN'a şükranlarımı sunarım.

Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Öğretim Üyelerimiz Doç. Dr. Özgür ÇADIRCI, Doç. Dr. Ali GÜCÜKOĞLU, Dr. Öğr. Üyesi Gökhan İNAT ve Dr. Araş. Gör. Tolga UYANIK'a, PFGE eğitimi için desteklerini esirgemeyen Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ ve Dr. Öğr. Üyesi Gülşen ULUÇAM ATAY'a, MRSA izolat koleksiyonlarından, tezim için izolat sağlayan, PFGE yöntemi için cihaz kullanımı ve uygulama konusunda samimi yardımlarıyla destek olan OMÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Asuman BİRİNCİ, Doç. Dr. Yeliz TANRIVERDİ ÇAYCI ve Dr. Öğr. Üyesi Dr. Kemal BİLGİN'e, PFGE çalışma sonuçlarımın yorumlanmasında, program kullanımı ve dendogram oluşturulmasında, engin tecrübe ve bilgileriyle destek olan, Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Rıza DURMAZ'a ve Arş. Gör. Tuğcan BAŞYİĞİT'e, istatistik çalışmalarında bilgi, tecrübe ve emeğiyle yardımcı olan Yaşar Doğu Spor Bilimleri Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Soner ÇANKAYA'ya en derinden teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim ve tez çalışmamın yürütülmesinde, her daim yardım ve destekleriyle yanımda olan Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürümüz İsmail AYDIN'a, Müdür Yardımcımız Dr. Emre ÖZAN'a, mesai arkadaşlarım Veteriner Hekim Dr. Yunus GÜR, Veteriner Sağlık Teknikeri Volkan YILMAZ'a ayrıca teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım, meslek hayatım ve tez çalışmalarım da daima emek veren ve destek olan eşime, anneme ve babama, hayatımızı tatlandıran oğullarım Mehmed Yusuf ve Ali Kerem'e de sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, TAGEM / HSGYAD / 16 / A05 / P01 / 111 kod numarası ile Tarım ve Orman Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü tarafından desteklenmiştir.

ÖZET
ÇEVRE, GIDA ve İNSAN KAYNAKLI METİSİLİN DİRENÇLİ
STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUŞLARININ KLONAL İLİŞKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

Amaç: Bu çalışmada; çevre, gıda ve insan kaynaklı metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*'ların farklı kaynaklardan izolasyonu ve identifikasyonunun ardından, metisilin dirençleri, stafilokokkal enterotoksin üretme yeteneklerinin belirlenmesi, çalışmada elde edilen izolatlarla, hastane ve toplum kökenli MRSA izolatlarının da ilave edilmesiyle, farklı kaynaklardan elde edilen MRSA suşlarının aralarındaki genetik ve klonal ilişkilerin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Mart 2016 – Eylül 2017 tarihleri arasında Samsun ve çevresindeki dört gıda işletmesinden temin edilen 500 gıda (çiğ süt, peynir, kuşbaşı et, kıyma, köfte), 184 personele ait el yıkantısı ve burun sıvabı, 60 çevresel sıvap örneği (tezgah, tekne, bıçak, zemin, duvar) ile hastane/toplum kaynaklı 53 MRSA izolatı materyal olarak kullanıldı. Örneklerde *S. aureus*'ların izolasyon ve identifikasyonu ISO 6888-2 metodu ile, *nuc*, *coa*, *sspA* ve *mecA* genleri (metisilin direnç) varlığı PCR ile belirlendi. Daha sonra elde edilen izolatlarda enterotoksin genlerinin (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* ve *see*) varlığı PCR ile belirlenirken, toksin oluşturma yetenekleri ise ELISA testi ile belirlendi. Son olarak da tüm izolatların klonal ve genetiksel ilişkileri PFGE ile araştırıldı.

Bulgular: Gıda örneklerinin 99'undan (%19,8), personel örneklerinin 46'sından (%25) ve çevresel örneklerin 7'sinden (%11,6) toplam 173 *S. aureus* izolatı izole edildi. İzolatların 54'ünün (%31,2) *mecA* geni taşıdığı, 50'sinin (%28,9) *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* genlerinden bir veya daha fazlasını içerdiği, 61'inin (%35,2) toksinlerden en az birini üretebildiği belirlendi. Çalışmaya hastane/toplum kaynaklı 53 MRSA izolatının da eklenmesi sonucu tüm izolatlar arasındaki klonal ve genetiksel ilişkiler PFGE ile araştırıldı. Bir gıda personeli burun izolatı ile bir hastane aspirat izolatının %100, başka bir gıda personeli burun izolatı ile bir hastane yara akıntısı izolatının %90,9, bir el yıkantısı izolatı ile bir peynir izolatının %100, iki çiğ süt izolatı ile bir hastane kan kültürü izolatı arasında da %83,3 oranında benzerlik bulundu.

Sonuç: İncelenen gıda, çevre ve personel örneklerinde metisilin dirençli ve enterotoksijenik *S. aureus*'ların yüksek oranda bulunması, hastane ve gıda kaynaklı MRSA izolatlarının büyük oranda klonal benzerlik göstermesi halk sağlığı açısından ciddi risk oluşturduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Çevre, gıda, insan kaynaklı MRSA; klonal ilişki; PFGE; *S. aureus*.

Yunus KILIÇOĞLU, Doktora Tezi
Ondokuzmayıs Üniversitesi - Samsun, Aralık-2018

ABSTRACT

ANALYSIS OF CLONAL RELATIONSHIPS BETWEEN ENVIRONMENT, FOOD AND HUMAN RELATED METHICILLIN RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* STRAINS

Aim: The purpose of this study is to isolate and identify environment, food and human related MRSA; to determine their methicillin resistance and their ability to reproduce staphylococcal enterotoxin and to present the genetic and clonal relationship between MRSA strains obtained from different sources after adding hospital and society-based MRSA isolates to the isolates obtained in the study.

Material and Method: Between March 2016 and September 2017, 500 food (raw milk, cheese, meat cubes, minced meat and meatball), 184 staff handwash/nasal swab and 60 business environmental (counter, basin, knife, floor, wall) swab samples were taken from four food establishments in and around Samsun. Following the isolation and identification of *S. aureus* from the samples, *nuc*, *coa*, *sspA* genes were analyzed. ELISA test was applied for enterotoxin genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* and methicillin resistance gene *mecA* analysis and toxin reproducing ability. 53 hospital/society-based MRSA isolates were included in the MRSA obtained and clonal and genetic relationships of all isolates were researched with PFGE.

Results: A total of 173 *S. aureus*, 99 (19,8%) from food, 46 (25%) from staff and 7 (11,6%) from environmental samples, were isolated. It was found that 54 (31,2%) of the isolates carried *mecA* gene, 50 (28,9%) included one or more of *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* genes and 61 (35,2%) could reproduce at least one of the toxins. 53 hospital/society-based MRSA isolates were added in the study and clonal and genetic relationships were researched with PFGE. One food staff nasal isolate and one hospital aspiration isolate showed 100% clonal similarity, while another food staff nasal isolate and one hospital wound discharge isolate showed 90,9% clonal similarity and one handwash isolate and one cheese isolate and one floor isolate and one raw milk isolate showed 100% clonal similarity. Two raw milk isolates and one hospital blood culture isolate were found to be 83,3% similar.

Conclusion: It was concluded that the results that staff working in food production and the food they produced with their hands had high rates of methicillin resistant and enterotoxigenic *S. aureus*, and that human, food and business environment related MRSA strains were clonally similar in high rates pose a serious risk in the field of public health.

Key Words: Clonal relationship; environment, food, human related MRSA; PFGE; *S. aureus*.

Yunus KILIÇOĞLU, Doctoral Thesis

Ondokuzmayıs University - Samsun, December-2018

SİMGELER ve KISALTMALAR

a_w	: Su aktivitesi
ATP	: Adenozin trifosfat
BHI	: Brain heart infusion
BPRPFA	: Baird-Parker rabbit plasma fibrinogen agar
BSA	: Bovine serum albumine
CDC	: Amerika Hastalık Korunma ve Kontrol Merkezleri
coa	: Koagülaz geni
CP	: Kapsüler protein
EDTA	: Etylendiamine tetra acetic acid
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
ELISA	: Enzym linked immunosorbent assay
enta/b/c/d/e	: enterotoksin a/b/c/d/e genleri
eta/b	: Eksfoliyatif toksin geni
ETs	: Eksfoliyatif toksin
geh	: Gliserol ester hidrolaz geni
Geh	: Gliserol ester hidrolaz
GMP	: İyi üretim uygulamaları
HA	: Hiyalüronik asit
HACCP	: Tehlike analizleri ve kritik kontrol noktaları
HCl	: Hidroklorik asit
hla/b	: hemolizin a/b genleri
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
H₂S	: Hidrojen sülfür
HST	: Hücre süspansiyon tamponu
ISO	: Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu
ica	: İntersellüler adezyon geni
kb	: Kilobaz
KKN	: Kritik kontrol noktaları
KNS	: Koagülaz negatif Stafilokok
KPS	: Koagülaz pozitif Stafilokok
Luk	: Lökosidin
OD	: Optik dansite

MRD	: Maximum recovery diluent
MRSA	: Metisilin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	: Metisilin duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i>
nuc	: Termonükleaz geni
PBB	: Purple broth base
PBP	: Penisilin bağlağıcı protein
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PFGE	: Pulsed-Field gel electrophoresis
PVL	: Pantone-Volatine lökositin
SE	: Stafilokokkal enterotoksin
SpA	: Stafilokokkal protein A
SSSS	: Stafilokokkal haşlanmış deri sendromu
TBE	: Tris boric acid EDTA
TCR	: T cell receptor
TE	: Tris EDTA
TSA	: Tryptic soy agar
TSB	: Tryptic soy broth
TSST-1	: Toksik şok sendrom toksini
tst	: Toksik şok sendrom toksini geni
sspA	: Stafilokokkal serin proteaz A geni
VISA	: Vankomisine orta dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
vanA	: Vankomisin orta direnç geni
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
KISALTMALAR	vi
İÇİNDEKİLER	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. <i>S. aureus</i> 'un Tarihçesi ve Sınıflandırılması	6
2.2. Genel Özellikleri	7
2.3. Morfolojik Özellikleri	8
2.4. Biyokimyasal Özellikleri	8
2.5. Virulens Faktörleri	10
2.5.1. Kapsül	11
2.5.2. Slime Tabakası	12
2.5.3. Hücre Duvarı	12
2.5.4. Enzimleri	14
2.5.5. Toksinleri	18
2.6. <i>S. aureus</i> 'ların Antibiyotiklere Karşı Direnci	29
2.6.1. Penisilin Direnci	29
2.6.2. Metisilin Direnci	30
2.6.3. Vankomisin Direnci	32
2.6.4. Kinolon Direnci	33
2.6.5. Trimethoprim-Sülfametoksazol Direnci	33
2.7. Çevresel Ortamlarda, Canlılarda ve Gıdalarda Varlığı	34
2.7.1. <i>S. aureus</i> 'un Çevresel Ortamlarda ve Canlılarda Varlığı	34
2.7.2. <i>S. aureus</i> 'un Gıdalarda Varlığı	36
2.8. <i>S. aureus</i> 'un İzolasyon, İdentifikasyon ve Patojenite Belirleme Yöntemleri	40
2.8.1. <i>S. aureus</i> 'un İzolasyon Yöntemleri	40
2.8.2. <i>S. aureus</i> 'un İdentifikasyon Yöntemleri	41
2.8.3. <i>S. aureus</i> 'un Patojenite Belirleme Yöntemleri	42
2.8.4. <i>S. aureus</i> 'un Metisilin Direncini Yöntemleri	43
2.9. Genetiksel İlişkilerin Belirlenmesinde PFGE Metodu	44
2.10. <i>S. aureus</i> İnfeksiyon ve İntoksikasyonlarından Korunma	46

2.10.1. <i>S. aureus</i> 'tan Korunmada HACCP Sisteminin Önemi	47
3. MATERYAL VE METOT	49
3.1. Materyal.....	49
3.1.1. Çalışma İçin Toplanan Örnekler.....	49
3.1.2. İzolasyon ve İdentifikasyonda Kullanılan Malzemeler	51
3.1.3. Doğrulamada Kullanılan Referans Suşlar	52
3.1.4. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler	53
3.2. Metot	56
3.2.1. Koagülaz Pozitif <i>Staphylococcus</i> spp.'lerin İzolasyon ve İdentifikasyonu ..	57
3.2.2. <i>S. aureus</i> 'ların İdentifikasyonu	59
3.2.3. Moleküler Yöntemler İçin Bakteriyel DNA Ekstraksiyonu.....	61
3.2.4. <i>S. aureus</i> İzolatlarının Moleküler Yöntemle Doğrulanması	62
3.2.5. <i>mecA</i> Geni PCR Analizi ile MRSA'ların Belirlenmesi	64
3.2.6. <i>S.aureus</i> 'ların <i>sea, seb, sec, sed, see</i> Genlerinin Multipleks PCR Analizi ...	65
3.2.7. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi	66
3.2.8. <i>S. aureus</i> İzolatlarının Enterotoksin Üretim Yeteneğinin ELISA ile Belirlenmesi.....	67
3.2.9. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) ile MRSA İzolatlarının Genetiksel İlişkilerinin Belirlenmesi	69
3.2.10. İstatistiksel Yöntem.....	72
4. BULGULAR	73
4.1. Koagülaz Pozitif <i>Staphylococcus</i> spp. İzolasyon Sonuçları.....	73
4.2. <i>S. aureus</i> İzolasyon Sonuçları.....	74
4.3. <i>S. aureus</i> 'ların Moleküler Yöntemlerle Konfirmasyon Sonuçları.....	76
4.4. <i>mecA</i> Geni PCR Analizi Sonuçları	78
4.5. <i>sea, seb, sec, sed, see</i> Genlerinin Multipleks PCR Sonuçları.....	80
4.6. İzolatların ELISA Testi ile Toksin Üretebilme Sonuçları.....	83
4.7. PFGE Analizi Sonuçları ve MRSA İzolatlarının Klonal İlişkileri.....	87
5. TARTIŞMA	94
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	108
KAYNAKLAR.....	109
ÖZGEÇMİŞ.....	126

1. GİRİŞ

Toplum sağlığı bir bütün olarak düşünüldüğünde, gıda kaynaklı enfeksiyon ve intoksikasyonlar, toplumun her kesimini etkileyen ciddi sorunlar olarak karşımıza çıkmaktadır (Loir ve ark., 2003). Gıda kaynaklı hastalıklar, Dünya Sağlık rgt (World Health Organisation, WHO) tarafından, “gıda veya su tüketimi aracılığıyla insanlara bulaşan, toksik veya enfeksiyöz doğal etkenler tarafından oluşturulan hastalıklar” olarak tanımlanmıştır. Gıda kaynaklı hastalıkların oluşturduğu sorunlar, insanlığın başlangıcından beri tüm toplumları önemli ölçüde etkilemiştir (Anon, 2015).

Sadece Amerika Birleşik Devletleri (ABD)’nde 90’lı yıllarda her yıl 76 milyon gıda kaynaklı hastalık vakasının olduğu, bunlardan 325.000’inin hastanelerde tedavi edildiği ve 5.000’inin öldüğü tahmin edilmektedir (Mead ve ark., 1999). ABD Hastalık Korunma ve Kontrol Merkezleri (Centers for Disease Control and Prevention, CDC)’nin istatistiksel çalışmalarına göre, 2016 yılında, bu vakalardan etkeni tespit edilebilen kısmının 46 milyon vaka olduğu, bunlardan 128.000’inin hastanede tedavi altına alındığı ve 3000’inin öldüğü bildirilmektedir (Anon, 2017a). Gıda kaynaklı hastalıklar tedavi giderleri açısından ekonomik olarak büyük bir yük oluşturmakta, ayrıca işgücü kaybına yol açarak bu yönden de zarara yol açmaktadır (Anon, 2015). ABD’de 1995 yılında, gıda kaynaklı hastalık etkenlerinden yalnızca yedisinin ülkeye bir yıllık maliyetinin 34,9 milyar doları bulduğu bildirilmektedir (Buzby ve Roberts, 1997).

Gıda kaynaklı hastalık tanımlamasıyla günümüzde 250 farklı hastalıktan bahsedebilmek mümkündür (Bhatia ve Zahoor, 2007). Bu hastalıkların semptomları, sebep olan etiyolojik ajana göre değişmekle birlikte, en yaygın olanları kusma ve ishaldir. Gıda kaynaklı hastalıkların büyük bir kısmını oluşturan gıda kaynaklı enfeksiyonlara, gıdalara bulaşabilen farklı enfeksiyon etkenleri sebep olmakta iken, diğer kısmı olan gıda kaynaklı zehirlenmelere, zehirli kimyasallar veya gıdalarda bulunabilen zararlı bakterilerin ürettiği toksinler sebep olabilmektedir (Loir ve ark., 2003). Gıda kaynaklı salgınların yaklaşık üçte birinin bakteriyel kaynaklı olduğu bildirilmektedir (Bhatia ve Zahoor, 2007). Bakteriyel kaynaklı gıda enfeksiyonlarında, *Salmonella* türlerinden sonra ikinci sırayı *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) almaktadır (Panisello ve ark, 2000).

Staphylococcus cinsi *Staphylococcoceae* ailesinde sınıflandırılmaktadır. Bu cins içerisinde 47 tür tanımlanmış olup en patojen tür *S. aureus*’tur (Becker ve ark., 2014). Çok çeşitli hayvan türlerinde kolonize olabilen *S. aureus* Gram pozitif bir bakteridir (Smith, 2015). *S. aureus*’lar, fakültatif anaerob, katalaz ve koagülaz pozitif özellikte olup, hareketsiz kok

morfolojisine sahiptir (Bhatia ve Zahoor, 2007). Avrupa Gıda Güvenliği Örgütü (European Food Safety Authority, EFSA)'nın yayınladığı Biyolojik Tehditler Raporu'nda *S. aureus*, dış ortam şartlarına oldukça dayanıklı ve çevresel kaynaklarda yaygın (ubiquiter) bulunan bir mikroorganizma olarak bildirilmiştir (Anon, 2009).

Staphylococcus'lar, Robert Koch tarafından ilk kez 1878 yılında insan cerahat etkeni olarak tanımlanmış, Pasteur 1880 yılında sıvı besi yerinde üretmeyi başarmıştır (Kloos, 1990). Alexander Ongston ise yine 1880 yılında ilk kez insanlarda birçok iltihaplı hastalığa yol açan ve mikroskop görünümüleri üzüm salkımına benzeyen organizmalarla ilgili bilgileri yayınlamıştır. Bu organizmalara, Yunanca üzüm salkımı "staphylo" ve tanecik-tanecikli meyve anlamlarına gelen "coccus" kelimelerini birleştirerek *Staphylococcus* ismini vermiştir (Baird-Parker, 1963). Rosenbach, 1884'de besi yeri ortamında saf kültür olarak ürettiği *Staphylococcus*'lardan sarı pigmentli olanları *Staphylococcus aureus*, beyaz pigmentli olanları *Staphylococcus albus* olarak isimlendirmiştir (Kloos, 1990).

Bakteriyel gıda enfeksiyonları ve intoksikasyonlarında öne çıkan enterotoksijenik stafilokoklar, üreyebildikleri veya yüksek sıcaklığa (100 °C'ye 1 saat) dayanıklı toksin üretebildikleri kontamine gıdaları tüketen bireylerde, çok ciddi gastroenteritise sebep olmaktadır. Bu toksinler, immünsüpresif bireyler, bebekler ve yaşlılar dışında düşük mortalitesi sebebiyle çok öldürücü olarak nitelenmemekle birlikte, birkaç günden iki haftaya kadar süren hastalık, düşüklük ve güçsüzlüğe sebep olur (Bhatia ve Zahoor, 2007). ABD'de görülen gıda kaynaklı hastalıklardan, *S. aureus*'un ürettiği yüksek sıcaklığa dayanıklı toksinler sebebiyle oluşan gıda zehirlenmelerinin her yıl 240.000'i bulunduğu bildirilmektedir (Doyle ve ark., 2012).

Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği, Gıda Güvenirliliği Kriterleri'nde, Koagülaz pozitif stafilokokların üst limiti, tereyağ, peynir, kaymak, süt tozu, krema tozu, yaş pasta, fırınlanmış sebzeli etli makarna, mantı, pizza, mayonez gibi tüketime hazır ürünlerinin 25 gr'ında 10^2 - 10^3 , kürlenmiş kurutulmuş etlerin 25 gr'ında 10^2 - 10^4 , baharatların 25 gr'ında 10^3 - 10^4 olarak belirlenmiştir. Stafilokokkal enterotoksinlerin ise eritme peynir, krema, et/sebze yemeği, salata, soğuk meze, makarna, börek, pide, pizza, muhallebi vb. tüketime hazır ürünlerin 25 gr'ında hiç bulunmaması şart koşulmuştur (Anon, 2011).

S. aureus süt sığırı ve süt keçilerinde en önemli mastitis etkeni, tavuklarda ayak derisi enfeksiyonu etkeni ve hatta tavşan yetiştiriciliğinde görülen en önemli enfeksiyon etkeni olarak bildirilmektedir. Hayvan enfeksiyonları ile ilişkili *S. aureus*'ların insan enfeksiyonları ile de ilişkili olduğu, bu ilişkinin hastane kaynaklı enfeksiyon etkeni *S. aureus*'ları da

kapsadığı son yıllarda yapılan birçok çalışma ile ispat edilmiştir (Smith, 2015). Brezilya'da 1999'da pastörize edilmemiş sütleri tüketen 328 kişinin etkilendiği bir salgında kontaminasyonun tek kaynağının mastitisli bir sığır olduğu, yine Michigan'da hayvan hastanesindeki atların nozokomiyal infeksiyonunun kaynağının hastane personeli olduğu belirlenmiştir (Seguin ve ark. 1999, Carmo ve ark., 2002).

S. aureus'un insanlarda en fazla izole edildiği yerler, burnun septum nazı bölümü, yutak, deride oluşan yaralar ve apselerdir. Bulaşma açısından da, burun bölgesi taşıyıcılığı en yüksek riski barındırmaktadır (Sepin-Özen ve ark., 2013). Ayrıca kıl follüküllerinde kolonize olur ve ciddi bir antisepsi ile uzaklaştırılmazsa ömür boyu kalıcı olabilir (Ten Broeke-Smits ve ark., 2010). Gıda işletmelerinde ve gıda ile temas eden diğer alanlarda taşıyıcı bireylerin çalıştırılması, enfeksiyon kaynağı olarak büyük risk oluşturmaktadır (Sepin-Özen ve ark., 2013). ABD'de 1975 ile 1998 yılları arasında ortaya çıkan gıda zehirlenme salgınlarının incelenmesinde, salgınların %93'ünde, salgın öncesi veya sonrasında, hasta olan gıda üretiminde çalışan personeller ile salgınların ilişkili olduğu bildirilmiştir (Guzewich, 1999).

Gıdaların üretildiği ve üretim sonrası işlemlerin yapıldığı ortamın havasında ve temas ettiği yüzeylerde, yüksek sayıda bakteri bulunduğu ve pişirilmiş gıdalara bu yolla gerçekleşen çapraz kontaminasyonun, gıdaların mikrobiyolojik kalitelerini etkileyen en büyük risk faktörü olduğu gösterilmiştir (Syne ve ark.,2013). Gıda işletmelerinde, alet ve ekipmanların temizliği ve dezenfektan kullanımının düzenli ve kontrollü hale getirilmesiyle birlikte, hijyenik kontrollerinin de düzenli olarak yapılması tavsiye edilmektedir (Aydın ve ark. 2007). Personellerin düşük el hijyeni ve uygun olmayan eldiven kullanımının da etkisiyle, üretimi sırasında çok fazla elle manipülasyonun gerektiği gıdaların, *S. aureus* ile kontaminasyona çok açık olduğu gösterilmiştir (Ayçiçek ve ark., 2004). Benzer şekilde domuz eti işleme tesisinde insan elinin ve üretimde kullanılan ekipmanları içeren çevresel faktörlerin, *S. aureus* kontaminasyonunu çok yüksek seviyelere taşıdığı yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Saide-Albornoz ve ark., 1995).

EFSA raporlarına göre *S. aureus*'un, sağlıklı insanlardan sürekli taşıyıcı bireylerin burnunda, hastalık oluşturmaksızın kolonize olduğu ve bunun oranının bazı çalışmalarda %20'ye kadar ulaştığı, sürekli olmayan aralıklı taşıyıcı bireylerin oranının da %60'a kadar çıktığı belirlenmiştir (Anon, 2009). Bu sürekli veya aralıklı taşıyıcı bireyler *S. aureus*'u taşıyıp, duyarlı bireylere direk veya indirek bulaştırmada etkili rol oynarlar (Kadariya ve ark. 2014).

Bununla birlikte bazı vakalarda, deride, ağız ve burunda bulunan *S. aureus*'lar bütünlüğü bozulmuş deriden veya yaralardan organizmaya girerek apselere, pnömoni,

menenjit, endokardit ve septisemiye sebep olmaktadır. Hastanelerde, çok yaygın olarak immünsüpresif bireylerde, derinin savunmasını ortadan kaldıran enjeksiyon, kateter, cerrahi işlemler ve derideki yaralardan *S. aureus*'lar girerek hastane kaynaklı enfeksiyonlara sebep olur. Bu enfeksiyonlar önemsiz olabileceği gibi ciddi enfeksiyonlara da yol açabilir ve bazı vakalar ölümle sonuçlanır (Anon, 2009).

Antibiyotiklerle tedavinin başladığı yıllardan günümüze kadar mikroorganizmalarda değişik derecelerde ortaya çıkan antibiyotik direnci, hastane kaynaklı enfeksiyonlar olarak adlandırılan yeni problemleri ortaya çıkarmıştır. *S. aureus*'un da metisiline dirençli suşları (MRSA), 1960'lı yıllardan bu yana, hastane enfeksiyonlarında büyük problem teşkil etmekte, tedavide büyük zorluklara neden olmakta ve birçok vaka ölümle sonuçlanmaktadır (Şen ve Özdemir, 2016).

Günümüzde dünyada her yıl ortalama 200.000 ton antibiyotik üretilmekte ve bunların çoğunluğu hayvan sağlığı, bitki koruma ve tarımın diğer sektörlerinde bilinçsizce kullanılmaktadır. ABD'de 2005 yılında, MRSA enfeksiyonları ile ilişkili yaklaşık 478.000 kişinin hastanede tedavi edildiği, Avrupa'da da benzer şekilde MRSA enfeksiyonları sebebiyle 150.000'den fazla insanın hastanelere yatırıldığı bildirilmiştir (Doyle ve ark. 2012). Yine yapılan çalışmalara göre, Avrupa'da her yıl tahminen 25.000, ABD'de ise 23.000 kişi dirençli bakteri suşları nedeniyle ölmektedir. MRSA'lar Avrupa, Amerika, Kuzey Afrika, Ortadoğu ülkeleri ve Orta Asya'da antibiyotik dirençli patojenler içinde en yaygın patojen olarak bildirilmektedir (Laxminarayan ve ark., 2013).

Et ürünlerinde ve çiğ sütte yapılan çalışmalarda, gıdalardan belli oranda MRSA izole ediliyor olması, gıda kaynaklı bulaşma risklerini ortaya koymakla birlikte, hayvancılıkta ve özellikle et ürünleri üretiminde çalışan personel kaynaklı bulaşma da, dirençli bakteri suşlarının yayılmasında büyük bir risk olarak önümüzde durmaktadır (Doyle ve ark., 2012). Gıda kaynaklı en önemli patojenlerden biri olan MRSA'lar, besin amacıyla yetiştirilen hayvanlardan gıdalara, gıdalardan insanlara veya insanlardan gıdalara bulaşması ile besin zincirine girebilmektedir. Sonuçta insanlarda gıda zehirlenmelerine sebep olabilmektedir. Gıda sektörü çalışanları arasında kişisel hijyen eksikliği, gıda kaynaklı hastalıkların oluşumunda önemli bir risk faktörü olarak yer almaktadır (Anon, 2009).

WHO'nun raporlarına göre, dirençli bakteriler nozokomiyal ve toplum kaynaklı enfeksiyonlardan gittikçe artan oranlarda izole edilmektedir. Farklı ülkelerde 1990'ların ortalarında, toplum kökenli ve hastane dışı enfeksiyonların sebebi olarak gösterilen yeni insan kaynaklı MRSA izolatları tespit edilmiş, birkaç yıl sonra benzer izolatların atlardan izole edildiği görülmüştür (Anon, 2015). Başka bir araştırmada, veteriner sağlık personeli, insan

sağlığı personeli ile sağlık çalışanı olmayan bireyler ve bu üç grubun pet hayvanlarından oluşan kalabalık bir popülasyondan izole edilen *S. aureus* ve MRSA'ların, büyük oranda benzer olduğu belirlenmiştir. Nadiren de olsa, aynı suşların hem insanda hem de o kişinin pet hayvanında kolonize olduğu bildirilmiştir (Kottler ve ark., 2010). Çiftlik kaynaklı MRSA'lar ilk kez 2003 yılında domuzlardan izole edilmiş, bununla birlikte metisilin dirençli *Staphylococcus intermedius/pseudointermedius* türleri de kedi ve köpeklerde tespit edilmiştir (Doyle ve ark., 2012). Dirençli suşlar sebebiyle ortaya çıkan bu infeksiyon ve intoksikasyonların tipinin bilinmesi, etkenin rezervuarının ve kaynağının açıklığa kavuşturulması, bulaşma yollarının tespit edilerek engellenmesi gereklidir. Aksi takdirde dirençli suşların yayılmasını kontrol etmek mümkün olmayacaktır (Anon, 2015).

Bu çalışmada, Samsun ve çevresinde faaliyet gösteren et ve süt ürünleri üretim tesislerinin alet/ekipman/çevresel ortamları, işletme personelleri ve ürettikleri ürünler olmak üzere üç farklı kaynaktan (çevre, gıda ve insan) *S. aureus*, kültürel yöntemlerle izole edildi. Patojenitede etkili *nuc*, *coa* ve *sspA* genleri, metisilin direncinden sorumlu *mecA* geni ile stafilokokkal enterotoksin üretiminden sorumlu *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* genlerini taşıyan izolatlar PCR ile araştırıldı. Böylece hem biyokimyasal yolla yapılan identifikasyon, moleküler olarak doğrulandı, hem de izolatların bazı patojenite özellikleri ortaya konuldu. Bunu takiben, *S. aureus* ve MRSA'ların işletme ortamı, işletme personeli ve gıda zincirinde bulunma oranları belirlendi. İzole edilen tüm *S. aureus* izolatlarının toksin üretme yetenekleri, enzim linked immunosorbent assay (ELISA) testi ile ortaya konuldu. Elde edilen MRSA izolatlarına Ondokuzmayıs Üniversitesi (OMÜ) Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilimdalı'ndan temin edilen toplum kökenli ve hastane kökenli MRSA izolatları da ilave edilerek bir izolat havuzu oluşturuldu. Bu izolat havuzundaki MRSA'ların aralarındaki genetiksel ve klonal ilişkiler araştırıldı. Genetiksel ilişkiyi belirlemede kullanılan moleküler yöntemler arasında gold standart olarak kabul edilen Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) analizi ile izolatlar arasındaki genetiksel ve klonal yakınlık oranları açıklığa kavuşturuldu.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *S. aureus*'un Tarihçesi ve Sınıflandırılması

Staphylococcus'lar, Robert Koch tarafından ilk kez 1878 yılında insan cerahat etkeni olarak tanımlanmış, Pasteur 1880 yılında sıvı besi yerinde üretmeyi başarmıştır (Kloos, 1990). Alexander Ongston ise yine 1880 yılında ilk kez, insanlarda piyemiden septisemiye kadar birçok iltihaplı hastalığa yol açan ve mikroskop görünümüleri üzüm salkımına benzeyen organizmalarla ilgili bilgileri yayınlamıştır. Bu organizmalara Yunanca üzüm salkımı "staphylo" ve tanecik-tanecikli meyve "coccus" anlamlarına gelen kelimeleri birleştirerek *Staphylococcus* ismini vermiştir (Baird-Parker, 1990).

Staphylococcus'ları 1884'de ilk kez besi yeri ortamında saf kültür olarak üreten ve bazı karakteristik özelliklerini laboratuvarında çalışan kişi Rosenbach'tır. Katı besi yeri ortamında irinden izole ettiği bu bakterileri dikkatle incelediğinde, Ongstonun bildirdiği bakterilerle aynı olduğunu görmüş ve *Staphylococcus* cinsi içinde değerlendirmiştir (Bergdoll, 1989). Saf kültür olarak ürettiği *Staphylococcus*'lardan, turuncu pigmentlileri *Staphylococcus pyogenes aureus*, beyaz pigmentlileri *Staphylococcus pyogenes albus* olarak isimlendirmiştir (Kloos, 1990). Daha sonra limon sarısı rengindeki üreme formasyonu gösteren bir başka grubu, bu formasyona dayanarak *Staphylococcus pyogenes citreus* olarak isimlendirmiş ve üçüncü bir tür olarak eklemiştir (Bergdoll, 1989).

Önceleri çoğu mikrobiyolog, *Staphylococcus*'ları ayrı bir cins olarak değil *Micrococcus* cinsi bakteriler olarak kabul ederlerken, Evans ve arkadaşları gibi birçok araştırmacı, *Staphylococcus*'ların glukoz ortamında anaerobik olarak çoğaldıklarını ve asit ürettiklerini, fakat *Micrococcus*'larda bu özelliğin bulunmadığını göstermişlerdir (Baird-Parker, 1990). Ayrıca bu iki cinsin hücre duvarı yapısı, sitokrom ve yağ asiti profilleri, alifatik hidrokarbonlar, menakuinon içerikleri gibi hücre komponentleri ile ayrılabilceğini belirtmişlerdir. Bu yüzden "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology"nin yedinci baskısında *Staphylococcus*'lar *Micrococcus*'lardan ayrı bir cins olarak yer almıştır (Bergdoll, 1989).

Rosenbach'tan sonra, *Staphylococcus*'ların tür ayrımının sadece koloni rengine göre olamayacağı, kültür şartlarına bağlı olarak farklı karakteristikler gösterdikleri, hatta *S. albus*'un gerçekte *S. aureus*'un türü içinde dahil olduğu belirlenmiştir. 1908 yılında Wislow *S. epidermidis*'i ayrı bir tür olarak teklif etmiş, R. W. Fairbrother da 1940 yılında *Staphylococcus* türlerinin ayrımında farklı bir özellik olarak koagülaz üretim yeteneğini öne

sürmüştür. 1972'ye kadar bu cins içinde koagülaz üretim yeteneği farklılığına bağlı olarak yalnızca *S. aureus* ve *S. epidermidis* türleri kabul görmüştür (Becker ve ark., 2014).

S. saprophyticus 1974 yılında "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" de üçüncü bir tür olarak eklenmiştir. Daha sonraki yıllarda araştırmacıların ve taksonomistlerin çalışmaları ile bu cins içerisindeki tür sayısı 1980 yılında *S. capitis*, *S. cohnii*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. simulans*, *S. warneri*, *S. xylosus*, *S. intermedius*, *S. sciuri*, *S. hycus*'un eklenmesi ile 13'e ulaşmıştır. 1990 yılında *S. carnosus*, *S. caprae*, *S. gallinarum*, *S. equorum*, *S. delphini*, *S. felis*, *S. caseolyticus*, *S. auricularis*, *S. lentus*, *S. saccharolyticus*, *S. arlettae*, *S. kloosii*, *S. chromogenes*, *S. lugdunensis* ve *S. schleiferi* türleri eklenerek tür sayısı 28 olmuştur.

Takiben 2000'li yıllara kadar koagülaz pozitif olarak yalnızca *S. lutrae*, 2000-2010 arası *S. pseudintermedius*, 2011 yılında koagülaz değişken *S. agnetis* ilave edilmiş, bununla birlikte yine bu yıllar arasında koagülaz negatif 16 yeni tür daha bu cins içerisine eklenmiştir. Moleküler filogenetik çalışmaların da katkısı ile kabul gören taksonomiye göre *Bacilli* sınıfının *Bacillales* takımı içerisinde *Bacillaceae*, *Listeriaceae*, *Paenibacillaceae*, *Planococcaceae* gibi ailelerle birlikte *Staphylococcaceae* ailesi içinde *Staphylococcus* cinsi sınıflandırılmaktadır. Günümüzde ise bu cins içerisinde, son eklemelerle birlikte, 9'u koagülaz pozitif stafilokoklar (KPS) grubu, 38'i koagülaz negatif stafilokoklar (KNS) grubu içerisinde olmak üzere 47 tür ve 23 alt tür yer almaktadır (Becker ve ark., 2014).

2.2. Genel Özellikleri

Stafilokok türleri arasında *Staphylococcus aureus* supsb. *aureus*, insan ve hayvanlarda infeksiyon oluşturma ve gıda kaynaklı infeksiyon ve intoksikasyonlara yol açma bakımından en riskli türdür. Bu cins içerisinde toksin virulensi, invazyonu ve antibiyotik direnci en yüksek tür *S. aureus*'tur (Loir ve ark., 2003). Bununla birlikte sporsuz bakteriler içinde ısıya en dayanıklı türlerden birisidir. Gıdalara bulaşan *S. aureus*'un, 60 °C'deki ısıya 50 dakika boyunca dayanabildiği bildirilmektedir (Bremer ve ark., 2004). Çoğu çevresel şartlara, kuruluğa, dezenfektanlara, yüksek tuz konsantrasyonuna dayanabilmesi ve kolonize olabilmesi bakterinin bulaşma ve enfeksiyon oluşturabilmesini kolaylaştırır (Loir ve ark., 2003). Bununla birlikte, kuaterner amonyum bileşikleriyle de dezenfekte edilebilirler. Alkol ve iyot gibi antiseptiklere de duyarlıdır (Koneman ve ark., 2006).

Stafilokoklar, geniş bir sıcaklık aralığında (6,5 °C - 47 °C) üreyebilmekle birlikte, optimal üreme sıcaklıkları 35 – 37 °C'dir. Birçok besi yeri ortamında ve pH 4 – 10 arasında üreyebilmekle birlikte üremesi için optimum pH 6 – 7'dir.

2.3. Morfolojik Özellikleri

Günümüzde *S. aureus*, Stafilokok türleri içinde, insan ve hayvan infeksiyonlarından, gıda kökenli intoksikasyonlardan en sık izole edilen ve üzerinde en çok çalışan türdür. Mikroskopta yuvarlak küre şekilli ve düzensiz üzüm salkımı benzeri gruplar halinde görünen, Gram pozitif, hareketsiz, sporsuz, genellikle kapsülsüz, 0,5-1,5 µm boyutlarında bir bakteridir (Baird-Parker 1990). Ancak nadiren de olsa invitro ortamda üreyen *S. aureus*'larda, gevşek özellikte, polisakkarit yapıda bir kapsül tespit edilmektedir ki bu yapı bakterinin dış ortam yüzeylerine yapışmasını da kolaylaştırır (Koneman ve ark., 2006).

Katı besi yeri ortamında, düzgün kenarlı, yuvarlak, 1-3 mm. çapında S (smooth) tipi koloniler oluştururlar. Oluşan koloniler içinde % 10 kadar iğne ucu büyüklüğünde küçük koloniler de görülür (Bremer ve ark., 2004). Koloniler krema kıvamını andırır. Beyaz veya altın sarısı renkte olabilir. Anaerop şartlarda veya sıvı besi yerinde üretildiklerinde altın sarısı pigment oluşturmazlar. % 5 kanlı agarda beta hemoliz oluştururlar. Fakat bazı suşların hemoliz oluşturmadığı da görülmektedir (Koneman ve ark., 2006).

2.4. Biyokimyasal Özellikleri

Stafilokoklar, atmosferik bakımdan aerop veya fakültatif anaerop ortamda en iyi üreme gösterirler. Fakat anaerobik ve mikroaerofilik ortamda da üreyebilirler. Başta glikoz olmak üzere birçok şekeri (Örn; laktoz, sükroz, maltoz, trehaloz) fermente edip laktik asit oluştururlar. *S. aureus*'lar ise diğer stafilokoklardan farklı olarak, mannitolü aerobik ve anaerobik olarak fermente ederler ancak gaz oluşturmazlar. *S. aureus* ve *S. epidermidis* yine glikozu fermente edip asetoin (asetil metil karbinol) açığa çıkarırlar. Nitratları nitrite indirgerler. Hidrojen sülfür (H₂S) ve indol oluşturmazlar. Stafilokoklar basitrasin ve lizozime dirençli iken furazolidon ve lizostafine duyarlıdırlar (Koneman ve ark., 2006).

Koagülaz pozitif Stafilokoklar (*S. aureus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. lugdunensis*, *S. hyicus*, *S. delphini*, *S. lutrae*, *S. aureus* subs. *anaerobius*, *S. schleiferi* subs. *coagulans*), sahip oldukları koagülaz enzimi sayesinde, kan plazmasındaki fibrinojeni fibrine çevirip koagülasyon oluştururlar. Koagülaz varlığı Stafilokoklar içerisinde tür ayırımında kullanılan önemli bir özelliktir (Becker ve ark., 2014). Patojen *S. aureus*'lar, katalaz, lesitinaz ve termonükleaz enzimine sahiptirler. Bu enzimlerin varlığını invitro şartlarda tespit etmek mümkündür. *S. aureus* kolonilerini hidrojen peroksit (H₂O₂) ile muamele edip gaz kabarcıklarının oluşumu ile katalaz, besi yerine katılan yumurta sarısındaki lesitini parçalayıp kolonilerin etrafında opak hale oluşumu ile lesitinaz, besiyeri ortamına katılan DNA'yı parçalayıp HCl muamelesi sonucu yine opak hale oluşumu ile DNaz enzimi varlığı

gösterilebilir. Ayrıca katı besiyerine katılan tellüriti tellüriuma indirgeyerek siyah renkli koloniler oluştururlar (Baird-Parker, 1990). Bazı stafilokok türlerinin önemli biyokimyasal özellikleri Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. *Staphylococcus* türlerinin bazı karakteristik özellikleri (Bergdoll, 1989)

Özellikleri	Türler			
	<i>S. aureus</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. hyicus</i>	<i>S. epidermidis</i>
Pigmentasyon	+ ^a	-	-	-
Koagülaz	+	+	+/-	-
DNase	+	+	+/-	-
Hemoliz	+	+	-	+/-
Mannitol (an) ^b	+	-	-	-
Asetoin	+	-	-	+
Klamping	+	+	+/-	-
Hyalüronidaz	+	-	+	-
Lizostafin	YD	YD	YD	HD

a: % 90’ın üzerinde, b: anaerobik şartlarda, YD: Yüksek duyarlı, HD: Hafif duyarlı

S. aureus’un, % 20’ye kadar tuz konsantrasyonunda üreyebilen suşları bulunmaktadır. Ancak toksin oluşumu, % 10 tuz konsantrasyonunun üzerinde görülmemektedir. Maksimum üreyebileceği tuz konsantrasyonu, sıcaklık, pH, su aktivitesi (a_w), oksidasyon redüksiyon potansiyeli gibi diğer faktörlere bağlı olarak değişmektedir (Jay ve ark., 2005). Osmotolerant özelliğinden dolayı düşük a_w değerlerinde üreyebilen *S. aureus*’un, 0,83 a_w ’de üreyebilmesi ve 0,86 a_w değerinde ise toksin oluşturabilmesi, gıda zehirlenmesi risklerini artırmaktadır. Stafilokokkal enterotoksinlerden (SE) A, B, C, ve D tipi toksinleri, 10 °C’nin altında da oluşturabilmeleri, gıda muhafazasında dikkate alınması gereken bir durum olarak bildirilmektedir (Erol, 2007).

Optimal pH 6-7 arasında toksin üretebilmekle birlikte, SEA optimal pH 5,3-6,8 arasındaki değerlerde üretilmektedir. *S. aureus*’un SEB tipi enterotoksini, anaerobik ortamda,

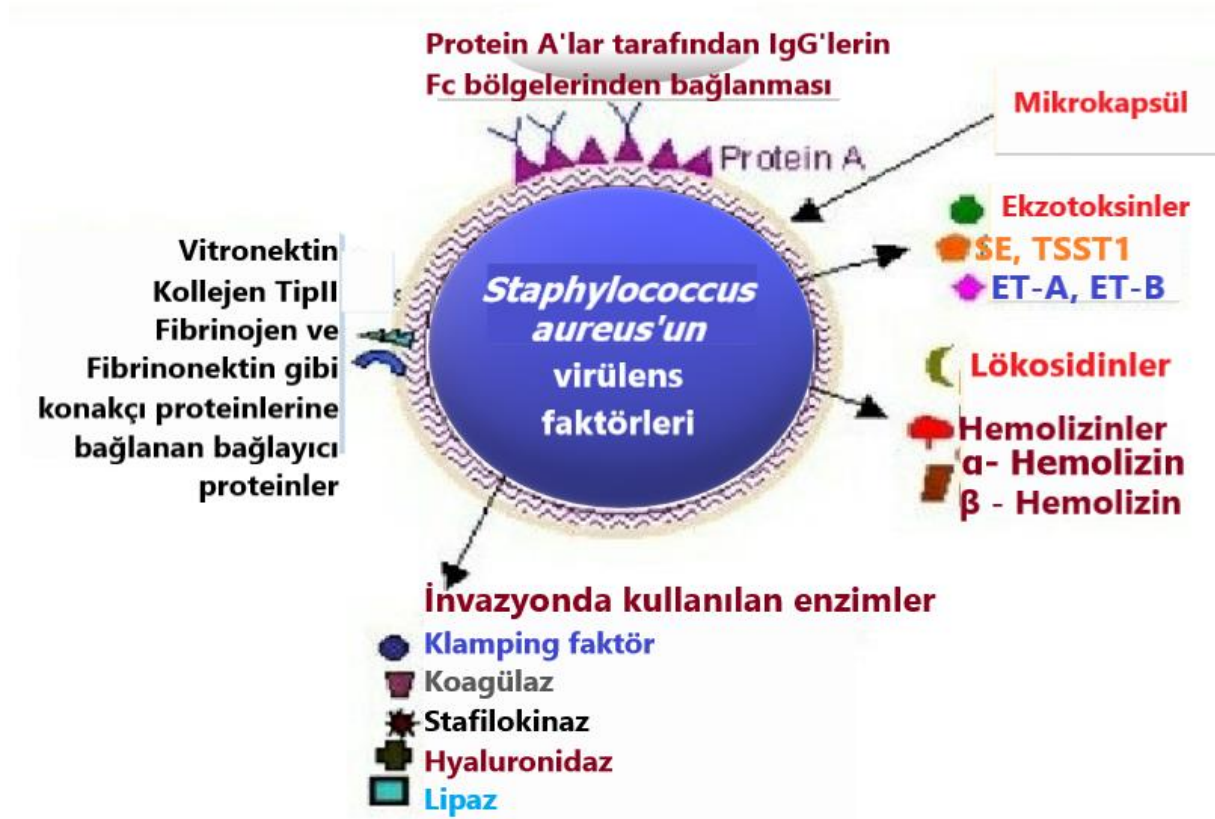
pH 5,3'de, 30 °C'de, % 9,2 NaCl içeren kürlenmiş jambonda ve hatta 10 °C'de ve pH 5,5'in altında oluşturulabildiği saptanmıştır. Enterotoksin üretimi aerobik ortamda, anaerobik ortama göre daha kısa bir sürede gerçekleşmektedir (Loir ve ark., 2003). Tablo 2'de *S. aureus*'un üremesi ve toksin oluşturması için gerekli optimal şartlar gösterilmiştir.

Tablo 2. *S. aureus*'un üreme ve toksin oluşturması için gerekli koşullar (Erol, 2007)

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

2.5. Virülens faktörleri

S. aureus birçok virülens faktör barındırmaktadır. Konak hücrelerde kolonize olmayı yöneten yüzey proteinleri, dokularda bakteriyel yayılmayı yöneten lökositin, kinaz, hyalüronidaz gibi invaziv etkenler, kapsül ve protein A gibi fagositozu inhibe eden yüzey faktörleri bunlardan bazılarıdır. Bunlarla birlikte fagositozdan kurtulmayı kolaylaştıran karetonoidler, katalaz üretimi gibi biyokimyasal özellikleri, konak immün sisteminden saklanmayı sağlayan koagülaz enzimi bulunmaktadır. Yine ökaryotik hücre membranlarını lize eden hemolizin, membran yıkımlayıcı toksinlerden lökotoksin, konak dokularını yıkımlayan ve diğer taraftan stafilokokkal hastalıkların semptomlarını şiddetlendiren SE'ler ile toksik şok sendrom toksini (TSST-1), eksfoliyatif toksinler (ETs) gibi ekzotoksinler üretirler. Ayrıca antimikrobiyal ajanlara karşı doğal veya sonradan kazanılmış direnç mekanizmaları vardır (Todar, 2018). *S. aureus*'un bazı virülens faktörleri Şekil 1'de şematik olarak gösterilmiştir (Anon, 2018).



Şekil 1. *S. aureus*'un virülens faktörlerinin şematik görünümü (Anon, 2018)

2.5.1. Kapsül

S. aureus, konak immun yanıtından korunmak için birçok mekanizma geliştirmiştir. İzolatlardan bir kısmının, fagositoza karşı direnç gösteren, bakteriyel yüzey bileşenlerini, fagositik hücreler tarafından tanınmasından ve opsonin yanıtından etkin bir şekilde koruyan, polisakkarit yapıda bir kapsül oluşturduğu tespit edilmiştir. Özellikle, invitro ortamda mukoid koloni oluşturan izolatların kapsüle sahip oldukları belirlenmiştir (Kuipers ve ark., 2016).

Bakteriyel hücre duvarını en dıştan çepeçevre saran bu polisakkarit yapıdaki kapsülün, kapsüller polisakkarit 5 (CP5) ve kapsüller polisakkarit 8 (CP8) olmak üzere iki ana serotip özellik gösterdiği belirlenmiştir. Bu kapsüllerin, tekrarlayan N-acetyl mannosaminuronic acid, N-acetyl L-fucosamine ve N-acetyl D-fucosamine trisakkarit ünitelerini ve bu üniteleri birbirine bağlayan şekerler ve asetilasyon alanlarını birbirinden ayıran, glikozidik özdeş bağlar içerdiği tespit edilmiştir (Jones, 2005).

S. aureus'un CP5 ve CP8 yapılarını ekspere etmesinin, invivo şartlarda hayatta kalma şansını ve virülensini arttırdığı bildirilmektedir. CP5, fagositoz ile bakterinin inhibisyonu sağlandıktan sonra bile, fagositlerin *S. aureus*'u intrasellüler olarak öldürmelerinden korumaktadır (Kuipers ve ark., 2016).

2.5.2. Slime Tabakası

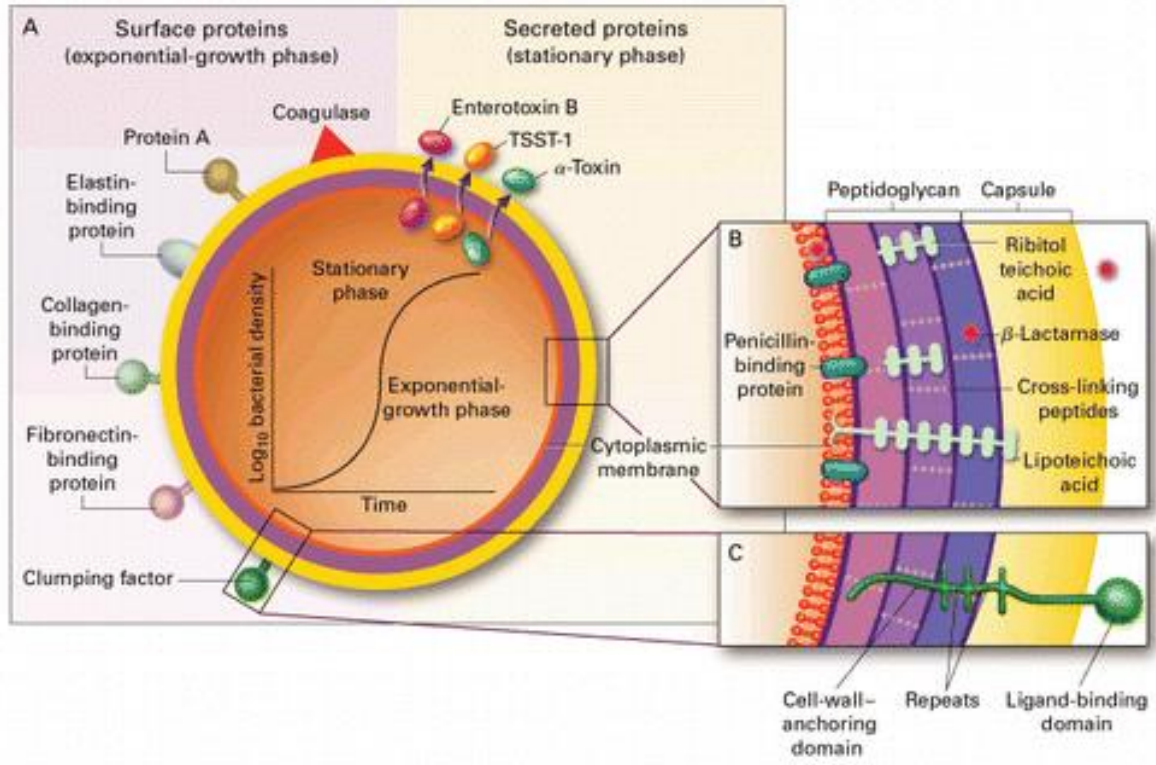
Pek çok stafilokok türü ile birlikte *S. aureus* da, yabancı cisimlere, plastik metal yüzeylere, özellikle biyomedikal ekipmanlara yapışmasında, kolonize olmasında önemli rol oynayan ve immun sistem üzerinde birçok farklı etkiye sahip bir slime tabakası üretir (Drewry ve ark., 1990). Bu slime tabakasının D-galaktoz, D-mannoz, D-ksiloz, D-galakturonik asit, D-galaktozamin ve D-glukuronik asit gibi mono ve polisakkaritler, protein ve küçük peptitlerden oluştuğu tespit edilmiştir (Rozgony ve Seltman, 1985).

Slime tabakası, hücrel immun yanıtı, fagositozu ve degranülasyonu önler. Bakteriye kemotaksis, opsonizasyon ve lenfositlerin aktivasyonundan korur. Slime tabakası, antimikrobiyal direnç mekanizmasında da rol oynadığı için, slime üretebilen suşlarla oluşan enfeksiyonların daha güç tedavi edildiği bildirilmektedir. Biyofilm terimi ile de adlandırılan bu tabaka sayesinde *S. aureus*, yüzey gerilimini değiştiren ajanlara, proteazlara ve hatta sıcaklığa karşı direnç geliştirir. Antimikrobiyal ajanların, biyofilm oluşturabilen *S. aureus* izolatları ile etkin mücadele edilebilmesi, biyofilm tabakasına nüfuz edebilmelerine bağlıdır (Koneman ve ark., 2006).

2.5.3. Hücre Duvarı

Stafilokokların hücre duvarındaki asıl yapı, hücre duvarı ağırlığının yarısını oluşturan peptidoglikan tabakadır. Bu tabakanın, enfeksiyona maruz konakçıda, monositlerden sitokin salınımı, trombositlerin agrege olmaları ve yangı bölgesine nötrofillerin çekilmesine sebep olduğu gösterilmiştir. N-asetilmuramik asit ve N-asetilglukozaminin glikan zincirleri tabakalarının çapraz bağlanması ile oluşturulur. Bakterinin lizozime dirençli olmasındaki asıl sebebin, bu bağlanma şekli olduğu düşünülmektedir. Bakteriye şekil vermenin yanı sıra esnek olabilmesini sağlar. Bu tabaka insan somatik hücrelerinde bulunmamaktadır. Bu yüzden antimikrobiyal ajanlar için iyi bir hedeftir (Koneman ve ark., 2006).

Hücre duvarında bulunan ikinci önemli bileşen teikoik asittir. *S. aureus*'ta bu bileşen poliribitol fosfat moleküllerinden oluşur. Bol miktarda fosfat içerir. Mukozalarda spesifik reseptörlere bakterinin bağlanabilmesini sağlar. Hücre membranının dış yüzeyine bağlı olarak yerleşmiş olan teikoik asitlerde ise, diğerlerinden farklı olarak gliserol fosfat molekülü ağırlıklı durumdadır. Teikokik asit, infekte konakçı organizmasında, monosit ve makrofajlardan interlokin-1 salınımı, komplemanın aktifleştirilmesi, antikor salınımı ve kemotaksis gibi immun sistem yanıtlarını uyarıcı etki gösterir. Bakterinin esnekliğine katkı sağlar. Dış etmenlere karşı dayanıklı ve sert bir özellik göstermesine katkıda bulunur (Baird-Parker, 1990, Şekil 2).



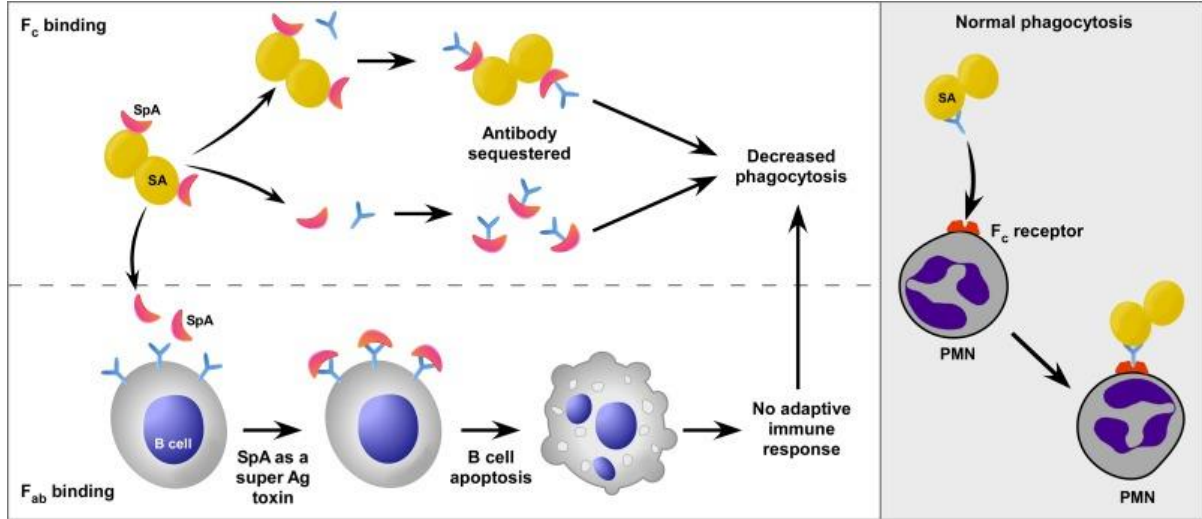
Şekil 2. *S. aureus*'un patojenitesinde rol oynayan yapısal ve salgısal ürünleri A: Logaritmik çoğalma fazında üretilen yüzey proteinleri, durgunluk fazında salgılanan toksinler, B: Sitoplazmik membranın enine kesiti, C: Clumping faktörün enine kesiti (Youssef ve Molony, 2017)

Stafilokokkal protein A (SpA), *S. aureus* dışında diğer Stafilokok türlerinde ve Mikrokoklarda bulunmayan bir protein komponentidir. Bu yüzey proteininin 42 kDa ağırlığında olduğu ve hücre duvarının % 7-8'ini kapsadığı bilinmektedir. SpA'nın, biri peptidoglikan tabakasına kovalent bağlar ile bağlanmış olan, diğeri bakterinin herhangi bir komponentine bağlanmayıp hücre dışına salınan iki türü tespit edilmiştir (Kobayashi ve DeLeo, 2013).

S. aureus tarafından serbest olarak salınan veya bakterinin yüzeyinde bulunan SpA molekülleri, konakçı tarafından salgılanan IgG antikorlarının Fc bölgelerine bağlanarak opsonofagositozisi bloklar. Böylece fagositoz kapasitesinin azalmasına sebep olarak normal fagositozdan korunmuş olur (Weigelt ve ark., 2010). Bunun dışında, bir başka alternatif yol olarak SpA, B hücrelerinin Fab bölgelerine bağlanır. B hücrelerinin ölümünü indükleyerek, *S. aureus*'a özgül antikor üretilmesinden korunmuş olur (Kobayashi ve DeLeo, 2013).

S. aureus'a karşı aşı geliştirme çalışmalarında, SpA molekülü taşıyan mutant suşlarla aşılınmış bireylerde, aşılamaı takiben *S. aureus* USA300 epidemik suşu ile deneysel

enfeksiyon oluşturulmuştur. Deneysel enfekte bireylerde *S. aureus*'un SpA molekülünün konakçı antikorları Fc ve/veya Fab bölgelerine bağlanma kapasitelerinin düştüğü gözlemlenmiştir. Bu sonuç, *S. aureus*'un SpA aracılıklı immun sistemden kaçış mekanizmasına karşı yeni tip aşı geliştirme çalışmalarına hız katmıştır. *S. aureus*'un SpA aracılıklı konak immun sisteminden kaçış mekanizması Şekil 3'de gösterilmiştir (Kobayashi ve DeLeo, 2013).



Şekil 3. *S. aureus*'un SpA aracılıklı konak immun sisteminden kaçış mekanizması SA: *S. aureus*, Ag: Antijen, PMN: Polimorf nükleer lökosit (Kobayashi ve DeLeo, 2013)

2.5.4. Enzimleri

S. aureus suşlarının büyük çoğunluğu, sebep oldukları lokalize enfeksiyonların semptomlarını, dokuların yıkılmasını ve lezyonların ilerlemesini teşvik eden enzim ve toksin özelliklerini birlikte barındıran bir çok ekstrasellüler ürün üretirler (Weigelt ve ark., 2010).

Koagülaz: Koagülasyon, pıhtı içinde istilacı bakterileri yakalamak ve hareketsiz hale getirmek için mikrobiyal patojenlere karşı, konakçı tarafından geliştirilmiş kalıtsal bir savunma mekanizmasıdır (McAdow ve ark., 2012). Koagülaz enzimi plazmanın pıhtılaşmasına yol açan bir enzimdir. (Weigelt ve ark., 2010). Stafilokok cinsi içinde koagülaz enzimi pozitif olarak tanınan dokuz tür bulunmaktadır. Bunlar:

S. aureus, *S. aureus* subs. *anaerobius*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. lutrae*, *S. pseudintermedius*, *S. lugdunensis* ve *S. schleiferi* subsp. *coagulans*'tır (Becker ve ark., 2014).

S. aureus hücre duvarında bağlı halde olan koagülaz, plazmadaki fibrinojeni fibrine dönüştürerek, geri dönüşümsüz olarak fibrin ağının artırılmasını teşvik eder ve apse formasyonunun oluşmasını hızlandırır. Bu apse etrafında oluşturulan fibrin ağı sayesinde, immun sistem hücrelerinden ve konakçının diğer savunma mekanizmalarından korunur (Weigelt ve ark., 2010).

S. aureus tarafından serbest olarak salınan koagülaz ise plazmada bulunan koagülaza tepki veren faktör (coagulase-reacting factor – CRF) ile birleşir. Bu reaksiyon sonucunda oluşan stafilotrombin fibrin oluşumunu destekler. Bu şekilde pıhtı tabakaları altında korunan *S. aureus*'lar fagositoza karşı kendilerini korumuş ve patojenitelerini artırmış olurlar (McAdow ve ark., 2012).

Koagülaz aktivitesinin test edilmesi, *S. aureus*'un identifikasyonunda önemli bir yere sahiptir. Moleküler olarak identifikasyonları konfirme edilmiş izolatlarla yapılan araştırmalarda, tüp içerisinde tavşan plazması ile bakteri süspansiyonunun karıştırılıp inkübe edilmesi şeklinde uygulanan tüp koagülaz testinin, spesifitesinin %98,1 ve sensitivitesinin %98,7 olduğu bildirilmiştir (Tiwari ve ark., 2008).

Katalaz: Katalaz bitki ve hayvan hücreleri ile birlikte aerobik bakteriler tarafından üretilen bir enzimdir. Stafilokok türlerinin Streptokoklardan ayırımı için in vitro olarak test edilebilmeye çok elverişlidir. İlk defa Gottstein, 1893 yılında yayınladığı bir makalede katalaz enzimine araştırmacıların dikkatlerini çekmiştir. Bundan otuz yıl sonra McLeod ve Gordon, katalaz üretimi ve reaksiyonları hakkındaki bilgileri ve görüşleri yayınlarak bakteriyel klasifikasyonda temel bir özellik olmasını sağlamışlardır (Mustafa Ibrahim, 2014).

S. aureus'un, konakçı immun sisteminden kurtulup hayatta kalması için sahip olduğu birçok mekanizmadan birisi olan katalaz enzimi, bakteriyi hidrojen peroksit (H_2O_2)'in nötralizasyon etkisinden korur. Katalaz enzimi sayesinde *S. aureus*, H_2O_2 'yi oksijen ve moleküler suya ayrıştırarak, fagositlerin sahip olduğu toksik özellikteki oksijen radikallerinden kurtulup, hayatta kalmayı başarır (Mustafa Ibrahim, 2014).

Lipaz: Adından da anlaşılacağı üzere lipaz enzimi, trigliseritleri oluşturan gliserol ve yağ asitleri arasındaki ester bağlarını hidrolize etmeyi katalize eder. *S. aureus*'un gliserol ester hidrolaz (Geh) lipazı, 72 kDa büyüklüğünde proenzim (proGeh) olarak salgılanır ve daha

sonra 42 kDa büyüklüğünde olgun enzim formunda işlev görür. Lipaz enzimi, *S. aureus* tarafından hücre dışı ortama salgılandığında, dokuların ana gövdesinin parçalanmasına ve devamında bakteri için gerekli olan besin maddelerinin serbest hale geçmesine yardımcı olarak, *S. aureus*'un patojenitesini artırır. *S. aureus*'un lipolitik aktivitesi sonucunda, insan plazmasında, linoleik asit gibi bazı yağ asitlerinin büyük miktarlarda açığa çıkmasına sebep olduğu bilinmektedir (Gotza ve ark., 1998).

Geh lipazının granülosit fonksiyonu ve bakterisidal lipidleri inaktive ederek, konakçı savunmasına karşı bakterilerin hayatta kalma şansını arttırdığı gösterilmiş ve bu şekilde virülens ile ilişkilendirilmiştir. Derin enfeksiyonlardan elde edilen *S. aureus* suşlarının, yüzeysel apselerden elde edilenden suşlardan çok daha fazla lipaz aktivitesi gösterdiği de tespit edilmiştir. Lipaz inhibitörlerinin, *S. aureus*'ta biyofilm oluşumunu azalttığı, lipaz üretiminden sorumlu genlerinin mutasyona uğratılmasının, peritoneal apse oluşumunun azalmasına neden olduğu belirlenmiştir (Hu ve ark., 2012).

Hyalüronidaz: Hyalüronidazlar, yüksek molekül ağırlıklı bir polimer olan, N-asetilglukozaminin tekrar eden disakkarid birimleri ile D-glukuronik asitten oluşan hyalüronik asit (HA)'in, β -1,4 glikozit bağımlı kesen bakteriyel enzimlerdir (Ibberson ve ark., 2014). Hyalüronik asit, memeli hücrelerinin plazma membranında sentezlenir ve salgılanır. Deride, iskelet dokusunda, göbek kordonunda, akciğerde, kalp kapakçıklarında, beyin ve benzeri bir takım diğer dokularda bol miktarda bulunur. Konakçı için, dokularda bulunan suyun osmotik basıncının ayarlanmasına, hücre çoğalmasına yardımcı olmak ve bir bağışıklık düzenleyicisi olarak davranmak gibi çok sayıda fonksiyonu gerçekleştirir (Hynes ve Walton, 2000).

Bakteriyel hyalüronidazlar tarafından HA'nın bölünmesi, β -1,4 glikozidik bağımlı yok edilmesi ile oluşur ve doymamış disakkaritlerle sonuçlanır. Hyalüronidazlar, hücreler ve dokular arasında yayılma yeteneği sağlaması nedeniyle, *S. aureus* için, temel virülens faktörlerden birisi olarak kabul edilmektedir (Laurent ve Fraser, 1992).

Deoksiribonükleaz: Birçok önde gelen patojen bakteri, konağın immün tepkisiyle mücadelede önemli bir role sahip nükleaz enzimleri salgılar (Olson ve ark., 2013). Enzim; mikrokokal nükleaz, deoksiribonükleaz ve DNaz gibi birçok farklı isimle anılmaktadır (Olson ve ark., 2013). DNaz enzimi bir fosfodiesteraz olup nükleotidleri 3'-fosfomononükleotidlere parçalar. DNA molekülleri eklenmiş besiyerinde, *S. aureus* izolatları, salgıladıkları DNaz enzimi ile ortamdaki DNA'ları hidrolize ederler. Böyle bir besiyerine *S.*

aureus ekimi yapıp bir gece inkübe edildikten sonra, örneğin 1 N hidroklorik asit (HCl) dökülüp ortam asitleştirildiğinde, üreyen kolonilerin etrafında opak bir zon oluştuğu gözlemlenebilir (Smith ve ark., 1969).

Isıya Dirençli Termonükleaz: *S. aureus*'un, termostabil bir nükleaz enzimi salgıladığı ilk defa 1956 yılında Cunningham ve arkadaşları tarafından tespit edilip isimlendirilmekle birlikte bu enzimin, *S. aureus*'un patojenitesindeki önemi ancak son yıllarda ortaya konmuştur (Cunningham ve ark., 1956, Olson ve ark., 2013). *S. aureus* suşlarının % 98-100'ünün salgıladığı bu termonükleaz, DNA ve RNA'yı parçalayabilmekte ve 30 dakika kaynatmaya direnç gösterebilmektedir. Hem hücre içi hem hücre dışı nükleolitik özelliğe sahiptir (Bergdoll, 1989).

Nükleaz aktivitesi, klinik izolatlar arasında oldukça korunmuş bir virülens faktörüdür. Kan kültürlerinde *S. aureus*'un doğrudan saptanması için bir belirteç olarak kullanılmaktadır. Düşük maliyetli ve uygulanması nispeten kolay olan termostabil DNaz testinin sensitivitesi (% 85-100) ve spesifitesinin (% 93-100) yeterince yüksek olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte tüp koagülaz testi ile aralarında yüksek derecede korelasyonun bulunduğu tespit edilmiştir (Lagace-Wiens ve ark., 2007). Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, nükleaz enziminin, *S. aureus*'da biyofilm oluşumunda bir modülatör olarak ek bir role sahip olduğu da gösterilmiştir (Kiedrowski ve ark., 2011).

Stafilokinaz: Stafilokinaz, *S. aureus*'un lizojenik suşları tarafından üretilen, 136 aminoasitten oluşan bir proteindir. Bir plazminojen bağlanma bölgesi ve bir serin proteaz alanı içermektedir. Bu şekliyle, yapısal olarak diğer plazminojen etkinleştiricilere benzemektedir. Stafilokinaz, plazminojenin aktivasyonunu sağlar. Plazminojen, fibrinolitik bir proteaz olan plasminin proenzimidir. Stafilokinaz-plazminojen kompleksi, fibrin için yüksek affiniteye sahip olup, etkili bir trombolitik ajandır (Collen, 1998).

Halen Stafilocok enfeksiyonlarında, Stafilokinazın rolü hakkında sınırlı bilgi vardır. Stafilokinaz, konakçı bağışıklık sistemi ile doğrudan etkileşime girer ve α -defensinlerin bakterisidal etkilerini ortadan kaldırır. *S. aureus*'un yüzey reseptörlerini konakçı plazminojeni ile bağlayarak ve tüm defensin faktörleriyle etkileşime girerek, konakçı immun sisteminin savunmasından kaçır. Böylece konakçı dokularının işgali kolaylaşmış olur (Jin ve ark, 2004).

Penisilinaz: Penisilinaz üreten *S. aureus* suşları, esasında diğer *S. aureus* suşlarına nazaran daha fazla virülent değildir. Ancak bir *S. aureus* suşunun penisilinaz üretmesi, onu

linik ve toplumsal epidemiyoloji yönünden önemli kılar. Penisilnaz enzimi, penisilin molekülündeki beta-laktam zincirini hidrolize edip bu molekülü inaktive eder. Penisilnaz üretimi, hücre bölünmesi sırasında replike olan ve bakteride ekstrakromozomal olarak bulunan plazmidler veya epizomlar tarafından kontrol edilir (Weigelt ve ark., 2010).

Lesitinaz: Lesitinaz enzimi, çoğu *S. aureus* suşu tarafından sentezlenir. İnsan serumunda bulunan lesitin lipoprotein kompleksini ayrıştırır. Lesitinaz reaksiyonu bir tür lipaz aktivitesidir. Benzer şekilde, yumurta sarısında da bulunan lesitin, Baird-Parker Agar besi yeri ortamına yumurta sarısı emülsiyonu katılarak, besi yerinde üretilen *S. aureus* kolonilerinin etrafında şeffaf bir presipitasyon zonu oluşması ile test edilmektedir (Matos ve ark. 1995).

2.5.5. Toksinleri

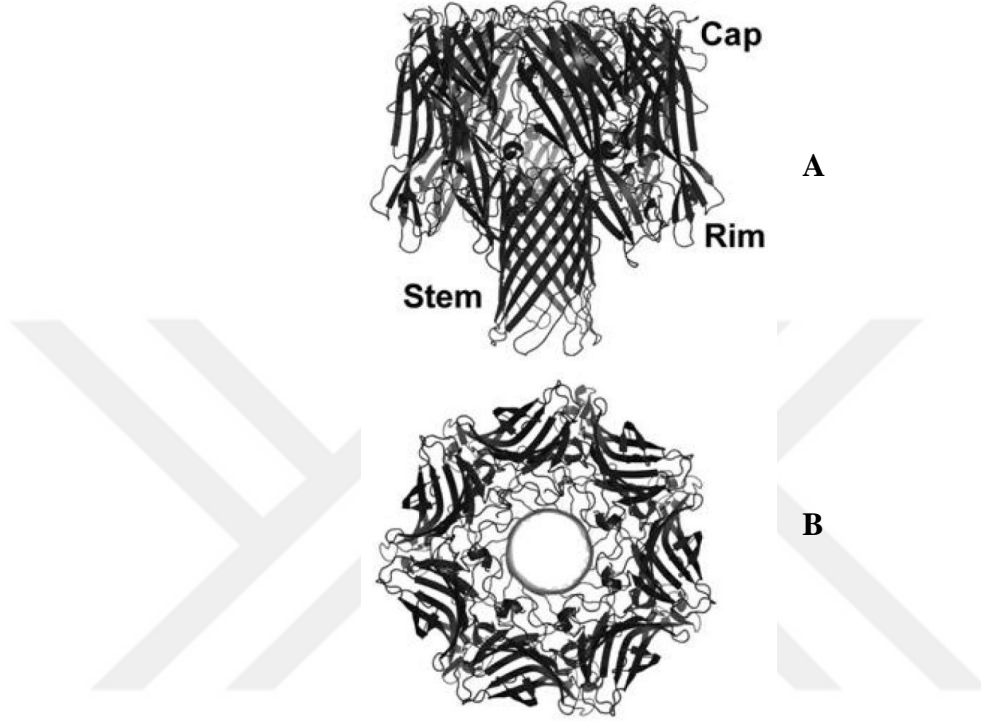
S. aureus tarafından gıdalarda veya konakçı hücre ve dokularında üretilen toksinlerin büyük çoğunluğu biyolojik membranlara zarar verir ve hücrelerin ölümüne yol açar. Bunun yanı sıra bu toksinler, konakçı savunma sistemini inhibe eder, savunma sisteminin *S. aureus*'u tanımasını engeller veya konakçı savunma hücrelerinin bakteriyi elemine etmesinin önüne geçer. Hücre ve dokularda hasara yol açan bu çok yönlü toksinleri dört ana başlıkta toplamak mümkündür. Bunlar: Sitolitik toksinler, eksfoliyatif toksinler, toksik şok sendrom toksini ve stafilokokkal enterotoksinlerdir (Otto, 2014).

Sitolitik Toksinler: Sitoplazmik membran, *S. aureus* tarafından üretilen çeşitli toksinlerle birlikte birçok bakteri toksininin hedefidir. Bu toksinler zar da gözenek oluşumuna neden olur ve hayati moleküller/metabolitler hücre dışına akar. Bu nedenle bu toksinler sitolitik olarak değerlendirilir. *S. aureus* çeşitli sitolitik toksinler üretir. Bunlar eritrositler ve/veya lökositleri parçalarlar. Eritrositleri parçalayanlar hemolizinler olarak bilinirken, lökositleri hedef alanlar lökotoksinlerdir (Otto, 2014).

α - (alfa) hemolizin

α -hemolizin, yaygın olarak α -toksin olarak da adlandırılır. Hücresel spesifitesinin geniş olmasından dolayı hem cilt nekrozu, hem de önemli ölümcül enfeksiyonlarda yara oluşumu nedeni olarak kabul edilmiştir. *S. aureus* α -hemolizini, konakçı hücre zarı üzerinde bir heptamerik yapıya bağlanabilen ve oligomerize olabilen, suda çözünen bir monomer olarak salgılanmaktadır. Ekstrasellüler olarak salgılanan toksin 293 aminoasitten oluşmakta ve yaklaşık 33 kDa ağırlığındadır. α -hemolizinin kristal yapısı Şekil 4'te gösterilmiştir. Bu yapı,

konakçı hücre membranında porlar oluşturarak, kalsiyum (Ca), potasyum (K), adenosin trifosfat (ATP) ve düşük molekül ağırlığa sahip diğer hayatsal moleküllerin hücre dışına akması ve hücrenin ölüme sürüklenmesine sebep olur. Hücre membranı lipitlerinde delik açarak, membran lipitleriyle reaksiyona girerek bu işlevlerini gerçekleştirir (Berube ve Wardenburg, 2013).



Şekil 4. *S. aureus*'un ürettiği α -hemolizinin yapısı A: Enine kesiti, B: Dikey kesiti, Stem: Hücre membranında açılan deliğe bağlanan kök kısmı, Cap: Hücre membranında açılan deliğin girişini sınırlayan bölge, Rim: Hücre membranı arayüz bölgesi (Berube ve Wardenburg, 2013)

Yapılan çalışmalar α -hemolizinin, epitel hücreleri, endotel hücreleri, T hücreleri, monositler, makrofajlar ve nötrofiller gibi bir dizi diğer hematopoietik hücre de dahil olmak üzere çok çeşitli insan hücre tiplerinde toksik etki oluşturabildiğini göstermiştir. *S. aureus* genomu üzerinde, α -hemolizin aktivitesinden sorumlu, 1620 baz çift uzunluğundaki genomik DNA fragman bölgesi tespit edilmiştir (Fairweather ve ark., 1983).

β - (beta) hemolizin

S. aureus tarafından üretilen β -hemolizin, α -hemolizinin aksine hücre membranı üzerinde gözenek oluşturmaz. Bunun yerine konak hücre membran lipiti olan sfingomiyelini

hidrolize eden nötr bir sfingomiyelinazdır. Hemolitik etkinliği için β -hemolizinin enzimatik aktivite göstermesi gereklidir (Huseby ve ark., 2007).

Sitotoksositeye yol açan mekanizma halen iyi anlaşılammıştır. Yüksek kolesterol içeren lipit (sfingomyelin) mikro alanlarda yoğunlaşır. Sentetik çift tabakalı lipit yapıların, sfingomyelinaz ile muamalesi sonucu, kolesterolden zengin mikroalanların kümelendiği görülür. İki katmanlı bu yapının stabilitesinin bozulması ve hücre membranının akışkanlığının değişmesinin hücre ölümüne sebep olduğu öne sürülmektedir (Vandenesch ve ark., 2012). Ayrıca toksinin, proliferen olan insan lenfositlerini de öldürebildiği gösterilmiştir (Huseby ve ark., 2007). β -hemolizinin eritrositleri lize edebilmesi, ancak düşük ısıya geçiş yapıldığında gözlemlenir. Bu da β -hemolizinin, en azından eritrositlere karşı etkinliğinin, diğer hemolizinden düşük olduğunu göstermektedir (Vandenesch ve ark., 2012).

δ - (delta) hemolizin

Hücre membran yapısını bozan δ - hemolizinler, bundan 60 yıl önce Wiseman tarafından saflaştırılıp isimlendirilmiştir. Bir hidrofilik ve bir hidrofobik yüzeylere sahip alfa heliks yapılı küçük bir amfipatik peptittir. Hemolitik aktivitesi üç farklı mekanizma ile açıklanmaktadır. İlk olarak, delta hemolizin hücre yüzeyine bağlanır ve kümeleşerek membranda porlar açar. İkinci olarak, hücre yüzeyine bağlanır ve membranın kavisli yapısını etkileyerek stabilitesini bozar. Üçüncüsü ise, yüksek konsantrasyona ulaştığında hücre membranında bir deterjan etkisi göstererek membranı çözündürür (Vandenesch ve ark., 2012). Bu grup sitotoksik amfipatik peptitler, PSM'ler (phenol soluble modulins) olarak yeniden isimlendirilmişlerdir. PSM'lerin 20-26 ve 44 aminoasit uzunluğunda üç gruptan oluştuğu belirtilmektedir (Queck ve ark., 2009).

γ - (gama) hemolizin ve iki bileşenli lökositinler

Alfa hemolizinin aksine, bu grup toksinler, elektroforetik hareketliliğe dayanarak sınıflandırılan ve S (slow, yavaş) ve F (fast, hızlı) olarak adlandırılan iki polipeptid içerir. Bu iki bileşenli toksinlerin protein yapıda oldukları ve *S. aureus*'un yüzey bileşenlerinin en baskın proteinleri olarak logaritmik üreme fazının geç dönemlerinde salgılandıkları tespit edilmiştir. Gama hemolisinler (Hlg), iki kombinasyonlu S bileşeni (HlgA ve HlgC) ile HlgB olarak adlandırılan F bileşeninden oluşur. Özellikle nötrofiller için toksik olan Pantone-Valentine lökositin (PVL) ise lökositin S-PV (LukS-PV) ile lökositin F-PV (LukF-PV)'den oluşmaktadır. LukED, LukGH, LukAB olarak isimlendirilen toksinler de bu iki bileşenli yapıyı gösterirler (Dumont ark., 2011).

Bu toksinler ve onların zarlarda por oluşturma mekanizmaları ayrı ayrı incelenmekle birlikte, çoğunlukla diğer toksinlere benzer şekilde çalıştıkları düşünülmektedir. Suda eriyen monomerler olan dört S bileşeni ile dört F bileşeninin her biri, sırayla hücre yüzeyine bağlanır. Daha sonra, hücre membranında açılacak delikten önceki bir yapı olan oligomerler oluşur ve oligomerlerin oluşumunu delik oluşumu takip eder. Bu lökotoxinler ile konakçı hücre yüzeyi arasındaki reaksiyonlar, fagositoz gibi süreçlerde, immun sistem hücreleri ile *S. aureus*'lar direk temasa geçtiklerinde gelişmektedir. Bu tür lökotoxinleri üreten suşlar, belirgin şekilde diğerlerine göre fagositoza daha dirençlidirler (Ventura ve ark., 2010).

LukED'ler tavşan eritrositlerini hemolize ederler. PVL'ler ise hemolitik deşillerdir. LukAB ve LukGH'ların da hemolitik aktiviteleri rapor edilmemiştir. Ancak gama hemolisin ve PVL'ler insan nötrofilleri için 10 ng/ml oranında bile yüksek derecede sitotoksik etki gösterirler. LukAB ve LukGH ise aynı hücre membranlarında, ancak yüz kat daha yoğun konsantrasyonda etki gösterebilirler. Yine de kabul gören görüşe göre Gama hemolisin, PVL, LukED, LukAB ve LukGH'lar konak hücre membranlarında sinerjik etkiye sahiptirler. Örneğin; *S. aureus*'ta LukAB sentezlenmesinden sorumlu *lukAB* geni noksanlığında, bakteri-fagosit etkileşimi sonucu bakterinin fagositik hücreleri öldürme yeteneğinin belirgin şekilde azaldığı, *lukAB*-negatif stafilokokların fagositler tarafından daha kolay öldürülebildiği tespit edilmiştir (Dumont ark., 2011).

Bazı deneysel enfeksiyon çalışmalarında, *S. aureus*'ların saha suşları ile hemolizin ve/veya lökotoxinleri üretemeyen mutant suşlar karşılaştırılmıştır. Mutant suşların sebep olduğu enfeksiyonlarda apseler, deride nekrotik lezyonlar, osteomyelitis, pnömoni, endoftalmitis, beyin apseleri, bakteriyemi gibi patolojik olayların şiddetinde azalmalar tespit edilmiştir (Vandenesch ve ark., 2012). Ayrıca yalnızca metisiline dirençli suşlarda değil aynı zamanda metisiline duyarlı *S. aureus*'larda (MSSA) da PVL'ler yüksek oranlarda tespit edilmektedir. Bu izolatlarda PVL'lerle birlikte, α -hemolizin, β -hemolizin, LukED, proteaz A ve proteaz B virülens faktörlerinin üretiminden sorumlu genlerin de yüksek oranda tespit edilebildiği bildirilmiştir (Sudağıdan ve Aydın, 2010).

Eksfoliyatif Toksin: Eksfoliyatif toksinler (ETs), çoğunlukla yenidoğan ve bebekleri etkileyen yüzeysel deri katmanlarının kaybı, dehidratasyon ve sekonder enfeksiyonlarla karakterize, Stafilokokkal haşlanmış deri sendromu (staphylococcal scalded skin sendrom, SSSS)'na sebep olan tek ajan olarak dikkat çekmektedir. ETs'ler, derideki dezmozomal proteinleri seçici olarak tanıyıp, proteaz ve esteraz aktiviteleri ile hidrolize eden, böylece intrasellüler köprüleri yıkımlayıp ayrılmalarına sebep olan, yüksek substrat özgüllüğüne sahip

serin proteazlarıdır. Ancak birincil olarak hücre ölümüne sebep olacak etki taşımamaktadırlar (Bukowski ve ark., 2010).

SSSS'de, organizmanın toksine karşı oluşturduğu antikor yanıtına bağlı olarak, deri lezyonları lokalize oluşabileceği gibi, tüm vücutta yaygın olarakta gelişebilmekte ve lezyonlar steril olarak gözlemlenmektedir. Sendromda erken semptomlar ateş, kırgınlık, yorgunluk, uyuşukluk ve iştah kaybıdır. Bu semptomları eritematöz döküntüler, patlamaya meyilli, büyük, içi sıvı dolu kabarcıkların oluşumu izler. Sekonder enfeksiyonlarla birlikte seyrettiğinde mortalite yükselebilmektedir (Ladhani, 2003).

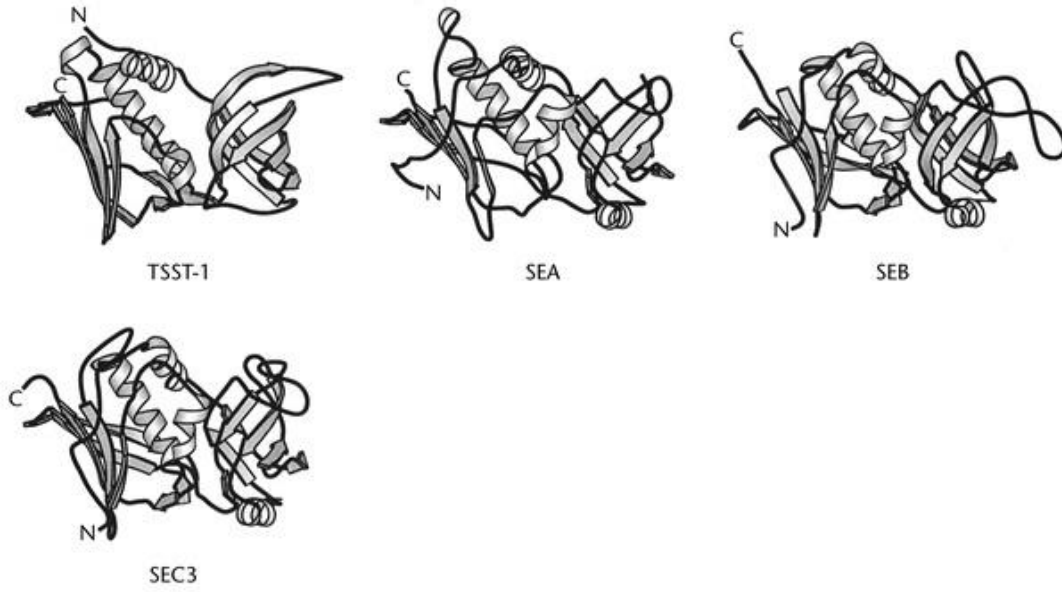
S. aureus'lar, A tipi (ETA) kromozomal, B tipi (ETB) plazmide bağlı genler tarafından kodlanan iki antijenik tipin yanı sıra, at deri enfeksiyonlarında tespit edilen C tipi (ETC) ve benzer özelliklere sahip olup farklı genler tarafından kodlanan D tipi (ETD) olmak üzere dört tip ekfoliyatif toksin salgırlar. ETA, belli bir seviyeye kadar ısıya dirençli, ETB ise ısıya duyalı olup, toksinlerin moleküler ağırlıkları 30 kDa civarındadır. Avrupa, Amerika ve Afrika'da sıklıkla rastlanan toksin üreten suşlardan % 80'nin üzerinde ETA izole edildiği, yalnızca Japonya'da ETB üreten suşlara daha fazla rastlandığı bildirilmektedir (Bukowski ve ark., 2010).

Toksik Şok Sendrom Toksini (TSST-1): *S. aureus*'un en iyi bilinen süperantijenlerinden biri olan toksik şok sendromu toksini (TSST-1), 22-kDa molekül ağırlığına sahip tekli polipeptid zincir yapısında bir protein olup IL-1, IL-2, TNF- α ve diğer sitokinlerin salınımını uyararak toksik şok sendromuna (TSS) neden olur (Otto, 2014).

TSST-1, kromozomal olarak lokalize olan *tstH* geni tarafından kodlanmaktadır. Proteolitik enzimlerle muamale ve bir saat kaynatma sonucunda bile aktivitesini belirgin derecede koruduğu bildirilmektedir. TSST-1, ilk önceleri enterotoksin F ve pirojenik C ekzotoksini olarak tanımlanmasına rağmen kusmaya neden olmaması ile enterotoksin süperantijenlerinden ayrılmış, daha sonraki çalışmalarda farklı bir toksin olduğu ortaya konulmuştur. Endotelial hücrelerde sıvı kaybı ve daha ileri sevilere ulaştığında sitotoksik etki oluşturur (Dinges ve ark., 2000).

TSS, ciddi ve mortalitesi yüksek bir hastalıktır. 1978 yılında Todd ve arkadaşları tarafından birçok organı birden etkileyen bir sendrom olarak tanımlanmış ve 1980'lerde tampon kullanımına bağlı bir salgın da oluşturmuştur (Otto, 2014). Sendromda ateş, diyare, deride dökülmeler, hipovolemik şok ve buna bağlı böbrek ve diğer organ yetmezlikleri sonucu ölüme kadar gidebilen bir tablo mevcuttur (Konemann ve ark., 2006).

Stafilokokkal Enterotoksinler: Stafilokokkal enterotoksinler (SE), 26-29 kDa arasında düşük molekül ağırlıklara sahip tek zincirli globuler polipeptidlerden oluşan bir protein grubudur (Bhatia ve Zahor, 2007, Şekil 5). Yapılarında en fazla tirozin, lizin, glutamik asit ve aspartik asit amino asitleri bulunmaktadır (Bergdol, 1989). İzoelektrik noktaları 7-8,6 arasında değişmektedir. Başlıca *S. aureus* tarafından salgılanan enterotoksinleri aynı zamanda, *S. intermedius*, *S. conhii*, *S. hyicus*, *S. capitis*, *S.lentus*, *S. xylosus* ve *S. epidermidis* türlerinin de salgıladıkları bilinmektedir (Bhatia ve Zahor, 2007).



Şekil 5. Çeşitli pirojenik toksin süperantijenlerinin üç boyutlu çizilen şerit diyagramları TSST-1: Toksik şok sendrom toksini, SEA: Stafilokokkal A enterotoksini, SEB: Stafilokokkal B enterotoksini, SEC3: Stafilokokkal C3 enterotoksini, N: N-terminal amin grubu, C: C-terminal karboksil grubu (Bohach ve ark., 1996)

Serolojik olarak, 5 temel stafilokokkal enterotoksin tipi (SEA, SEB, SEC, SED, SEE) tanımlanmıştır. Bunlarla birlikte 14 farklı toksin tipinden bahsetmek mümkündür (Kadariya ve ark. 2014). Bunlar SE benzeri toksinler (SE-like toxins, SEI), SEIG, SEII, SEIH, SEIJ, SEIK, SEIL, SEIM, SEIN, SEIO, SEIP, SEIQ, SEIR, SEIU olarak isimlendirilmiş olup yakın zamanda identifiye edilmiştir. Bu toksinlerin yapı ve fonksiyonlarına ilişkin çalışmalar devam etmekle birlikte bazılarının emetik aktivitesinin olmadığı da bildirilmiştir (Dinges ve ark., 2000, Nashev ve ark., 2007, Aydın ve ark., 2011).

Ancak SE benzeri toksinlerden SEG ve SEI toksinlerinin, gıda zehirlenmeleri, toksik şok sendromu ve stafilokokkal kızıl hastalığı ile ilişkili olup, bu vakalarda rol oynadıkları da

gösterilmiştir (Jarraud ve ark., 1999). Enfeksiyon etkeni suşların dışında, özellikle nazal taşıyıcılıkla ilişkili suşların, SE türlerinden SEG, SEI, SEH, SEM, SEN, SEO, SEU toksinlerine ait genleri daha fazla oranda taşıdıklarını ortaya koyan çalışmalar da mevcuttur (Nashev ve ark., 2007).

SE'ler, pepsin, tripsin, kimozin, papain gibi proteolitik enzimlere dirençlidir (Erol ve İşeri, 2004). *S. aureus* enterotoksin A (SEA) ve enterotoksin B (SEB) 100° C'de 90 dakika ve 120° C'de 30 dakika, SEC toksini ise 100° C'de 180 dakika ve 120° C'de 60 dakikaya kadar ısıya dirençli oldukları bildirilmektedir (Tibana ve ark., 1987).

Enterotoksijenik *S. aureus*'ların, gıdalarda toksin oluşturabilmeleri için uygun sıcaklık, nem, su aktivitesi, pH, redoks potansiyeli gibi şartları kullanarak 10⁶ kob/g-mL düzeyine kadar çoğalabilmeleri yeterlidir. Toksinlerin sulu ve tuzlu çözeltilerde iyi çözüldüğü gözlemlenmiştir. Termal şartlara gösterdikleri direnç, toksinin saflığı, serolojik tipi, yaklaşık toksin miktarı, ortam pH'sı vb. kriterlere bağlıdır (Tibana ve ark., 1987).

SE'ler, bir primat modelde kusma ve gastroenteritise neden olma, süperantijenite özelliği gösterme, orta derece ve üstü sıcaklığa ve pepsin sindirimine karşı dirençli olma, moleküller arası disülfid bağı benzerliği gösteren tersiyer yapısal benzerlik gibi önemli dört ortak özellik göstermektedirler (Dinges ve ark., 2000). Isıyla tahrip olan bir enterotoksinin yüksek pH'ya maruz bırakılarak muhafazasının ardından, tekrar aktive olabildiği bildirilmiştir (Schwabe ve ark., 1990).

Başlıca SE'lerin önemli karakteristik ve yapısal özellikleri Tablo 3'te açıklanmıştır (Loir ve ark., 2003).

Tablo 3. Stafilokokkal enterotoksinlerin (SE) önemli karakteristik özellikleri (Loir ve ark., 2003)

SE Tipi	ORF uzunluk (bp)	Prekürsör uzunluk (aa)	Olgunlaşmış SE uzunluk (aa)	Moleküler ağırlık (kDa)	İzoelektrik nokta	Referanslar
A	774	257	233	27,100	7.3	Betley ve Mekelanos, 1985
B	801	266	239	28,336	8.6	Johns ve Khan, 1988
C1	801	266	239	27,531	8.6	Bohach ve Sclievert, 1987
C2	801	266	239	27,531	7.8	Bohach ve Sclievert, 1989
C3	801	266	239	27,563	8.1	Hovde ve ark., 1990
D	777	258	228	26,360	7.4	Chang ve Bergdoll, 1979
E	774	257	230	26,425	7.0	Couch ve ark., 1988
G	777	258	233	27,043	5.7	Munson ve ark., 1998
H	726	241	218	25,210	bm	Su ve Wong, 1995
I	729	242	218	24,298	bm	Munson ve ark., 1998
J	806	268	245	28,565	8.65	Zhang ve ark., 1998
K	729	242	219	25,539	6.5	Orwin ve ark., 2001
L	723	240	215	24,593	8.66	Fitzgerald ve ark., 2001
M	722	239	217	24,842	6.24	Jarraud ve ark., 2001
N	720	258	227	26,067	6.97	Jarraud ve ark., 2001
O	783	260	232	26,777	6.55	Jarraud ve ark., 2001

bp: baz parçası, aa: aminoasit, bm: belirlenmemiş, kDa: kilodalton

Tüketilen gıdalarda, ortalama 20-100 ng toksin bulunması, abdominal kramplar, mide bulantıları, kusma, ishal ve nadiren (vakaların % 0,03'ünde) ölüm vakalarına sebep olur (Guillier ve ark. 2016). ABD'de ortaya çıkan bir okul salgınında, zehirlenmeye sebep olan çikolatalı kutu sütlerde SEA'nın miktarı, kutu başına 94-184 ng (ortalama 144 ng) olarak tespit edilmiştir (Evenson ve ark., 1988).

Gıda ve gıda hammaddelelerinde, ısıtma işlem öncesi toksin oluşumu engellenememişse, toksin oluşumundan sonra pişirme veya pastörizasyon ile toksin inaktive edilemez. SE'lerin oluştuğu gıdanın tüketilmesinden sonra, toksinlerin absorpsiyonu ve devamında gastroenteritis söz konusudur. Vagus sinirleri ve medulla oblongata, toksinler tarafından uyarılarak şiddetli kusma krampları oluşur. Mideyi geçip barsağa ulaşan SE'ler barsak epitel hücrelerini parçalarlar. Sonuçta intestinal villiler çok büyük hasara uğrar (Tibana ve ark., 1987, Loir ve ark., 2003, Becker, 2018).

SE'lerin gıdalarla alınmasını takiben insanlar üzerindeki etkisi kişiden kişiye değişiklik göstermektedir. Bazı vakalarda, aynı gıdayı tüketen farklı insanların bir kısmında semptomlara rastlanırken bir kısmında rastlanmadığı veya semptomların şiddetinde belirgin farkların olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, çok daha az miktarda toksine maruz kalan hasta insanlar, yaşlılar ve bebeklerde daha şiddetli semptomların olduğu gözlemlenmiştir (Becker, 2018).

Kontamine gıdaların tüketiminden yaklaşık 1-4 saat sonra belirtiler ortaya çıkar. Stafilokokkal intoksikasyonlarda ilk belirgin semptom ağızda salya artışıdır (Loir ve ark., 2003). Sindirim sistemindeki lokal nöral reseptörlerin SE'ler tarafından uyarılması sonucu, nervus vagus ve sempatik sinirler aracılığıyla beyindeki kusma merkezi uyarılır. Bu uyarım genellikle kusma ile sonuçlanır (Tamime, 2017). Devamında karın ağrısı, mide bulantısı ve kusma krampları başlar. Kusmuk içeriğinde ve gaitada mide-barsak kanamasına işaret eden kan kalıntıları görülebilir. Hastada şiddetli baş ağrısı vardır. Vücut ısısı düşüktür, halsizlik ve üşüme belirtilere eşlik edebilir. Mide ve barsakta şiddetli kramplar, bu kramplara bağlı olarak terleme dikkat çeker. Tıbbi müdahale gecikirse su kaybı fazlalaşır, nabız düşebilir ve şok tablosu gelişebilir. Genellikle hastalık, bir kaç gün içinde kendini sınırlayan bir tablo göstererek kaybolmaktadır (Loir ve ark., 2003). Daha ciddi vakalarda kan basıncı ve nabız sayılarında değişiklikler gözlemlenir. Ölüm nadiren (vakaların % 0,03'ünde) şekillenmekle birlikte, bebekler, yaşlılar ve kronik hastalıkları olan bireyler ciddi risk grubu hastalardır (Soriano ve ark., 2002).

SE'ler süperantijenik özellik gösterirler. Hücrelerde meydana gelen immun yanıt, membrana bağlı T hücre reseptörleri (T cell reseptör, TCR) tarafından bu antijenlerin tanınmasıyla başlar. Süperantijenler, antijen sunan hücreler üzerindeki MHC sınıf II (class II major histocompatibility complex) moleküllerine bağlanırlar. Böylece oluşan kompleksi TCR'ler tanır ve etkileşim gerçekleşir. Bunun yanı sıra süperantijenler, β -zinciri üzerinde nonspesifik farklı bölgelere bağlanmaları sonucu, geleneksel antijenlerden daha yüksek düzeyde T hücrelerini aktive edebilirler (Otto, 2014).

Bilinen klasik enterotoksinler (SEA, SEB, SEC, SED, SEE), stafilokokal gıda intoksikasyonlarının çok büyük bir kısmından sorumlu tutulmaktadır. Sonradan tespit edilip isimlendirilen SE'ler ise intoksikasyonların çok az bir kısmında tespit edilebilmektedir (Bhatia ve Zahor, 2007).

SEA toksini, asıl yüksek miktarda *S. aureus*'un logaritmik üreme fazının ilk döneminde sentezlenmektedir. Bu yüzden bakteri, optimum çevresel şartlara sahip olmasa bile, genelde intoksikasyon yapabilecek düzeyde SEA toksini üretebilmektedir. Stafilokokal

gıda intoksikasyonlarında en sık karşılaşılan toksinin SEA olmasının temel nedeni de budur (Kadariya ve ark., 2014). *entA* geni 771 baz çiftinden oluşur. Bir bakteriyofaj tarafından taşınır ve SEA'yı kodlar (Bhatia ve Zahor, 2007).

SEB, logaritmik üreme fazının sonunda ortaya çıkar. Bu yüzden sekonder metabolit olarak değerlendirilir. SEB kontamine bir gıdada, 20 saatten önce tespit edilememiştir (Erol, 2007). SEB, 900 nükleotid içeren *entB* geni tarafından kodlanır. Gıda zehirlenmelerinden izole edilen klinik *S. aureus* izolatlarında *entB* geninin kromozomal olarak yerleştiği tespit edilmiştir. SEB ile SEC1 toksinlerinin amino asit dizilimlerinde % 65 civarında benzerlik saptanmıştır (Bhatia ve Zahor, 2007).

SEC toksini de sekonder metabolit olarak ortaya çıkar ve SEB'ye benzer şekilde logaritmik üreme fazının sonunda oluşur. (Erol, 2007). Gıda zehirlenmelerinden en sıklıkla izole edilen ikinci önemli toksindir. SEC1, SEC2 ve SEC3 olmak üzere 3 farklı alt tipi vardır. SEC3, serolojik olarak SEC1 ve SEC2 ile çok yakın olmasına rağmen, moleküler olarak tamamıyla benzerlik göstermemektedir. *entC3* geni 801 baz çiftinden oluşmaktadır. SEC3 ile SEC1 arasında % 97 düzeyinde bir nükleotid sekans benzerliği saptanmıştır. SEC3 ile SEC2 arasında 4, SEC1 arasında ise 9 aminoasitlik bir fark vardır (Becker, 2018).

SED, gıda kaynaklı zehirlenmelerden izole edilen toksinler içerisinde en yaygın toksinlerden biridir. *entD* geni SED toksinini kodlar ve lokasyonunun bir penisilaz plazmidinde olduğu tespit edilmiştir (Becker, 2018). Ortamda çinko (Zn^{+2}) bulunması durumunda, SED süperantijeni, MHC sınıf II moleküllerine yüksek affinite göstermektedir (Zhang ve ark. 1998).

SEE toksinine stafilokokal intoksikasyonlarda çok sık rastlanmamaktadır. SEE, SED ve SEA'nın sekans analizlerinde yüksek düzeyde yakınlık tespit edilmiştir. Bu sekans analizlerine göre SEE ile SEA arasında % 81 benzerlik olduğu bildirilmektedir. SEE'yi *entE* geni kodlar (Becker, 2018).

Kremalı pastalarda *S. aureus*'un gelişebilme ve enterotoksin oluşturma karakteristiklerinin incelendiği bir çalışmada; öncelikle kremler 10^3 , 10^4 , 10^5 kob/g düzeyinde *S. aureus* ile kontamine edilmiştir. Ardından pastalar 4, 10, 18, 25 ve 30 °C'lerde muhafaza edilmiş ve 2, 6, 12, 24 ve 48 saat aralıklarla örnekler alınmıştır. Alınan örnekler mikrobiyolojik, serolojik olarak SE'ler yönünden incelenmiştir. Bildirilen sonuçlara göre 4 ve 10°C'lerde muhafaza edilen pastalardan alınan örneklerde 48 saat sonunda toksin oluşumu tespit edilmemiştir. 18°C'de 10^4 ve 10^5 kob/g düzeyinde kontaminasyonların olduğu numunelerde 24 saat sonunda SEA tespit edilmiştir. Yine 25 ve 30°C'lerde muhafaza edilen

pastalardan alınan örneklerde ise toksin oluşumunun 12. saatte başladığı bildirilmiştir (Alişarlı ve ark. 2003).

Benzer bir çalışmada da, otlu peynir yapımında kullanılacak olan sütün 1 mL'si 10^5 sayıda enterotoksin üretebilen referans suşlarla kontamine edilmiş, 3. günden itibaren tespit edilebilme seviyesine ulaşan toksinlerin, 90 günlük olgunlaşma periyodu boyunca artarak devam ettiği gösterilmiştir (Akkaya ve Sancak 2007). Tablo 4'te *S. aureus* gelişimi ile enterotoksin oluşumunu etkileyen faktörler ve bu faktörlerden etkilenen enterotoksin tipleri ayrıntılı olarak özetlenmiştir.

Tablo 4. *S. aureus* gelişimi ile enterotoksin oluşumunu etkileyen faktörler ve etkilenen enterotoksinler (Schelin ve ark., 2011)

Faktör	<u><i>S. aureus</i> gelişimi</u>		<u>Enterotoksin oluşumu</u>		Etkilenen Toksinler
	Optimum	Spektrum	Optimum	Spektrum	
Sıcaklık	35-41 °C	6-48 °C	34-40 °C	10-46 °C	SEA, SEB, SEC, SED
pH	6-7	4-10	7-8	5-9,6	SEA, SEB, SEC, SED, SEE
aw	0,99	0,83 ≥ 0,99	0,99	0.86 ≥ 0,99	SEA, SEB, SEC, SEH
NaCl	% 0	% 0-20	% 0	% 0-12	SEA, SEB, SEC
Oksijen	Aerobik	Aerobik Anaerobik	Aerobik	Aerobik Anaerobik	SEA, SEB, SEC, SEH
<i>Lactococcus lactis</i> ilavesi	-	-	-	-	SEC belirgin şekilde düşer, SEA etkilenir fakat durağan üreme fazında korunabilir

SE'lerin laboratuvar şartlarında, gıda hammaddeyi veya ürüne dönüştürülmüş gıdalarda tespit edilebilmesi büyük önem kazanmıştır. Bu alanda ELISA testleri, uygulanmasının kolay, sensitivitesinin yüksek olması nedeniyle en fazla kullanılan metot olarak görülmektedir. VIDAS, RIA (radio immun assay), ekstraksiyon/konsantrasyon, RPLA (reversed passive latex agglutination) yöntemleri de kullanım alanı bulmaktadır (Becker, 2018).

2.6. *S. aureus*'ların Antibiyotiklere Karşı Direnci

Antibiyotiklere karşı direnç kavramı, antibiyotik ajanların özellikle tarım, hayvancılık ve tıp alanlarında gereğinden fazla vakada, gereğinden fazla dozda kullanılmasının sonucunda ortaya çıkmıştır. Antibiyotikler, tedavinin yanı sıra gıda hammaddesi üretimi için yetiştirilen hayvanlarda canlı ağırlık artışı sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Bu hayvanlardan elde edilen gıdalar, toplumda antibiyotik direncinin yayılmasında önemli rol oynamaktadır. Bu şekilde bir toplumun topyekün sağlığı tehlikeye atılmış olmaktadır. Hastalık etkeninin kazandığı antibiyotik direnci, hastalarda tedavinin başarısız olmasına ve mortalitenin artmasına sebep olur. Bununla birlikte, tedavi süresi uzar, hastanın moral seviyesi ve iş gücü düşer, ciddi derecede ekonomik kayıplara neden olur. Nozokomiyal infeksiyonların en önemli etkenlerinden biri olan *S. aureus*'ların, çoklu antibiyotik direnç yeteneğini, çok hızlı kazandıkları görülmektedir (Şen ve Özdemir, 2016).

2.6.1. Penisilin Direnci

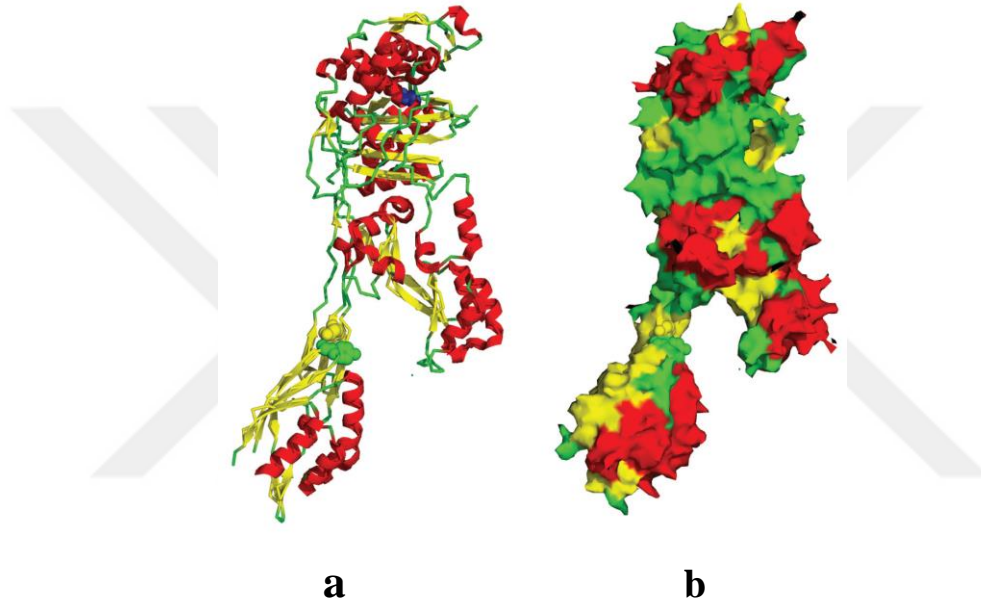
Antibiyotiklerin tedavilerde kullanılmadığı dönemde, *S. aureus* ile enfekte olan hastaların mortalitesi % 80'i geçmiştir (Skinner ve Keefer, 1941). 1940'ların başında penisilin G'nin tedavi seçenekleri arasına girmesi, prognozu dramatik olarak iyileştirdi. Ancak kısa süre sonra 1942'de dirençli suşlar fark edildi. Beta laktam grubundan olan penisilinler ilk antibiyotiklerden birisidir. Penisilinler, *Penicillium chrysogenum* türü küflerden üretilmiş olup, piyasaya sürülmelerinden sonra iki yıllık bir süreçte, *S. aureus* suşları tarafından direnç gelişmiştir. Direnç mekanizmasını oluşturan, β -laktam halkasını hidrolize eden ve ilacı inaktive eden bir penisilinaz / β -laktamaz enzimidir (Segalove, 1947).

β -laktamaz genelde, stafilokoklar β -laktam grubu antibiyotiklere maruz kaldığında sentezlenir. Enzim, β -laktam halkasını hidrolize eder. Bu enzim, tipik olarak bir plazmid üzerindeki büyük bir transpozon üzerinde bulunan *blaZ* tarafından kodlanmaktadır. Penisiline karşı direnç oranı, insan infeksiyonlarıyla ilişkili *S. aureus* klonlarında, artık % 90'dan daha fazladır. Tedavilerde esasen penisilin kullanılmamasının asıl nedeni de budur (Peacock ve Paterson, 2015).

2.6.2. Metisilin Direnci

S. aureus'ta metisilin direncinde rol oynayan moleküler ve biyokimyasal mekanizmaların çoğu, düzenleyici olaylar ve kilit proteinlerin yapısı da dahil olmak üzere yeterince aydınlatılmıştır (Peacock ve Paterson, 2015). MRSA'larda önümüze çıkan antibiyotik direnci, bu suşlar tarafından oluşturulan infeksiyonların tedavisi için belirgin ve

kalıcı sorun olarak karşımızda durmaktadır. Bu tür direnç, genellikle bir penisilin bağlayıcısı proteini (PBP2a) kodlayan ve doğal olarak bakteride bulunmayan bir genin elde edilmesi ile sağlanır. Bu direnç, inhibitör konsantrasyonlarda antibiyotik varlığında, hatta bu konsantrasyonun devamlı sağlanması durumunda bile, β -laktamların hedefi olan hücre duvarı biyosentezinin durdurulmasını engeller ve biyosentez devam eder (Şen ve Özdemir, 2016). MRSA’larda bulunan PBP2a’nın monomer yapısı ve yüzey topolojisinin şematize edilmiş hali Şekil 6’da gösterilmiştir (Paterson ve ark., 2014).



Şekil 6. Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)’larda bulunan penisilin bağlayıcı protein 2a (PBP2a)’nın yapısı şematik görünümü a: PBP2a’nın monomer yapısının görünümü, b: PBP2a’nın yüzey topolojisinin görünümü (Paterson ve ark., 2014)

PBP2a, *mecA* geni tarafından kodlanır. *mecA* geni, hareketli bir genetik element olan *SCCmec* üzerinde taşınır (Queck ve ark., 2009). MRSA’larda direnç kazanımına hizmet eden *SCCmec* gen kasetinin boyutunun küçük olduğu bildirilmektedir. Ayrıca aynı ortamda bulunan farklı suş ve hatta farklı türlere taşınabilecek şekilde, hareket edebilmesi sağlayan genler mevcuttur. Bu yüzden gerekli önlemler alınmazsa, dirençli klonların, hem tür içi, hem de türler arası boyutta büyüyerek, tehditin boyutunun artacağı tahmin edilmektedir (Ünal, 2006).

Penisilaza dirençli bir yarısentetik β -laktam olan metisilin, penisilin direncinin ortaya çıkması ve yaygınlaşması üzerine geliştirilmiştir. İlk önce “Celbenin” ismiyle pazarlanan

metisilin, 1959 yılında ilk olarak Londra'da bir hastanede kullanılarak tanıtıldı. Bir yıl sonra aynı klinikte, Haziran ve Ekim aylarında, üç farklı şahıstan dirençli suşlarının izole edildiği rapor edildi. MRSA'lar 1960'larda kısa süre içinde, metisilin bulunmadığı yerler de dahil olmak üzere, başka birçok ülkede ortaya çıktı ve şimdi dünya çapında her ülkede bulunmaktadır (Peacock ve Paterson, 2015).

β -laktam grubu antimikrobiyal ajanlar, bakteriyel hücre duvarı biyosentezini inhibe etmeyi hedef almaktadırlar. Kısaca, N-asetilglukosamin ve N-asetil muramik asit disakkaritler, bir β -1,4-glikosidik bağ yoluyla, peptidoglikan zincirinin indirgenme ucuna bağlanır. Yeni eklenen birim, bitişindeki bir peptidoglikan zincirinin peptid bağlarına, transpeptidasyon reaksiyonu ile çapraz bağlanır. Hem transglikosilasyon hem de transpeptidasyon, penisilin bağlayıcı proteinler (PBP'ler) tarafından gerçekleştirilir ki bu son reaksiyon, β -laktamların spesifik hedefidir. β -laktamlar, PBP'lerin hareket ettiği D-Ala-D-Ala peptidoglikan zincirinin substrat analogları olarak hareket ederek hücre duvarı biyosentezinin transpeptidasyon adımını inhibe eder (Peacock ve Paterson, 2015).

Penisilin bağlayan protein (PBP)'in azalmış afinitesinin, 1981 yılında tespit edilmesiyle, metisiline direnç mekanizması açıklığa kavuşturulmuştur. β -laktam grubu antibiyotikler, peptidoglikanların çapraz bağlanmasını engelleyen ve hücre duvarı biyosentezi için gerekli olan PBP'e bağlanmaktadır. MRSA'larda, taşınabilir genetik eleman olan stafilokokal kaset kromozomu (SCC*mec*)'nun kazanılmasıyla, β -laktamlara direnç kazanıldığı görülmektedir. PBP'nin değiştirilmesiyle oluşan PBP2a, *mecA* geni tarafından kodlanmaktadır. *mecA* geni de SCC*mec* tarafından taşınmaktadır. *mecA* geni sonuç itibarıyla β -laktam grubu antibiyotiklere ilgiyi azaltmaktadır. Böylece, β -laktam grubu antibiyotiklerin farklı inhibitör seviyelerinin varlığında bile, MRSA'da hücre duvarı sentezi devam etmektedir (Paterson ve ark., 2014).

Tüm β -laktamlara direnç kazandıran PBP2a'yı kodlayan *mecA* geni, keşfedildiği günden bu yana, MRSA'nın saptanması için referans standart olmuştur. Hatta yapılan son çalışmalarda *mecA* homologu olan ve korunmuş bölge olduğu tekrarlı testlerle ispat edilen yeni gen sekansları yayınlanarak, MRSA'ların tespitinde başarı oranı artırılmaya çalışılmaktadır (Stegger ve ark., 2012).

MRSA'lar, klinik vakalarda henüz çok yeni kullanıma giren birçok antibiyotiğe karşı çoklu dirence sahip olmaları nedeniyle halk sağlığı açısından ciddi bir tehlike olarak karşımıza çıkmaktadır. Toplum ve hastane kaynaklı MRSA klonlarının prevalansı farklı ülkelerde gittikçe artan bir grafik çizmektedir. MRSA'ların sahip olduğu direnç üzerine

yoğunlaşan çalışmalarla birlikte alternatif mücadele yöntemlerinin de araştırılması gerekmektedir (Peaerson ve ark., 2014).

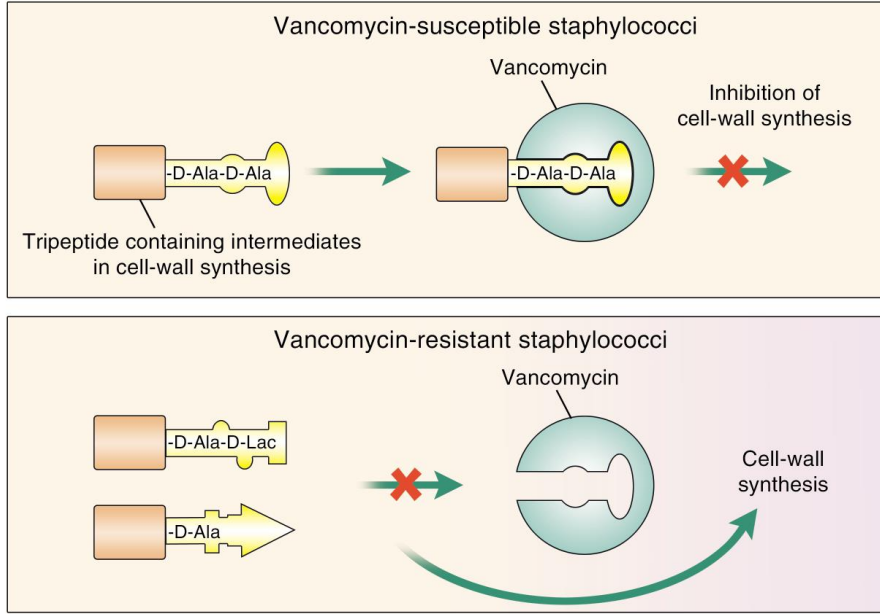
2.6.3. Vankomisin Direnci

Vankomisin ve diğer glikopeptid antibiyotikler, MRSA'ların neden olduğu infeksiyonlar için, günümüzdeki mevcut tedavi seçeneğidir. Bununla birlikte, MRSA'ların yüksek prevalansı, kronik ve ağır hasta hastalarda vankomisin kullanımının artmasına yol açmıştır. Sonuçta bu durum, glikopeptitlere duyarlılığı azalmış MRSA'ların ortaya çıkmasına neden olmuştur. ABD Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsüne göre, vankomisine orta derece dirençli *S. aureus*'lar, 4-8 µg/ml arasında minimum inhibitör konsantrasyonlarına sahip izolatlar iken, şu anda etkinliğin 1-2 µg/ml miktarında azaldığını gösteren klinik etkinlik raporları yayınlanmıştır. Vankomisin tedavisine cevap vermeyen hastalardan elde edilen tüm MRSA suşlarının, vankomisin duyarlılığı açısından doğru bir şekilde test edilmesi ve bu fenotiplerin gözden kaçırılmaması tavsiye edilmektedir (Appelbaum, 2007).

ABD'de yapılan bir çalışmada, 2001-2002 yıllarında hastanelerden izole edilen 75 MRSA izolatının tamamı vankomisin, linezolid, quinupristin-dalfopristin, trimetoprim-sülfametoksazole duyarlı bulunmuştur. Ancak aynı çalışmada 2003-2004 yıllarında izole edilen 134 MRSA izolatının 133'ü vankomisine değişik derecelerde duyarlı bulunurken, izolatlardan biri, vankomisinle birlikte linezolid, quinupristin-dalfopristin, trimetoprim-sülfametoksazol, rifampin gibi tedavide yüksek başarılı antibiyotiklerin tamamına dirençli bulunmuştur (Tenover ve ark., 2008).

Vankomisine duyarlılığı azalmış MRSA'ya bağlı enfeksiyonlar için tedavi seçenekleri sınırlıdır. Vankomisine dirençli *S. aureus* suşlarının, 2002 yılında ABD'de görülen bir klinik infeksiyonda ortaya çıktığı rapor edilmiştir. Bu ilk klinik infeksiyonda belirlenen izolatta *vanA* geninin kazanımı, vankomisine dirençli enterokok suşlarından, Tn1546 transpozonu ile transferi sonucu meydana gelmiştir (Appelbaum, 2007).

Bir enterokoktan *vanA* operonunun kazanılması, D-Ala-D-Ala'dan ziyade D-Ala-D-Lac dipeptidde sona eren bir hücre duvarı öncüsünün sentezine izin verir. Yeni dipeptidin, vankomisine karşı duyarlılığı önemli ölçüde azaltmıştır. Vankomisin varlığında, yeni hücre duvarı prekürsörü sentezlenir (Şekil 7). Bu yeni hücre duvarı prekürsörü vankomisine bağlanmaz, böylece peptidoglikan bileşiminin devam etmesi ve hücre duvarı sentezinin devamı sağlanır (Lowy, 2003).



Şekil 7. Vankomisine karşı *S. aureus* direncinin mekanizmaları Üstte vankomisine duyarlı *S. aureus* suşları, altta vankomisine dirençli *S. aureus* suşlarının kazandığı direncin mekanizmasının görünümü (Lowy, 2003)

2.6.4. Kinolon Direnci

Fluorokinolonlar ilk olarak 1980'lerde, Gram negatif bakteriyel infeksiyonların tedavilerinde kullanılmaya başlanmıştır. Aynı yıllarda, Gram-pozitif bakteriyel spektrumları nedeniyle, pnömokok ve stafilokokların neden olduğu bakteriyel infeksiyonları tedavi etmek için de kullanılmıştır. MRSA'lar arasındaki kinolon direnci, *S. aureus*'lardan daha çabuk ortaya çıkmıştır. Bu günkü durumda fluorokinolonların, stafilokoklarda tedavi edici ajanlar olarak kullanma kabiliyeti önemli ölçüde azalmıştır. Muhtemelen bir hastada, diğer bakteriyel patojenlerin neden olduğu infeksiyonları tedavi etmek için kinolonlar kullanıldığında, aynı anda bu hastada kolonize olan *S. aureus*'lar, subterapötik antibiyotik konsantrasyonlarına maruz kalırlar. Bunun sonucunda da, yeni direnç mekanizmaları geliştiren dirençli mutantlar oluşur (Lowy, 2003).

Ülkemizde 2014 yılında, 12 farklı hastaneden 397 MRSA izolatının antibiyotik direnç profillerinin değerlendirildiği bir çalışmada, izolatların %93,2'si kinolon grubu antibiyotiklere, %91,5'i gentamisine karşı dirençli bulunmuştur (Yıldız ve ark., 2014).

2.6.5. Trimethoprim-Sülfametoksazol Direnci

Sülfonamidler, 1932'den beri kullanılmakta olan ilk antimikrobiyal sınıftır. Trimethoprim ilk kez 1962'de İngiltere'de kullanılmıştır. Sülfametoksazol ile kombinasyon

halinde kullanımı ise 1968'de başlamıştır. Trimethoprim ve sülfametoksazol, timidin, purin, DNA ve bazı amino asitlerin üretimi için gerekli olan, tetrahidrofolat sentezini inhibe eden antimetabolitlerdir. Buna karşın *S. aureus*'larda, değiştirilmiş dihidrofolat redüktaz için plazmid kaynaklı transpozonlar tespit edilmiştir. 1992 yılında yapılmış kapsamlı çalışmalar, MRSA izolatlarının % 28'inin trimethoprime, % 35'inin de sülfonamidlere karşı dirençli olduğunu göstermiştir (Smith ve Jarvis, 1999).

Dünya çapında hızla artan antibiyotik dirençliliğinin önüne geçebilmek için mutlaka yeni mücadele stratejileri geliştirilmelidir. Gıda ve gıda hammaddelerinin ülkeler arası ticareti de göz önüne alındığında, sadece ülkesel bazda değil tüm dünya çapında, antibiyotik kullanımı kontrol altına alınmalıdır. Enfekte hayvanların tedavisinde antibiyotikler kontrollü kullanılmalı ve hayvanlarda büyüme artışı amacıyla kullanılması yasaklanmalıdır. Antibiyotik direnç genleri ve dirençli suşlar büyük bir hızla yayılmaktadır. Bunun önlenmesi için kontaminasyon kaynakları kurutulmalı, bulaşma zincirleri kırılmalıdır. İnfeksiyonlar daha oluşmadan, koruyucu önlemlerle engellenmelidir. Antibiyotik dışı tekniklerle tedavi olanakları bilimsel araştırmalarda daha fazla yer bulmalıdır. (Şen ve Özdemir, 2016).

2.7. Çevresel Ortamlarda, Canlılarda ve Gıdalarda Varlığı

Stafilokok cinsi bakteriler doğada (hava, su, toprak) yaygın olarak bulunmaktadır. Bununla birlikte *S. aureus*'un en önemli rezervuarı insanlar, memeli hayvanlar ve kuşların deri yüzeyleri ile nazofarengeal mukozalardır (Bhunja 2018). MRSA suşları en az üç orijinden kaynaklanmaktadır. Bunlar; hastaneler, hastanelere dışardan giren taşıyıcı insanlar ve gıda üretimi amacıyla yetiştirilen çiftlik hayvanlarıdır. Farklı zaman ve farklı çevre şartlarında bu bulaşmalar tekrarlanmakta ve sonuçta hastane izolatları çevresel ortamlardan, çiftlik hayvanlarından izole edilen suşlar insanlardan, insan izolatları da çeşitli amaçlarla yetiştirilen hayvanlardan, artan oranlarda tespit edilmektedir (Anon, 2009).

2.7.1. *S. aureus*'un Çevresel Ortamlarda ve Canlılarda Varlığı

Çevre şartlarına oldukça dayanıklı olan *S. aureus*'lar, toprak, hava ve sularda çok miktarda bulunmaktadır. Bu mikroorganizmalar, gıdaları yaşam ve besin kaynağı olarak kullanırlar, bu gıdalarda çoğalırlar. Gıdaları araç olarak kullanarak insan ve hayvanlara bulaşırlar (Bhunja 2018). Doğal olarak insan ve hayvanlarda en fazla burun ve boğaz boşluğunda, gastrointestinal kanal, rectum ve perineum bölgesinde, insan ve hayvan dışkılarında, ciltte apseli yaralarda ve sivilcelerde yoğun olarak bulunurlar (Anon, 2009).

S. aureus'un, insanlarda ana ekolojik yaşam alanı burundur. Ancak taşıyıcı kişilerin, hangi şartlara göre taşıyıcı oldukları tam olarak anlaşılamamıştır (Wertheim ve ark., 2005). Ayrıca kıl folliküllerinde kolonize olurlar ve ciddi bir antisepsi ile uzaklaştırılmazsa ömür boyu kalıcı olabilirler (Ten Broeke-Smits ve ark., 2010). *S. aureus*'un nazal taşıyıcılardan eradikasyonu, spesifik hasta (Örn; hemodiyaliz ve genel cerrahi hastaları) kategorilerindeki enfeksiyonu önler. Bununla birlikte, ortopedik ve cerrahi olmayan hastalarda, rastgele yapılan klinik çalışmalarda, *S. aureus*'un burun içindeki kolonizasyonuna engel olmanın, sonraki enfeksiyonları önlemek için etkili olmadığı görülmüştür. Bu nedenle, yeni koruyucu stratejiler geliştirebilmek için, *S. aureus* burun taşıyıcılığı ve enfeksiyonun ardındaki mekanizmalar aydınlatılmalıdır (Wertheim ve ark., 2005).

Birçok çalışma sonucunda araştırmacılar, gıda işletmelerinde alet ve ekipmanların temizliği ve dezenfektan kullanımının düzenli ve kontrollü hale getirilmesiyle birlikte, hijyenik kontrollerinin de düzenli olarak yapılmasını tavsiye etmektedirler (Aydın ve ark. 2007). İşletme içi ve çevresinin hava ve su ortamlarının hijyenik kalitesi de oldukça önemlidir. Keza, broyler yetiştirme barınaklarında yapılan bir çalışmada, hava sirkülasyonu içerisindeki bakteri yükünün %80'inin *Staphylococcus* spp. türleri olduğu tespit edilmiştir. Broyler barınağının 480 m uzağındaki havadan, 4000 kob/m³ *Staphylococcus* spp. izole edilmiş, barnaktan atılan hava ile bakterilerin en az 500 m uzağa taşınabildiği ve bu mesafeye taşınan bakterilerin canlılıklarını kaybetmedikleri gösterilmiştir (Schulz, 2007).

Sayın (2007), Siirt İlinde 15 lokantanın ekipman ve çevresel ortamlarından topladığı 135 sıvap örneğinden, tezgahların %13,3'ünün, buzdolabı kapı kollarının %13,3'ünün, musluk başlarının %7,7'sinin, havlulukların %7,1'inin, tencerelerin %7,7'sinin, tavaların %25'inin, işönlüklerinin %14,3'ünden *S. aureus* ile kontamine olduğunu bildirmiştir.

Aydın ve ark. (2007) İstanbul, Tekirdağ ve Edirne'de gıda işletmelerinin çevresel ortamlarından aldıkları toplam 70 sıvap örneğinin 18 (% 25,3)'inin, Fidan ve Ağaoğlu (2004) Ağrı'da lokanta mutfakların çevresel örnekleri ve doğrama tahtalarının % 40'ını, işlem tezgahlarının % 30'unu, işlem bıçaklarının %15'ini, buzdolabı kapı kollarının % 65'ini, servis masalarının %50'sini, kurulama bezlerinin % 15'ini, iş önlüklerinin % 10'unu Koagülaz pozitif stafilokoklar yönünden kontamine bulmuşlardır.

Tokyo'da 14 farklı binada faaliyet gösteren restoranlardan yakalanan 910 fare üzerinde yapılan bir araştırmada 165 (%18,1)'inin *S. aureus* taşıyıcısı olduğu tespit edilmiştir. Bu farelerden elde edilen suşların 35 (%21,2)'inin A, B, C ve D enterotoksinlerinin en az birini üretebildikleri tespit edilmiştir (Kato ve ark., 1995).

S.aureus insanlarda ve birçok hayvan türünde, çeşitli hafif şiddetli deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarına da neden olmaktadır. Hastane ilişkili *S.aureus* 'lar ve MRSA'lar, çoklu antibiyotik dirençleri nedeniyle, 40 yılı aşkın bir süredir tedavi uygulamalarında büyük güçlüklerle neden olmaktadır. İnsanlardan izole edilen yeni MRSA suşları, 1990'ların ortalarında hastane dışından da izole edildiği ve toplumla ilişkili MRSA'lar olarak adlandırıldığı görülmektedir (Doyle ve ark., 2012).

İnsanlarda enfeksiyonlara neden olan MRSA'lar için, hayvanların rezervuar olabileceği çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur. Kottler ve ark. (2010) bu amaçla sağlık çalışanı olmayan hane halkı ve bunların pet hayvanları, insan sağlığı çalışanı olan hane halkı ve bunların pet hayvanları, veteriner sağlığı çalışanı olan hane halkı ve bunların pet hayvanları olmak üzere üç popülasyondan MRSA ve MSSA taşıyıcılığı araştırmışlardır. Sonuçta örnekleme yapılan insanlarla pet hayvanlarından izole edilen suşların büyük oranda benzer olduğu, aynı suşların hem insanda hem de o kişinin pet hayvanında kolonize olduğunu belirlemişlerdir.

Bununla birlikte insanların da, hayvanlarda enfeksiyonlara neden olan MRSA'lar için rezervuar olabileceği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Michigan Veteriner Fakültesi Hastanesine 13 aylık bir süreçte başvuran 11 attan izole edilen MRSA'ların, gönüllü beş personelin üçünün burun kültür izolatlarıyla çok yakın ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu suşlar PFGE ile tiplendirilmiş ve bu çalışmanın hayvan hastanelerinde nozokomiyal epidemiyeye neden olan MRSA suşlarıyla ilgili ilk rapor olduğu bildirilmiştir (Seguin ve ark. 1999).

Çiftlik hayvanları ile ilişkili MRSA suşları, ilk kez 2003 yılında domuzlarda da saptanmıştır (Doyle ve ark., 2012). MRSA suşlarının bu şekilde her alandan yaygın olarak izole edilmesi, gıda güvenliği ve mesleki sağlık sorunları oluşturmaktadır. Tüketime sunulan et ve çiğ süt örneklerinde, küçük bir oranda bile MRSA'ların izole ediliyor olması, MRSA'ların gıda ile taşınma riskinin çok yüksek olduğunu göstermektedir. Hayvansal gıdalar, sağım esnasında, mezbahanelerde veya gıda işleme proseslerinin herhangi bir aşamasında, gıda ile temas eden personeller tarafından bu bakteriler ile çapraz kontaminasyona maruz bırakılmaktadırlar (Doyle ve ark., 2012).

2.7.2. *S aureus*'un Gıdalarda Varlığı

Hayvansal gıda hammaddeleri, sağlıklı hayvanlardan elde edildiklerinde, esas itibarıyla steril olarak kabul edilir. Ancak bakteriler çeşitli kontaminasyon kaynaklarından gıdalara bulaşır ve gıdayı kendileri için besin kaynağı olarak kullanırlar. Bu tür gıdaların

insanlar tarafından tüketilmesi sonucu patojen bakteriler veya tehlikeli metabolitleri, insanlarda gıda infeksiyonlarına ve intoksikasyonlarına sebep olur (Bhunia, 2018).

S. aureus'un gıdalara bulaşmasındaki kaynaklar araştırıldığında ilk önümüze çıkan, hammaddenin enfekte hayvanlardan elde edilmesidir. Takip eden süreçlerde gıdaların işlenmesi aşamalarında çalışan insanlar, kullanılan araç/gereçler kontaminasyona hizmet ederler. Gıdaların depolanmasında da kemirici hayvanlar ile haşereler, bulaşmada etkili diğer araçlardır (Çakıcı ve ark., 2015).

S. aureus'un nazal taşıyıcılık oranının genel populasyonda % 10 ila 40 arasında olduğu düşünüldüğünde, gıdalara bulaşmada en etkin kaynak insanlardır. Sağlıklı insanların burun mukozalarında bulunan stafilokoklar, ellere, parmaklara ve yüz bölgesine, kişinin kendisi tarafından taşınıp kolonize olabilir. Bu şekilde burun taşıyıcıları cilt taşıyıcısı olabilir. Etken, gıdalarda ve gıda işletmelerinde, elle gıda hazırlayan personelde, hastane personeli ve hastane ortamlarında da yaygın olarak bulunur. Nazal stafilokoklar, taşıyıcılarla çevreye yayılarak tehlike oluştururlar. Taşıyıcı olanlar ve özellikle gıda sektöründe elleriyle gıda hazırlayanlar, elle temas yoluyla, öksürme, hapşırma gibi solunum yolu vasıtasıyla, yiyecekleri stafilokoklarla kontamine ederek gıda zehirlenmelerinin önemli bir kaynağı olurlar. Genellikle bu bulaşma, gıdalara ısıtma işlem uygulamasından sonra oluşmaktadır (Hacıbektaşoğlu ve ark., 1993, Anon, 2009).

S. aureus ile kontamine gıdalar içinde zehirlenme açısından en riskli olanlar arasında, kanatlı eti ürünleri, soğukta muhafaza edilen pişmiş et ürünleri, kremalı pastacılık ürünleri, pastörize edilmemiş süt ve süt ürünleri sayılabilir (Anon, 2009). *S. aureus* tarafından üretilen ısıya dirençli SE'lerden kaynaklanan gıda zehirlenmeleri, her yıl ABD'de 240.000'in üzerinde hastalık vakasına neden olmaktadır. Sözkonusu vakaların, Avrupa'da her yıl 150.000'in üzerinde olduğu bildirilmektedir (Doyle ve ark., 2012).

Ülkemizde *S. aureus* ve MRSA'ların gıdalarda bulunması veya gıdaların sonradan bu etkenlerle kontamine olması ile ilgili birçok araştırma yapılmıştır. Alisharli ve Solmaz (2003) Van ili ve çevresinden topladıkları 100 adet çiğ süt örneğinde %31 oranında, Yücel ve Anıl (2011) Ankara'dan toplanan 190 süttten %35 oranında, Nassasra (2011) İstanbul'dan toplanan çiğ sütlerde %29,3 oranında *S. aureus* tespit etmişlerdir. Yücel ve Anıl (2011) Ankara'dan temin edilen 90 kaşar, tulum ve lor peynirlerinin %20,2'sinden, Bingöl ve ark. (2012) İstanbul'dan topladıkları 150 peynir çeşitlerinin 40 (%26,6)'ından, Gökmen ve ark. (2013) Konya'da gıda işletmelerinden topladıkları 80 pastörize beyaz peynir örneğinin 3 (%3,75)'ünden *S. aureus* izole etmişlerdir.

Et ve et ürünlerinde de benzer araştırmalar yapılmış ve benzer sonuçlara ulaşılmıştır. Aydın ve ark. (2011a) Bursa, Edirne ve İstanbul illerinden toplanan etlerden %10,4, Gündoğan ve Ataol (2012) Ankara'da marketlerden temin ettikleri 30 kıyma/tavuk eti örneğinden %20, Keyvan (2014) Ankara'da iki farklı mezbahannede 120 karkas örneğinden %12,5, Kök ve ark. (2007) Aydın İlinde, 100 fermente sucuktan %12 oranında *S. aureus* izolasyonu yapmışlardır.

Avrupa ölkelerinde de durum çok farklı değildir. Hayvanlarda ve gıdalarda MRSA'nın halk sağlığı açısından değerlendirilmesinin yapıldığı 2009 EFSA raporuna göre; Hollanda'da 2007-2008 yıllarında incelenen toplam 2217 et ü rü nü nün 264'ünde (%11,9) MRSA'ya rastlanmıştır. Bu etkenlerin dağılımına bakıldığında; 395 bifteğin 42'sinde (%10,6), 257 dana etinin 39'unda (%15,2), 324 kuzu etinin 20 (%6,17)'sinde, 309 domuz etinin 33'ünde (%10,4), 520 tavuk etinin 83'ünde (%16,0), 116 hindi etinin 41'inde (%35,3), 118 kuş etinin 4'ünde (%3,4), 178 av hayvanı etinin 4'ünde (%2,2) MRSA tespit edilmiştir (Anon, 2009).

Bhargava ve ark. (2011), ABD'de inceledikleri 156 sığır etinin 32 (%20,5), 76 tavuk etinin 19 (%25), 57 hindi etinin 17 (%26,4)'sinin *S. aureus* ile kontamine olduğunu, bu *S.aureus*'ların da sırasıyla 2 (%1,3), 3 (%3,9) ve 1 (%1,7)'inin MRSA olduğunu bildirmişlerdir. Mısır'da Khalifa ve ark. (2014) kasap ve marketlerden topladıkları 250 et ve et ü rü nü nün 25 (%10)'ini *S. aureus* ile kontamine bulmuşlardır.

Göröldüğü üzere tüketime sunulan et, süt, tavuk ve bunlardan hazırlanan ü rü nlerden yapılan ö rneklemelerden *S. aureus*'ların izolasyonu, bu bakterilerin gıda ü retiminin herhangi bir aşamasında gıdalara kolaylıkla bulaşabildiğini göstermektedir. Gıda ü retiminde çalışan personeller aracılığıyla devamlı kontaminasyona maruz kalan gıda maddelerinin, çiftlik hayvanları ile ilişkili türler de dahil olmak üzere, *S. aureus* ile kolonizasyon riski oldukça yüksektir. Hayvancılıkla ilişkili *S. aureus*'ların insanlara aktarılabilmeğine dair endişeler gittikçe artmaktadır (Ho ve ark., 2014).

Bu izolatların SE'leri, patojenitede etkili virölens faktörlerinden TSST-1, ekfoliyatif toksin, hemolizinler, DNaz, koagölaz ve biyofilm ü retilme kapasiteleri, toplumsal ve nozokomiyal infeksiyonların etkileşimi sonucu kazandıkları çoklu antibiyotik dirençleri, halk sağlığı açısından risk oluşturmaktadır (Gündoğan ve ark., 2012). Bu tehlikeli ajanların yayılmasını önlemek için, gıdaların ü retiminden tüketiciye ulaşana kadar geçen bütün aşamalarda, gerekli kişisel ve çevresel hijyen ve sanitasyon kurallarının gü lendirilmesi gerekmektedir (Ho ve ark., 2014). Son yıllarda halk sağlığı açısından oluşturduğu risk gittikçe büyüyen MRSA suşlarının gıda maddelerinde bulunma sıklığının, suşlar arasındaki genetiksel ve klonal ilişkilerin, bulaşma yollarının ortaya konması da büyük önem taşımaktadır (Aydın

ve ark. 2011a). Tablo 5'te farklı ülkelerde, 2009-2012 yılları arasında gıdalarda MRSA izolasyon oranlarını gösteren bazı yayınlar özetlenmiştir (Doyle ve ark., 2012).

Tablo 5. Farklı ülkelerde, farklı gıdalardan yapılan MRSA izolasyon oranları (Doyle ve ark., 2012)

Gıda	Rapor sayısı	Pozitiflik Oranı (%)	Ülkeler	Referanslar
Sığır	8	1,0–10,6	ABD, Japonya Danimarka, Kore, Kanada, Hollanda İran,	Pu ve ark., 2009, Hiroi ve ark., 2012 de Boer ve ark., 2009 Rhee ve Woo, 2010, Agero ve ark., 2012 Weese ve ark., 2010 Shahraz ve ark., 2012
Eti			İspanya	de Jonge ve ark., 2010
Dana	3	2,2–15,2	Hollanda	de Boer ve ark., 2009
Eti			İspanya	Lozano ve ark., 2009
Yaban	1	25		
Domuzu				
Koyun/kuzu	1	6,2	Hollanda	de Boer ve ark., 2009
Tavuk	12	0,7–43,8	ABD, Almanya, İspanya, Hollanda, Türkiye Japonya, Çin, Kanada,	Bhargava ve ark., 2011 de Jonge ve ark., 2010 Cuny ve ark., 2010; Fessler ve ark., 2011 Çıtak ve Duman, 2011 Hiroi ve ark., 2012 Ogata ve ark., 2012; Wang ve ark., 2013 Lozano ve ark., 2009
Hindi	3	35,3–51	ABD, Almanya, Hollanda	Bhargava ve ark., 2011 Fessler ve ark., 2011 de Boer ve ark., 2009
Ördek	1	50	Japan	Ogata ve ark., 2012
Tavşan	1	12,5	İspanya	Lozano ve ark, 2009
Balık	2	2,5–20	Japonya, Kore,	Rhee ve Woo, 2010 Hammad ve ark., 2012
İnek sütü	5	1,3–17,6	ABD, Brezilya Belçika	Prabhu ve ark., 2012 Huber ve ark, 2010, Vanderhaeghen ve ark., 2010

Tablo 5. Farklı ülkelerde, farklı gıdalardan yapılan MRSA izolasyon oranları (Doyle ve ark., 2012, devamı)

Gıda	Rapor sayısı	Pozitiflik Oranı (%)	Ülkeler	Referanslar
İnek sütü	8	1,0–10,6	ABD, İsviçre Hindistan,	Pu ve ark., 2009 Dias ve ark., 2011 Haran ve ark., 2012
Keçi sütü	1	3,5	İran	Ebrahimi ve ark., 2010
Manda sütü	1	2,5	Türkiye	Pamuk ve ark., 2012

2.8. *S. aureus*'un İzolasyon, İdentifikasyon ve Patojenite Belirleme Yöntemleri

2.8.1. *S. aureus*'un İzolasyon Yöntemleri

S. aureus, şüpheli materyallerden, çok farklı besi yeri ortamları kullanılarak izole edilebilir. Bunlar arasında; staphylococcus medium 110 (Chapman agar), Brolacin agar, Kranep agar, Vogel-Johnson agar, mannitol salt phenol red agar ve Baird-Parker agar sayılabilir (Anon, 2016).

Baird-Parker, 1962 yılında Stafilokok ve Mikrokokların sınıflandırılması amacıyla yaptığı çalışmalarla Baird-Parker agarı geliştirmiştir. Baird-Parker agar, gıda ve ilaçlarda koagülaz pozitif stafilokokların izolasyonu ve ayrıştırılmasında kullanılır. Besiyeri ortamına, azot kaynağı olarak kazein, pepton ve et özü eklenmiştir. Maya özütünün katılmasıyla, yine azotla birlikte aynı zamanda B₁₂ vitamini kompleksi gibi önemli besleyici maddeleri barındırır. Ortamda rekabetçi mikrofloranın çoğunu inhibe eden, lityum ve potasyum tellurit içerir. Stafilokokların gelişimini teşvik etmek amacıyla da glisin ve piruvat bulunur (Baird Parker, 1963).

Stafilokoklar, gelişmeleri ve çoğalmaları esnasında telluriti telluriuma indirgeyebilir, bu da kolonilerin gri-siyah renklenmesine yol açar. Baird-Parker agara besi yerinin otoklavlanıp 50-55°C'lere kadar soğutulmasının ardından ilave edilen tavşan plazma fibrinojeni, koagülaz aktivitesinin saptanması için kullanılır. Bu şekilde üretilen besi yeri Baird-Parker rabbit plasma fibrinogen agar (BPRPFA) olarak isimlendirmiştir. Koagülaz pozitif organizmalar, tellüritin indirgemesinden ve koagülazın etkisiyle fibrinojenin fibrine dönüşmesinden dolayı, etraflarında opak bir hale bulunan, siyahtan griye kadar değişen renklere görünürler. Bu besiyerinin kullanılması ek bir koagülaz testi ihtiyacını ortadan kaldırır (ISO, 1999).

Bazı araştışıcılar, örnek matrisinden daha fazla sayıda *S. aureus* izolasyonu yapmak, hasarlı, ortam stresine maruz bakteri hücrelerinin onarılmasını ve üreme şanslarının artmasını sağlamak için, sıvı besiyerlerinde selektif ön zenginleştirme metodu önermişlerdir (Lee 2003, Sürücüoğlu ve ark., 2011, Mernelius ve ark., 2013). Bu sıvı besiyerlerine, otoklavlandıktan sonra potasyum tellürit ilavesi yapılmaktadır. Gereken miktarda örnek, sıvı besiyerinde homojenize edildikten sonra aerobik ortamda, bazı araştışıcılara göre çalkalayıcı inkübatörde, 35 °C’de 18-24 saat inkübasyonu önerilmektedir. Bu şekilde uygulanan ön zenginleştirme ile bazı örneklerde % 46’ya kadar pozitifliğin arttığı bildirilmiştir (Lee 2003, Mernelius ve ark., 2013).

2.8.2. *S. aureus*’un İdentifikasyon Yöntemleri

Çalışmanın özelliğine uygun seçilen besi yerinde üreyen koloniler, morfolojik olarak değerlendirildikten sonra, Gram boyama, koagülaz, katalaz, DNaz, anaerobik şeker fermentasyon testleri, termonükleaz üretimi, lizostafin duyarlılığı gibi biyokimyasal testlere geçilir. Tüm bu testlere pozitif sonuç veren izolatlar *S. aureus* olarak identifiye edilir. Bu şekilde uygulanan izolasyon ve biyokimyasal testlerle identifikasyon ortalama 36-48 saat sürer (Bennett ve Lancette, 1998).

Bakterilerin tanımlanmasında kullanılan genotipik yöntemler, fenotipik yöntemlere göre tiplendirilebilirlik, tekrarlanabilirlik ve differensiyasyon bakımından daha üstün yöntemler olarak kabul edilmektedir (Kondoh ve ark., 2002). Patojen mikroorganizmaların tanımlanmasında tercih edilen genotipik tiplendirme yöntemi, mikroorganizma-konak ilişkisindeki konakçı yatkınlığının tespiti, epidemiyolojik olarak hastalıkların çıkış kaynaklarının belirlenmesi ve izolatlar arasındaki benzerlik düzeylerinin ortaya konulması gibi alanlarda da oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Özellikle Polimeraz Zincir Reaksiyonunu (PCR) esas alan uygulamalar; mikroorganizmalarda çeşitliliğin saptanmasında ve teşhiste büyük kolaylıklar sağlamaktadır (Aydın ve ark., 2011a).

Moleküler yöntemlerin yanı sıra, serolojik yöntemler de, hızlı ve nispeten güvenilir sonuçlar verebilmektedir. Bunlardan PBP2a’yı tespit edebilen lateks aglütinasyon testlerinin değerlendirildiği bir çalışmada, altın standart olarak *mecA* geninin PCR ile tespiti baz alınarak değerlendirme yapılmış, MRSA’ların tespitinde testin sensitivite ve spesifitesinin %100 olduğu bildirilmiştir (Louie ve ark., 2001).

S. aureus’ların termonükleaz üretiminden sorumlu *nuc* geninin, şüpheli materyallerde PCR yöntemi ile tespit edilmesi, direk olarak etkeni işaret etmesi bakımından oldukça kullanılıştır. Bakteri veya bakteri ürününün, materyalde çok düşük konsantrasyonlarda

bulunması durumunda bile çok hassas olan bu analiz yöntemi, yüksek duyarlılıkla yanıt verebilmektedir (Brakstad ve ark., 1992).

2.8.3. *S. aureus*'un Patojenite Belirleme Yöntemleri

Araştırmacılar son yıllarda yalnız patojenite de etkili ürünleri tespit etmek yerine, bu ürünlerin üretiminden sorumlu bakteriyel genleri tespit ederek, zaman ve hassasiyet yönünden avantaj sağlamaktadırlar. Örneğin; *S. aureus* kaynaklı intoksikasyonların çoğunlukla SEA, SEB, SEC, SED ve SEE'den kaynaklandığı çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmektedir. Araştırmacılar bu stafilokokkal enterotoksinleri tespit etmek yerine, *S. aureus* izolatlarında enterotoksin oluşumundan sorumlu genlerin (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* vb.) varlığını araştırmaktadırlar (Johnson ve ark., 1991).

Şüpheli materyallerden izole edilen *S. aureus*'ların metisilin dirençlerinin araştırılmasında, *mecA* geninin PCR ile tespit edilmesi altın standart olarak kabul edilmektedir (Dominguez ve ark., 1997).

Yine *S. aureus*'ların ürettiği serin proteaz A'nın, üretiminden sorumlu *sspA* geninin tespiti de benzer şekilde etkenin materyalde varlığını göstermektedir (Karlson ve Arvidson, 2002).

Bunlarla birlikte *S. aureus*'ların patojenite faktörlerinin üretiminden sorumlu birçok gen tespit edilmiştir. Bu genler patojenite araştırmalarında yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Örneğin; koagülaz üretiminden sorumlu *coa* geni, bağlanma ve biyofilm oluşumundan sorumlu *icaA*, *icaC*, *bap*, *atlE* genleri, toksik şok sendromu toksini geni *tst*, ekfoliyatif toksin A ve B genleri *eta* ve *etb*, alfa ve beta-hemolizin genleri *hla* ve *hly*, stafilokokkal ekzotoksin benzeri protein-1 geni *set1*, lipaz geni *geh* ve regülatör genler *sarA* ve *agrCA* genleri bunlardan bazılarıdır (Sudağdan ve ark., 2008).

Stafilokokkal enterotoksinlerin, besi yeri ortamından veya gıda matrislerinden tespitinde ELISA, başarı ile kullanılan bir yöntemdir. ELISA'da kullanılan çift antikorlu sandviç protokolünde, horseradish peroksidaz, bir enterotoksin için spesifik antikora konjuge edilmiştir. Antikor-enzim konjugatı, bir 2,2'-azino-di- (3-etilbenzotiazolin sülfonik asit)-H₂O₂ substrat çözeltisi ile analiz edilir. Enzimin antikorla birleştirilmesi, enterotoksinin önceden saflaştırılmış olması ihtiyacını ortadan kaldırır. Bu yöntem ayrıca, numunelerdeki enterotoksin miktarıyla doğrudan ilişkili absorpsiyon okumaları ile sonuçlanır. Tespit limiti oldukça tatmin edicidir. Homojenize edilmiş sıvı gıda matrisinin 1 ml'sinde 0,1-0,63 ng miktarındaki toksinler belirlenebilmektedir (Freed ve ark., 1982).

2.8.4. *S. aureus*'un Metisilin Direncini Belirleme Yöntemleri

S. aureus'un metisilin direncinden söz edildiğinde hemen hemen tüm β -laktamlara karşı direnci ifade edilmektedir (Paterson ve ark., 2014). Direnç belirleme yöntemlerinin doğru uygulanması ve uygulamaların teşvik edilmesi antibiyotik kullanımını azaltacak veya en azından spektrumunu daraltarak fayda sağlayacaktır. Bu yöntemlerin klinik sonuç üzerinde doğrudan bir faydası olmasa bile, özellikle klinik vakalarda antibiyotik yüklemenin azaltılması, direncin başlamasını ve yayılmasını yavaşlatabilir (Laxminarayan ve ark., 2013). Bu direncin belirlenmesinde kullanılan geçerli yöntemleri fenotipik ve genotipik yöntemler olarak iki grupta değerlendirmek mümkündür (Paterson ve ark., 2014).

Fenotipik yöntemlerin uygulanmasında, metisilin artık üretilmediği için daha çok oksasilin ve sefoksitin birlikte veya ayrı ayrı kullanılmaktadır. Etkenin saf olarak üretilmesinin ardından, antibiyotiklerle bir besi yeri ortamında direk olarak karşı karşıya getirilmesi esasına dayanır. Bu ortamda antibiyotik ajanın konsantrasyonu veya bakterinin dilüsyon oranı değiştirilerek ölçümler yapılır. Agar disk difüzyon yönteminde, McFarland standardına göre dilüsyonu yapılan saf kültür Müller Hinton agar besi yeri ortamına düzgün bir şekilde yayılır. Ardından disk şeklindeki kağıt materyallere emdirilmiş antibiyotik ajanlar agar üzerine sabitlenip pleyt inkübasyona bırakılır. Diskler etrafındaki üremenin inhibe edildiği alan ölçülerek değerlendirilir. E test yönteminde ise tüm aşamalar benzer olmakla birlikte agara yerleştirilen şerit şeklindeki bir striptin üzerinde işaretlenmiş alanlara, antibiyotik ajan değişik konsantrasyonlarda emdirilmiştir. Bu sayede agarda oluşan inhibisyon zonu, farklı konsantrasyon alanlarında farklı şekilde oluşacağı için daha hızlı değerlendirilebilir (Brown ve ark., 2005).

MRSA'larda β -laktamlara karşı direnç, β -laktam antibiyotiklere karşı afiniteyi düşüren değiştirilmiş bir PBP2a'yı kodlayan *mecA* genini taşıyan *SCCmec* ile sağlanır. Genotipik olarak metisilin direncinin belirlenmesinde *mecA* geninin PCR ile tespit edilmesi altın standart olarak kabul edilmektedir (Dominguez ve ark., 1997). Çünkü β -laktamlara karşı direnç seviyesinin genel olarak *mecA* geninin varlığı ile ilgili olması, *mecA* genini tespit edebilen bir genotipik yöntemin, bu direnç mekanizmasının hızlı ve net karakterizasyonunu sağladığı anlamına gelir. Son yıllarda PCR tabanlı yöntemler, referans laboratuvarlar tarafından rutin olarak *mecA* genini tespit etmek için standart metotlar olarak kullanılmaktadır. Zaman zaman işlevsel olmayan veya eksprese edilmemiş bir *mecA* taşıyan duyarlı suşlar da tespit edilir. Ancak genel olarak *mecA*'nın varlığı direncin ortaya konması için yeterli olarak kabul edilir. Bu şekilde direnç potansiyelini belirtmek ve MRSA'yı tanımlamak için bir marker olarak kullanılır. Tek bir amplifikasyon basamağı kullanan MRSA PCR analizleri, hem sağlam hem

de uygulanması kolay yöntemlerdir. Bununla birlikte bu tip basit deneylerin dezavantajı, yanlış negatif sonuçlara yol açacak inhibitörlerin varlığına karşı hassas olmalarıdır. Saflaştırılmış kültürler veya zenginleştirme solüsyonlarında üretilen *S. aureus*'larda *mecA* genini başarıyla tanımlayan ticari PCR kitleri de mevcuttur. (Brown ve ark., 2005).

2.9. Genetiksel İlişkilerin Belirlenmesinde PFGE Metodu

S. aureus için, tiplendirme prosedürlerinin çoğunun, epidemiyolojik olarak yararlı veriler elde etmek için başarıyla uygulanabileceği gösterilmiştir. Farklı araştırmalarda tiplendirme stratejileri karşılaştırılmıştır. Mevcut prosedürler, aynı izolatlarda uygulanarak, avantaj ve dezavantajları karşılaştırılmış, ilişkisiz bulunan izolatlar farklı frekanslarla gruplandırılmıştır. Tiplendirme prosedürlerinin bu karşılaştırmalı analizi, geleneksel metotlara karşı yeni tiplendirme stratejileri için bir referans sunmuştur. DNA tabanlı tiplendirme yöntemlerinin epidemiyolojik analizler için en uygun yöntemler olduğu sonucuna varılmıştır (Van Belkum ve ark., 1995).

İnfeksiyon ve intoksikasyonlara neden olan mikroorganizmaların tespit edilmesi, filyasyonlarının ve epidemiyolojilerinin ortaya konmasında çok büyük ilerlemeler sağlanmıştır. Teknoloji destekli yeni nesil analiz yöntemleri sayesinde, geleneksel yöntemlerin çok üzerinde sonuçlara ulaşılmıştır. Birbirinden çok uzak zannedilen suşların yakınlık dereceleri, yeni genetiksel analiz yöntemleri sayesinde, açıklıkla görüntülenebilir hale gelmiştir (Durmaz, 2007; Türe ve Altınok, 2013).

Bir salgın durumunda, fenotipik ve genotipik tekniklerin çoğu, yeterince ayırıcı, tekrarlanabilir, stabil veya kabul edilebilir sonuçlar verememektedir. Bu gereksinimleri yerine getiren tekniklerden PFGE yöntemi, eğer binary tiplendirme veya standardizasyon potansiyeline sahip daha hızlı tekniklerle kombine edilirse, daha fazla epidemiyolojik değerlendirmeye imkan sağlar (Weller ve ark., 2000).

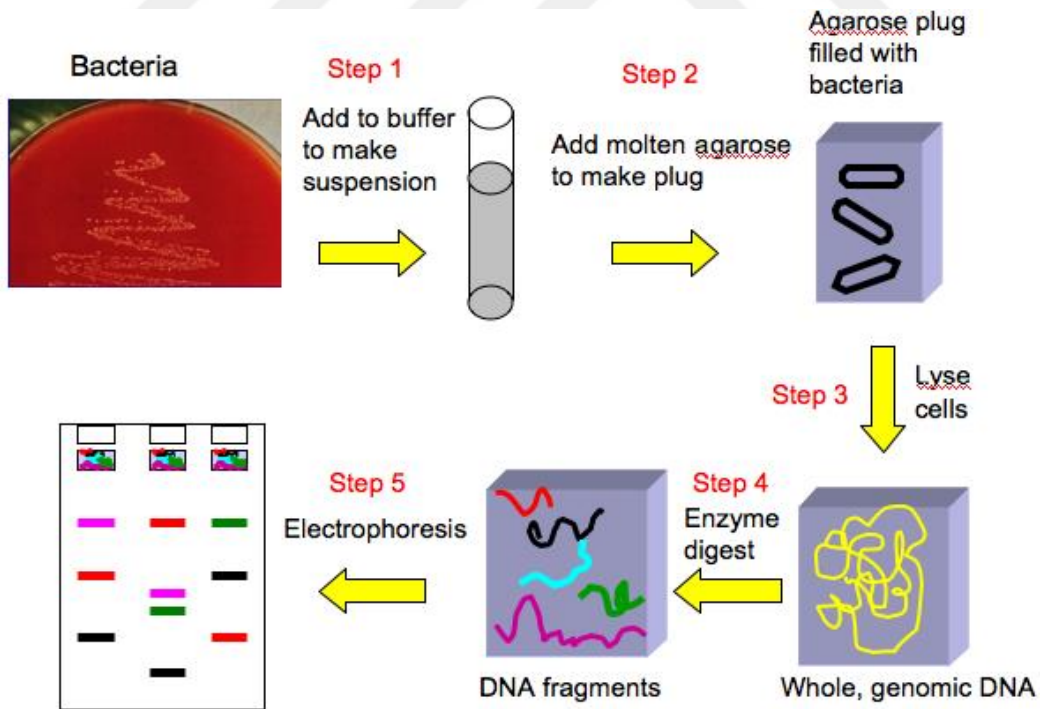
Standart jel elektroforez yöntemleri DNA moleküllerinin ayrıştırılmaları, boyutlarının bilinmesi ve görüntülenmeleri için kullanılan en yaygın yöntemdir. Moleküler biyolojide son yıllara kadar en üstün yöntemlerden kabul edilen standart jel elektroforezinde, 100 baz ile 50 kilobaz (kb) arasındaki DNA parçacıklarının, değişmeyen bir elektriksel akım altında ayrışması sağlanabilmiştir. 50 kb'ın üzerindeki ise jel ortamı içinde molekülleri çok büyük olduğu için ayrıştırılamamıştır (Basım ve Basım, 2001).

Schwartz ve Cantor 1984'de ilk kez 50 kb'dan daha büyük DNA moleküllerinin iki değişken elektriksel alan kullanarak ayrıştırıldığı sistemi tanıtmışlardır. Bir saniyeden doksan saniyeye kadar değişen sürelerde iki yönlü elektriksel vuruşlar sayesinde, % 1,5'lük agaroz

jele yüklenen DNA fragmentlerinin 20 kb'dan 2000 kb'a kadar ayrıştırılmaları yapılabilmektedir (Schwartz ve Cantor, 1984).

İlerleyen çalışmalarda da elektriksel alan sayısı artılıp vuruş süreleri ile kombine edilerek yeni cihazlar üretilmiş ve 12 megabaza kadar büyüklükteki moleküllerin ayrıştırılmaları mümkün olmuştur. PFGE, 50 kb'lık kromozomdan megabaz ile ölçülebilen maya kromozomlarına kadar birçok canlı türüne ait kromozomal DNA'yı ayrıştırabilir. Bakteri, virüs ve memeli DNA'larında eşsiz bir ayrıştırma kabiliyeti göstermektedir (Maule, 1998).

Bu yöntemde, öncelikle hedef genomik DNA'yı bütün ve taze olarak elde etmek için kültür pasajlanır. Ardından bu taze kültür jele gömülür ve genomik DNA'yı barındıran yapılar DNA'ya zarar vermeden elemine edilir. Uygun bir restriksiyon endonükleaz enzimiyle genomik DNA kesilir. DNA'yı taşıyan jel, elektroforezin uygulanacağı jele yüklenir. Farklı açılardan, farklı sürelerde ve farklı büyüklükte elektrik akımı verilerek kesilen büyük DNA parçacıklarının ayrışması sağlanır. Ayrıştırılan bantlar uygun boya ile görünür hale getirilip yorumlanır (McDougal ve ark. 2003). Şekil 8'de PFGE yönteminin aşamaları şematik olarak gösterilmiştir (Anon, 2017b).



Şekil 8. PFGE yönteminin aşamalarının şematik olarak görünümü Step 1. Agarda üretilen bakteriler buffer içinde süspansiyon edilir, Step 2. Bu süspansiyonla agaroz hazırlanır, Step 3. Bakteri hücreleri lize edilir, Step 4. Tüm genomik DNA enzimle kesilir, Step 5. Oluşan DNA fragmentleri elektroforeze tabi tutulup görüntülenir (Anon, 2017a)

PFGE yöntemi, aynı tür etkenler içinde farklı suş ve izolatların arasındaki klonal ilişki ve akrabalığın görünür hale getirilmesinde oldukça kullanışlı bir yöntemdir. Uygulanmaya başlandığı yıllardan beri araştırmacılar arasında popülaritesini hiç kaybetmemiştir (Türe ve Altınok, 2013). Aynı tür etkenler içinde farklı suşların insersiyon, delesyon ve nokta mutasyonlar gibi genetiksel olayların tespitinde de çok güvenilir bir metottur (Kondoh ve ark., 2002).

PFGE yöntemi, analiz edilen etkenlerin genetiksel ilişkilerin belirlenmesine imkan sağlamakla birlikte, tekrarlanabilirlik özelliğinin de yüksek olması bakımından moleküler biyolojik yöntemler içerisinde öne çıkmaktadır. Geleneksel elektroforezden farklı olarak büyük DNA moleküllerinin eşsiz bir biçimde ayrıştırılabilmesine olanak sağlamış ve altın standart olarak kabul görmüştür (Gunderson ve Chu, 1991). PFGE, son derece ayrımcı olduğu ve yerel salgınlarda iyi performans gösterdiğinden dolayı da altın standart olarak tanıtılmıştır. Laboratuvarlar arası standardizasyon girişimlerinin başarısız olmasına ve uzun süre isteyen bir yöntem olmasına rağmen, diğer yöntemlere göre referans noktası olarak kalmaya devam etmektedir (Weller ve ark., 2000).

2.10. *S. aureus* İnfeksiyon ve İntoksikasyonlarından Korunma

Sağlıklı hayvansal gıdaların ancak sağlıklı hayvanlardan elde edilebileceği gerçeğine uygun olarak, hayvan sağlığı ile ilgili önlemlere, kontrollere ve iyi yetiştiricilik uygulamalarına mutlaka gereken özen gösterilmelidir.

Gıdaların tüm üretim aşamalarında, temas eden personelin hijyen kurallarına uyması, eldiven, bone, maske kullanması, aksırma, öksürme, hapşırma gibi bulaş sebebi olan hareketlerden uzak durmasının sağlanması gerekmektedir. El yıkama alışkanlığının yerleştirilmesi ve sık sık el yıkanmasının sağlanması, işletmelerde buna uygun ortam oluşturulması da çok önemlidir. Etken kıl follüküllerinde kolonize olduğu için, ciddi bir antisepsi ile uzaklaştırılması gerekir. Aksi takdirde bu bölgelerde ömür boyu kalıcı olur ve gıdaları devamlı kontamine eden bir rezervuar haline gelir. Çalışanların portör muayenelerini mutlaka yapılmalı, hijyen-temizlik-dezenfeksiyon eğitimleri belli aralıklarla tekrarlanmalıdır.

Gıda hammaddelerinin üretimi aşamasında, meme hijyeni, sağım hijyeni, kesimhane, parçalama üniteleri, üretim tesislerinin hijyeni mutlaka sağlanmalıdır. Bu tesislerin ısı ortalamaları, alet-ekipman ve gıda ile temas eden tüm yüzeylerinin hijyenik kaliteleri, devamlı surette kontrol altında bulundurulmalıdır. Hayvansal gıda hammaddeleri ve bunlardan elde edilen ürünlerin soğukta muhafazasına, taşınma esnasında soğuk zincirin kırılmamasına dikkat edilmelidir.

Gıdaların üretiminde iyi üretim tekniklerine (Good Manufacturing Practices, GMP) riayet edilerek ürünün korunmasında bu tekniklerden faydalanılması gereklidir. Gıdalarda uygulanması gereken kurutma, kürlenme, fermentasyon, olgunlaşma, ısıl işlemler, soğukta muhafaza gibi prosesler uygun şartlarda ve uygun şekilde mutlaka uygulanmalıdır. Üretim yerlerinde kontaminasyon tehlikelerinin analiz edildiği, limitlerin belirlendiği, bu yönde önlemlerin alındığı, tüm önlem ve aşamaların izlenebildiği sistemler (tehlike analizleri ve kritik kontrol noktaları sistemi, HACCP gibi) kurulmalıdır.

İnsan, hayvan ve çevresel ortamlarda, hem bulaş, hem rezervuar olarak risk oluşturan faktörler periyodik kontrollere tabi tutulmalıdır. Bu kontroller esnasında ortaya çıkan yaygın *S. aureus* ve daha özede MRSA klonlarına ait bilgiler, beşeri hekimlik, veteriner hekimlik ve gıda mikrobiyolojisi alanları tarafından paylaşılarak ve işbirliği yapılarak, ortak mücadele stratejileri oluşturulmalıdır. Bu alanlardaki antibiyotik kullanımları, paylaşılan bilimsel bilgiler çerçevesinde tekrarlı bir şekilde gözden geçirilmelidir. Muhtemel bulaşma ve yayılma yolları (hava yolu da dahil), muhtemel vektörler tekrar gözden geçirilmeli ve bu yollarla ilgili önlemler alınmalıdır (Alisharlı ve ark., 2003; Erol, 2007; Anon, 2009; Ten Broeke-Smits ve ark., 2010; Sepin-Özen ve ark., 2013; Kadariya ve ark., 2014).

2.10.1. *S. aureus*'tan Korunmada HACCP Sisteminin Önemi

İnsanoğlunun, gıdalarda görmeyi istediği nitelikler arasında, bulaşıcı organizmalardan uzak olması önemli bir yer tutar. İyi üretim uygulamaları (GMP) çerçevesinde, tüm bu organizmalar için sıfır tolerans elde etmek mümkün olmamakla birlikte, mümkün olan en düşük sayıya sahip olan gıdaların üretimi, arzu edilen bir hedeftir. Mikrobiyolojik kalite kontrolünde uygulanan klasik yaklaşımlar büyük ölçüde, hem ham maddelerin hem de nihai ürünlerin mikrobiyolojik analizlerine dayanıyordu. Ancak sonuçlar için gereken sürenin, birçok ürün açısından çok uzun olması yeni arayışlar getirdi. Bazı hızlı metotların geliştirilmesi ve kullanılması, gıda güvenliğinin sağlanmasına yönelik yeni yaklaşımlara duyulan ihtiyacı ortadan kaldıramadı. Tam da bu noktada HACCP, çiftlikten sofraya kadar gıdaların güvenliğini sağlamak amacıyla geliştirilen yöntemler bütünü olarak ortaya çıktı (Jay ve ark., 2005).

HACCP sistemi kongrelerde, konferanslarda, işyerlerinde elli yılı aşkın bir süredir konuşulmasına ve yazılmasına rağmen, halen istenen seviyede uygulanamamaktadır. Gıda üretiminde HACCP uygulamalarının yetersiz kaldığı bilimsel çalışmalarla ortaya konmaktadır (Mortimore ve Wallace, 2013).

HACCP, hammaddelerin tehlikeleri, yani proses boyunca ortaya çıkabilen veya tüketicilerden kaynaklanabilecek olanları analiz ederek, mikrobiyolojik olarak güvenli gıdaların üretilmesini sağlayacak bir sistemdir. Gıda kaynaklı tehlikeleri kontrol etmek için proaktif, sistematik bir yaklaşımdır. Gıda güvenliğindeki bazı klasik yaklaşımlar büyük ölçüde son ürün testlerine dayanmasına rağmen, HACCP sistemi tüm bileşenlerin kalitesine ve tüm proses aşamalarına, bunların uygun şekilde kontrol edilmesi durumunda, güvenli ürünlerin ortaya çıkacağı yönündeki önemine vurgu yapmaktadır (Jay ve ark., 2005).

HACCP sistemi, çalışılan her bir operasyon için bir HACCP planının nasıl oluşturulacağını gösteren yedi prensipten oluşmaktadır. Bunlar;

- 1- Tehlike analizinin yapılması,
- 2- Kritik kontrol noktalarının (KKN) belirlenmesi,
- 3- Kritik limitlerin saptanması,
- 4- KKN'nın izlenmesi için bir izleme prosedürünün oluşturulması,
- 5- Belirli bir KKN'sının kontrol altında olmadığı gözlenmesi durumunda, alınacak düzeltici faaliyetlerin belirlenmesi,
- 6- HACCP sisteminin doğru çalıştığını onaylamak için onaylama prosedürleri oluşturulması,
- 7- Bu ilkelere ve uygulamalarına uygun, tüm prosedür ve kayıtların belgelerinin oluşturulmasıdır (Mortimore ve Wallace, 2013).

Yetersiz ısı işlem, uygun olmayan depolama şartları, çapraz bulaşma, gıda maddelerinin hazırlanmasında kontamine hammaddelerin kullanımı salgınlara yol açmaktadır. Etiyolojik ajanlar, gıda katkı faktörleri ile ilgili gözetim bilgilerinin sınıflandırılması ve çapraz tabloların yapılması, tehlike analizini kolaylaştırır. Kontrol tedbirlerini ve bunlara karşılık gelen kritik limitleri oluştururken, ürünün güvenliği açısından kritik olan yönlerin izlenmesi de sağlanmış olur. HACCP dokümantasyonunda, epidemiyolojik verilerin bir araya getirilmesi, sistemin mevcut en iyi bilimsel bilgilere dayanması konusunda güvence sağlar. HACCP sisteminin, gıda kaynaklı hastalıkların önlenmesinde en etkili araç olduğunu, birçok hükümet ve sağlık otoritesi kabul etmiştir (Panisello ve ark., 2000; Adams ve Moss, 2008).

Bu çalışmada; çevre, gıda ve insan kaynaklı MRSA'ların farklı kaynaklardan izolasyonu, identifikasyonu, metisilin dirençleri, stafilokokkal enterotoksin üretme kabiliyetlerinin belirlenmesi, çalışmada elde edilen izolatlara hastane ve toplum kökenli MRSA izolatlarının da ilave edilmesiyle farklı kaynaklardan elde edilen MRSA suşlarının aralarındaki genetiksel ve klonal ilişkilerin ortaya konması sonucu, bulaşma yolları, gıda güvenliği ve halk sağlığına ait bazı noktaların aydınlatılması amaçlandı.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu çalışmada örnekleme düzeni, çalışmanın amacına uygun olarak, çevre, gıda ve insan kaynakları olmak üzere üç ayrı ana kaynağın örneklenmesi şeklinde oluşturuldu. Örnekleme Mart 2016 - Eylül 2017 tarihleri arasında yapıldı. Çevre örnekleme için, Samsun İli ve çevresinde faaliyet gösteren iki et/et ürünleri işletmesi ve iki süt/süt ürünleri işletmesi çevresel ortamlarından 60 sıvap örneği toplandı. Gıda örnekleme için, yine aynı işletmelerin ürettiği et ve süt ürünlerinden 500 örnek, işletmelerden ve satış reyonlarından temin edildi. İnsan örnekleme de, yine aynı işletmelerde gıda üretiminde çalışan personellerden, 92 el yıkantısı ve 92 burun sıvabı örnekleme ile gerçekleştirildi. Bu örneklerden MRSA'lar elde edildikten sonra, OMÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı hastane/toplum kaynaklı kültür koleksiyonundan, 53 MRSA izolatı çalışmaya dahil edildi. Bu şekilde toplamda 744 örnek ve 53 MRSA izolatı çalışmanın materyalini oluşturdu.

3.1.1. Çalışma İçin Toplanan Örnekler

Çalışmanın örnekleri; Mart 2016 - Eylül 2017 arasında Samsun ve çevresinde faaliyet gösteren iki et/et ürünleri ve iki süt/süt ürünleri üretim tesisi olmak üzere dört tesisin çevresel ortamları, personelleri ve bu tesislerde üretilen et/süt ürünlerinden tesadüfi örnekleme yöntemiyle temin edildi (Tablo 6). Bu amaçla işletme çevresel ortamı ve personel örnekleme için dört, gıda örnekleme için on kez olmak üzere toplam on dört kez tesis ziyareti yapıldı. Ayrıca gıda örnekleme için yirmi bir kez satış reyonları ziyaret edildi.

Tesis çevresel sıvap örnekleri: Tesislerin çevresel ortamlarından duvar, zemin, tezgah, tekne, bıçaklardan üçer sıvap örneği olmak üzere her bir tesisten 15 ve toplamda 60 örnek toplandı. Steril sıvaplar ortalama 40 cm² yüzeylere sürüldü ve 9 mL 0,1'lik steril maximum recovery diluent (MRD) içeren tüplere kırılmak suretiyle aktarıldı (Alişarlı ve ark., 2003; De Wit ve Kampelmacher, 1981).

Personel örnekleri: Aynı tesislerde çalışan 92 personelin her birinden, el yıkama sıvıları ve burun sıvapları olmak üzere toplam 184 örnek alındı. Personelin her bir eli, içerisinde 100 mL 0,1'lik steril MRD bulunan steril stomacher poşetlere daldırılıp içinde yaklaşık 30 saniye süreyle tutuldu ve parmakların birbirine sürtülüp ovuşturulması sağlandı. Daha sonra her iki elden alınan örnekler birleştirilerek tek örnek olarak değerlendirildi (Alişarlı ve ark., 2003; De Wit ve Kampelmacher, 1981).

Steril pamuklu sıvaplar, personellerin kendilerinin, her iki burun deliğinin ön kısmında septum mukozasına, 10–15 sn. süre ile nazıkçe sağa ve sola doğru çevrilmesi sağlandı ve 9 mL 0,1'lik steril MRD içeren tüplere kırılmak suretiyle aktarıldı (Alişarlı ve ark., 2003; De Wit ve Kampelmacher, 1981).

Gıda örnekleri: Söz konusu tesislerde üretilen kıyma, hazır köfte, kuşbaşı, peynir ürünlerinden 100'er g, çiğ sütlerden 100'er mL örnek alındı. Tesis başına, her gıda grubundan 50'şer adet olmak üzere, toplam 500 adet gıda örneği toplandı. Tüm örnekler aseptik koşullarda toplandı ve soğuk zincir altında en kısa sürede laboratuvara ulaştırılarak aynı gün analizlere alındı.

Hastane/toplum kaynaklı MRSA izolatları: Çeşitli klinik vakalar ile hastane alet-ekipmanlarından izole edilen hastane/toplum kaynaklı 53 MRSA izolatı, OMÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonundan temin edilerek ve çalışmaya dahil edildi (Tablo 6).

Tablo 6. Çalışmaya materyal teşkil eden örnekler ve MRSA izolatlarının kaynakları

Çevre		İnsan			Gıda	
Et İşl. (n=2)	Süt İşl. (n=2)	Et İşl. (n=2)	Süt İşl. (n=2)	Hastane Kökenli	Et İşl. (n=2)	Süt İşl. (n=2)
15 örnek	15 örnek	24+18 örnek	25 örnek	MRSA* (53 adet)	150 örnek	100 örnek
Duvar : 3		El yıkantısı : 92			Kuşbaşı :50	Süt : 50
Zemin : 3		Burun sıvabı : 92			Kıyma :50	Peynir : 50
Tezgah : 3					Köfte :50	
Tekne : 3						
Bıçak : 3						
60 örnek		184 örnek			500 örnek	
744 örnek						

* OMÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı MRSA izolatları

3.1.2. İzolasyon ve İdentifikasyon İçin Kullanılan Malzemeler

Maximum Recovery Diluent (MRD, Merck, 1.12535.0500)

Maximum recovery diluent besi yerinden 9,5 g alınıp 1 litre distile su içinde manyetik karıştırıcıda tamamen eritildi. Otoklavda 121 °C’de 15 dakika sterilize edildi. Oda sıcaklığına kadar soğuduktan sonra +4 °C’de muhafaza edildi.

Baird-Parker Rabbit Plasma Fibrinogen Agar (BPRPFA, Sigma-Aldrich, 79893)

Baird Parker agar besi yerinden 6,3 g alınıp 90 mL distile su içinde manyetik karıştırıcıda tamamen eritildi. Otoklavda 121 °C’de 15 dakika sterilize edildi. 50 °C’ye kadar soğutulduktan sonra 10 mL steril distile su ile sulandırılmış rabbit plasma fibrinogen supplement (Sigma-Aldrich, 05939) ilave edilip manyetik karıştırıcıda tamamen homojenize olması sağlandı. Aseptik şartlarda steril petri kaplarına dökülüp donması beklendi. +4 °C’de muhafaza edildi.

Rabbit Plasma Fibrinogen Supplement (RPF, Sigma-Aldrich, 05939)

Taze olarak 10 mL steril distile su ile aseptik şartlarda sulandırıldı. BPRPF Agar 45-50 °C’ye kadar soğutulup RPF supplement ilave edilerek manyetik karıştırıcıda tamamen homojenize olması sağlandı.

Tryptic Soy Broth (TSB, Merck, 1.05459.0500)

Tryptic Soy Broth besi yerinden 30 g alınıp 1 litre distile su içinde manyetik karıştırıcıda tamamen eritildi. Otoklavda 121 °C’de 15 dakika sterilize edildi. Aseptik şartlarda oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra +4 °C’de muhafaza edildi.

Tryptic Soy Agar (TSA, Merck, 1.05458.0500)

Tryptic Soy Agar besi yerinden 40 g alınıp 1 litre distile su içinde manyetik karıştırıcıda tamamen eritildi. Otoklavda 121 °C’de 15 dakika sterilize edildi. 50 °C’ye kadar soğutulduktan sonra aseptik şartlarda steril petri kaplarına dökülüp donması beklendi. +4 °C’de muhafaza edildi.

Purple Broth Base (PBB, Himedia, M284)

Purple Broth Base besi yerinden 15,02 g alınıp 1 litre distile su içinde manyetik karıştırıcıda tamamen eritildi. Otoklavda 121 °C’de 15 dakika sterilize edildi. Aseptik şartlarda 20 mL mannitol solüsyonu 0,20 µm’lik filtreden geçirilerek ilave edildi. Cam deney tüplerine 9’ar mL dağıtıldı. +4 °C’de muhafaza edildi.

DNase Agar (Merck, 1.10449.0500)

DNase Agar besi yerinden 42 g alınıp 1 litre distile su içinde manyetik karıştırıcıda tamamen eritildi. Otoklavda 121 °C’de 15 dakika sterilize edildi. 50 °C’ye kadar

soğutulduktan sonra aseptik şartlarda steril petri kaplarına dökülüp donması beklendi. +4 °C’de muhafaza edildi.

Brain Heart Infusion Broth (BHI, Merck, 1.104930.500, % 20 gliserinli)

Brain Heart Infusion Broth besi yerinden 18,5 g alınıp 500 mL distile su içinde manyetik karıştırıcıda tamamen eritildi. Bu karışıma 100 mL gliserin solüsyonu ilave edildi. Otoklavda 121 °C’de 15 dakika sterilize edildi. Vida kapaklı 2 mL’lik suş saklama tüplerine 1’er mL dağıtıldı. +4 °C’de muhafaza edildi.

Potassium Tellurite Solution (Sigma-Aldrich, 17774)

Steril halde sunulan 10’ar mL’lik flakonlar örnek homojenizatı ile TSB karışımına aseptik şartlarda % 1 oranında ilave edildi.

Rabbit Plasma (Biowest, S2600-500)

Steril halde sunulan rabbit plazma, koagülaz testinde kullanılıncaya kadar -20 °C’de muhafaza edildi.

Hidrojen Peroksit % 30 (H₂O₂, Perhydrol, Tekkim, TK.060171.01001)

Kullanıma hazır halde temin edilen % 30’luk hidrojen peroksitten 10 mL alınıp, 90 mL distile su içinde seyreltilti. +4 °C’de muhafaza edildi.

Gliserin (Merck, 1.04092.2500)

Non-steril halde temin edilen gliserin, BHI besi yerine katılıp otoklavda sterilize edildi.

Ethanol Absolute % 99.5 (Tekkim, TK.200655.05001)

Kullanıma hazır solüsyon halde temin edilip oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Ridascreen Set A,B,C,D,E ELISA Kiti (R-Biopharm, R4101)

Kullanıma hazır pleytler ve reagentlardan oluşan ELISA test kiti, üretici firma direktiflerine uygun olarak +4 °C’de muhafaza edildi.

Gram Jensen Boyama Kiti (RTA Labs, 07001)

Kullanıma hazır boyalar ve reagentlardan oluşan boyama kiti, üretici firma direktiflerine uygun olarak oda sıcaklığında muhafaza edildi.

3.1.3. Doğrulamada Kullanılan Referans Suşlar

***Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach ATCC 25923**

Staphylococcus aureus ATCC 25923 suşu Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Gıda Kontrol Laboratuvarı’ndan temin edildi.

***Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach ATCC 43300**

Staphylococcus aureus ATCC 43300 suşu OMÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edildi.

***Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers ATCC 25922**

Escherichia coli ATCC 25922 suşu Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Gıda Kontrol Laboratuvarı'ndan temin edildi.

3.1.4. Moleküler Çalışmalar İçin Kullanılan Malzemeler

Lysostaphin (Sigma-Aldrich, L7386)

Liyofilize toz halinde sunulan lizostafin ultra saf su içinde konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde sulandırıldı. 1'er mL'lik porsiyonlara bölünüp kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

Proteinaz-K (Sigma-Aldrich, P4850)

Kullanıma hazır halde temin edilip +4 °C'de muhafaza edildi.

Triton-X 100 (4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl) phenyl-polyethylene glycol solution, Sigma-Aldrich, T8787)

Kullanıma hazır solüsyon halde temin edilip oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Sodium deoxycholate (Sigma-Aldrich, D6750)

Toz halde temin edilen Sodium deoxycholate'dan 2 g tartılıp 100 mL distile su içinde çözdürüldü. Otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilip +4 °C'de muhafaza edildi.

N-Lauroylsarcosine sodium salt (Sigma-Aldrich, L5777)

Toz halde temin edilen N-Lauroylsarcosine sodium salt'dan 10 g tartılıp 100 mL distile su içinde çözdürüldü. Otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilip +4 °C'de muhafaza edildi.

0,1 M Tris-HCl (Sigma-Aldrich, T5941, pH:7,5)

Toz halde temin edilen trizma hydrochloride'den 12,1 g tartılıp 800 mL distile su içinde çözdürüldü. pH'sı ayarlandıktan sonra 1 litreye tamamlanıp otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi.

1 M Tris-HCl (Sigma-Aldrich, T5941, pH:8)

Toz halde temin edilen trizma hydrochloride'den 121,14 g tartılıp 800 mL distile su içinde çözdürüldü. pH'sı ayarlandıktan sonra 1 litreye tamamlanıp otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi.

Boric acid (BioShop, BOR001.500)

Kullanıma hazır toz halde temin edilip oda sıcaklığında muhafaza edildi.

0,5 M EDTA (Sigma-Aldrich, E5134, pH:8)

Toz halde temin edilen ethylenediaminetetraacetic acid'den 186,1 g tartılıp 800 mL distile su içinde çözdürüldü. Yaklaşık 10 g Sodyum hidroksit ile pH'sı ayarlandıktan sonra 1 litreye tamamlanıp otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi.

5 M Sodium Chloride (Lab M, NaCl, MC017)

Toz halde temin edilen NaCl'den 146,1 g tartılıp 500 mL distile su içinde tamamen çözdürüldü. Otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilip oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Tris-EDTA (TE) Buffer (pH:8)

Aseptik koşullarda hazırlandı. Daha önce hazırlanıp sterilize edilen 0,5 M EDTA'dan 1 mL, 1 M Tris-HCl'den 5 mL alınıp 494 mL distile su içinde karıştırıldı.

5X TBE (tris borik asit EDTA) Stok Buffer

Toz halde Borik asitten 13,57 g, Trizma Base'den 26,92 g, EDTA'dan 1,86 g tartılıp 500 mL distile su içinde çözdürüldü. Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Hücre Süspansiyon Tamponu (HST, pH:8)

Aseptik koşullarda hazırlandı. Daha önce hazırlanıp sterilize edilen 0,5 M EDTA'dan 20 mL, 1 M Tris-HCl'den 10 mL alınıp 70 mL distile su içinde karıştırıldı. +4 °C'de muhafaza edildi.

Lizis buffer solüsyonu

Aseptik koşullarda hazırlandı. Daha önce hazırlanıp sterilize edilen 0,5 M EDTA'dan 600 µL, 1 M Tris-HCl'den 18 µL, 5 M NaCl'den 600 µL, triton x-100'den 15 µL, % 2'lik Sodyum deoxycholate'dan 300 µL, % 10'luk N-Lauroylsarcosine'den 150 µL alınıp 1317 mL distile su içinde iyice karıştırıldı. +4 °C'de muhafaza edildi.

Taq DNA Polimeraz (Thermo Scientific, 5 U/µl EP0402)

Kullanıma hazır halde temin edilip -20 °C'de muhafaza edildi.

10X Taq Buffer with KCl (Thermo Scientific, EP0402)

Kullanıma hazır halde temin edilip -20 °C'de muhafaza edildi.

MgCl₂ 25 mM (Thermo Scientific, EP0402)

Kullanıma hazır halde temin edilip -20 °C'de muhafaza edildi.

dNTP 10 mM each (Thermo Scientific, R0191)

Kullanıma hazır halde temin edilip -20 °C'de muhafaza edildi.

SmaI DNA Restriksiyon Enzimi (Promega, R612F)

Kullanıma hazır halde temin edilip -20 °C'de muhafaza edildi.

MULTI-CORE Buffer (Promega, R999A)

Kullanıma hazır halde temin edilip -20 °C'de muhafaza edildi.

Buffer J (Promega, R009A)

Kullanıma hazır halde temin edilip -20 °C'de muhafaza edildi.

BSA (Bovine serum albümin, Promega, (R396F)

Kullanıma hazır halde temin edilip -20 °C'de muhafaza edildi.

DNA Gel Loading Dye 6X (Thermo Scientific, R0611)

Kullanıma hazır halde temin edilip -20 °C'de muhafaza edildi.

100 bp DNA Ladder Marker (Thermo Scientific, SM0241)

Kullanıma hazır halde temin edilip -20 °C'de muhafaza edildi.

Lambda Ladder Marker, DNA Size Standarts (Bio-Rad, Cat.No. 170-3635)

Kullanıma hazır halde temin edilip +4 °C'de muhafaza edildi.

Etidium Bromide Solution (Invitrogen, 10 mg/mL , Cat.No.15585-011)

Kullanıma hazır halde temin edilip oda ısısında muhafaza edildi.

Agarose (Amresco, N605-500)

Toz halde temin edilip 1X TBE buffer ile % 1 oranında eritilerek kullanıldı.

Pulse Field Certified Agarose (Bio-Rad, 1620137)

Toz halde temin edilip 0,5X TBE buffer ile % 1 oranında eritilerek kullanıldı.

Certified Low-Melt Agarose (Bio-Rad, 1613111)

Toz halde temin edilip 0,5X TBE buffer ile % 1 oranında eritilerek kullanıldı.

Primerler (Biomers, Ankara)

Forward ve reverse çiftlerinden oluşan dokuz çift primer seti liyofilize halde temin edildi (Tablo 7). Sertifikalarında firmanın belirttiği miktarda DNase, RNase free steril su ile sulandırıldı. Her biri 200 µL miktarında porsiyonlara bölünüp -20 °C'de muhafaza edildi.

Tablo 7. Konfirmasyon için nükleaz, serin proteaz ve koagülaz üretiminden sorumlu genler ile metisilin direnci ve enteroksinlerin üretiminden sorumlu genlerin tespitinde kullanılan primerler

Primer ismi	Hedef bölge büyüklüğü	Primer dizisi (5'-3')	Referans
<i>nuc1</i>	417 bp	5'- GGCAATTGTTTCAATATTAC-3'	Sudağıdan ve ark (2008)
<i>nuc2</i>		5'- TTTTATTTGCATTTTCTACC-3'	
<i>sspA1</i>	292 bp	5'- GACAACAGCGACACTTGTGA-3'	Karlson ve Arvidson
<i>sspA2</i>		5'- AGTATCTTTACCTACAACACTACA-3'	(2002)
<i>coa1</i>	650-1000 bp	5'- ATAGAGATGCTGGTACAGG-3'	Hookey ve ark. (1999)
<i>coa2</i>		5'- GCTTCCGATTGTTTCGATGC-3'	
<i>mecA P4</i>	162 bp	5'- TCCAGATTACAACCTCACCAGG-3'	Oliveira ve de Lencastre
<i>mecA P7</i>		5'- CCACTTCATATCTTGTAACG-3'	(2002)
<i>sea1</i>	120 bp	5'- TTGGAAACGGTAAAACGAA-3'	Johnson ve ark. (1991)
<i>sea2</i>		5'- GAACCTTCCCATCAAAAACA-3'	
<i>seb1</i>	478 bp	5'- TCGCATCAAACACTGACAAACG-3'	Johnson ve ark. (1991)
<i>seb2</i>		5'- GCAGGTAATCTATAAGTGCC-3'	
<i>sec1</i>	257 bp	5'- GACATAAAAGCTAGGAATTT-3'	Johnson ve ark. (1991)
<i>sec2</i>		5'- AAATCGGATTAACATTATCC-3'	
<i>sed1</i>	278 bp	5'- CCAATAATAGGAGAAAATAAAAG-3'	Mehrotra ve ark. (2000)
<i>sed2</i>		5'- ATTGGTATTTTTTTTCGTTC-3'	
<i>see1</i>	209 bp	5'- AGGTTTTTTCACAGGTCATCC-3'	
<i>see2</i>		5'- CTTTTTTTCTTCGGTCAATC-3'	Mehrotra ve ark. (2000)

3.2. Metot

Örnekleme usulüne uygun şekilde yapılarak, soğuk zincir altında en kısa sürede laboratuvara ulaştırıldı. Tüm örneklere, selektif ön zenginleştirme metodu uygulandı (Lee, 2003, Sürücüoğlu ve ark., 2011, Mernelius ve ark., 2013). Selektif ön zenginleştirmenin ardından *S. aureus*'ların izolasyon ve identifikasyonları, ISO 6888-2, 1999'da bildirilen yöntemle, BPRPF Agarda üreyen gri-siyah renkli, etrafında şeffaf zon görülen kolonilere, Gram boyama, koagülaz, katalaz, DNase, mannitol fermentasyon testleri uygulandı (ISO 6888-2, 1999). *S. aureus* olarak identifiye edilen izolatların DNA izolasyonlarının ardından, moleküler konfirmasyon amacıyla, konvansiyonel PCR metodu ile *nuc*, *sspA* ve *coa* genlerini taşıyıp taşımadıkları araştırıldı (Sudağıdan ve ark., 2008, Karlson ve Arvidson 2002, Hookey ve ark., 1999). İzolatların metisilin direncini gösteren *mecA* geni, moleküler olarak konvansiyonel PCR yöntemi ile tespit edildi (Oliveira ve de Lencastre 2002). Yine izolatların

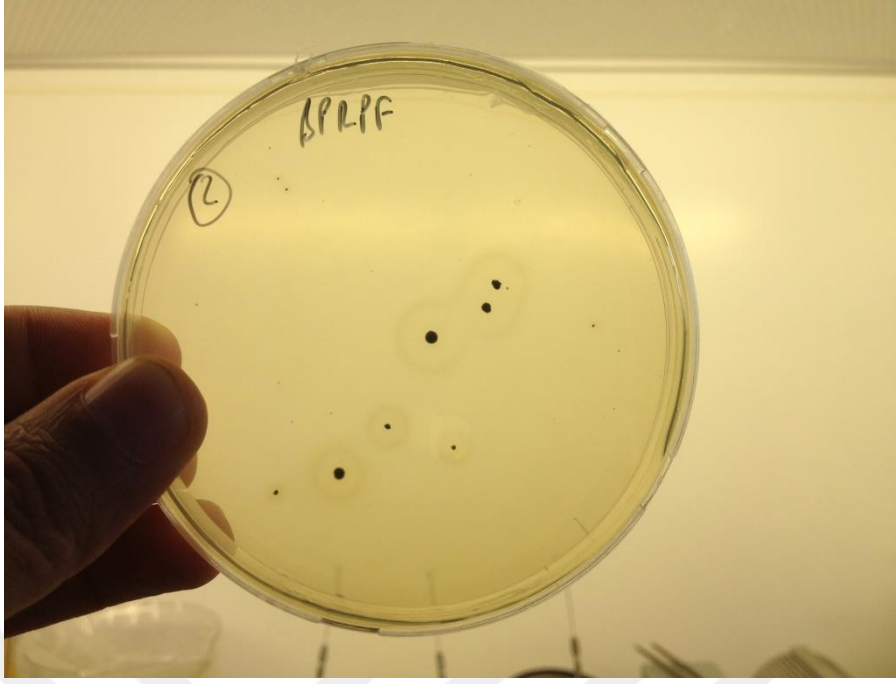
patojenitelerinde etkili enterotoksin üretiminden sorumlu genlerden *sea*, *seb*, *sec*, *sed* ve *see* genlerini taşıyıp taşımadıkları, multiplex PCR metodu ile araştırıldı (Johnson ve ark., 1991, Mehrotra ve ark., 2000). Çalışma boyunca çevre, gıda ve insan kaynaklarından elde edilen MRSA izolatlarına, OMÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilen MRSA izolatları da ilave edilerek bir izolat havuzu oluşturuldu. Tüm bu izolatların, izole edildikleri kaynaklar itibarıyla hem kendi içlerindeki hem de kaynaklar arasındaki klonal ilişkileri Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) yöntemi ile analiz edildi (McDougal ve ark., 2003, Anon, 2017a).

3.2.1. Koagülaz pozitif *Staphylococcus* spp.'lerin İzolasyon ve İdentifikasyonu

Soğuk zincir altında laboratuvara ulaştırılan personel el yıkantısı sıvıları, burun sıvı örnekleri ve çevresel sıvı örneklerini taşıyan MRD (Merck, 1.12535.0500) üzerine 1/1 oranında TSB (Merck, 1.05459.0500) ilave edildi. Bu karışıma % 1 oranında potasyum tellürit solüsyonu (Sigma-Aldrich, 17774) eklenerek stomacher (Bag-Mixer-400, Interscience)'de 3 dakika homojenize edildi.

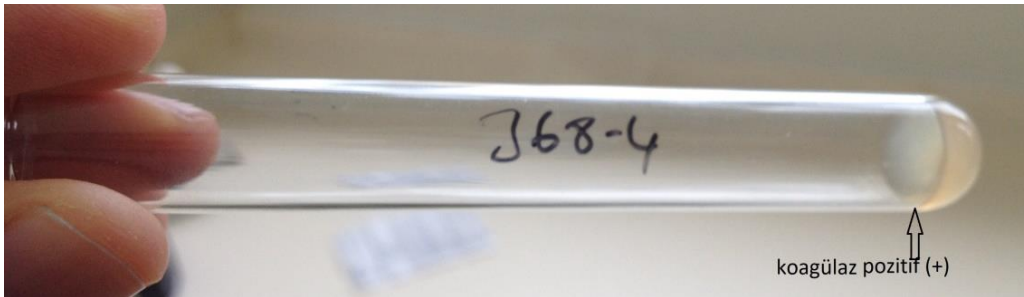
Steril numune alma poşetlerine, usulüne uygun şekilde alınan ortalama 200'er g kıyma, kuşbaşı, köfte, peynir, 100'er mL süt örnekleri soğuk şartlarda en kısa sürede laboratuvara ulaştırıldı. Steril stomacher poşetleri içinde, katı örneklerden 10'ar g numune terazisi ile (Ohaius, Pioneer) tartıldı, süt örneklerinden 10'ar mL alındı ve üzerine 90'ar mL MRD ve TSB sıvı besiyeri ortamları (% 1 oranında potasyum tellürit ilaveli) 1/1 oranında karıştırılarak ilave edildi. Bu karışımlar da stomacherde 3 dakika homojenize edildi. Homojenize edilen tüm örnekler, 37 °C'de 20-24 saat aerobik şartlarda selektif ön zenginleştirme inkübasyonuna tabi tutuldu (Lee, 2003, Sürücüoğlu ve ark., 2011, Mernelius ve ark., 2013).

Selektif ön zenginleştirmenin ardından, tüm örneklerden 100'er µL alınıp BPRPF Agara (Sigma-Aldrich, 79893) yayma plak yöntemi ile ekildi. Ekimi yapılan tüm BPRPF Agar plakları 37 °C'de 24-48 saat aerobik şartlarda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda, etrafında şeffaf koagülasyon zonu oluşan, 1-3 mm çapında, gri-siyah renkli kolonilerden 3-4 koloni seçildi (Şekil 9). Çizme yöntemiyle TSA (Merck, 1.05458.0500)'ya ekildi ve 37 °C'de 24 saat aerobik inkübasyona bırakıldı. TSA'da saf olarak üreyen kolonilere, koagülaz reaksiyonunun doğrulanması amacıyla tüp koagülaz testi uygulandı. Tüp koagülaz testinde pozitif reaksiyon veren izolatlar, koagülaz pozitif *Staphylococcus* spp. (KPS) olarak isimlendirildi (ISO 6888-2, 1999).

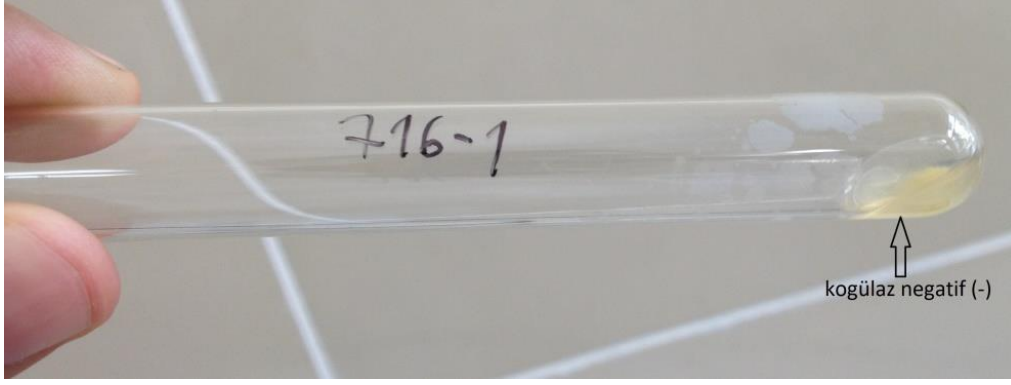


Şekil 9. Baird Parker Rabbit Plasma Fibrinogen Agar'da koagülaz pozitif *Staphylococcus* spp.'lerin koloni formasyonu

Koagülaz Testi: BPRPF katı besiyeri üzerinde şeffaf zon oluşturarak üreyen, 1-3 mm çapındaki gri-siyah kolonilerden 3-4 koloni seçilip, çizme yöntemiyle TSA'ya ekildi ve 37 °C'de 24-48 saat aerobik şartlarda inkübasyona bırakıldı. 5 mL'lik steril cam tüplere 500 µL tavşan plazması (Biowest, S2600-500) dağıtıldı. TSA'da saf olarak üreyen kolonilerden steril öze yardımıyla 4-5 koloni alınıp, tavşan plazması içerisinde iyice homojenize edildi. Önceden 37 °C'ye ayarlanmış benmaride, her yarım saatte bir kontrol etmek suretiyle 4 saat inkübe edildi. Negatif reaksiyon veren tüpler, ilave olarak oda ısısında 24 saat inkübasyona bırakıldı. Tüp koagülaz testinde pozitif reaksiyon veren izolatlar koagülaz pozitif *Staphylococcus* spp (KPS) olarak isimlendirildi (Bennett ve Lancette 1998, ISO 6888-2, 1999, Şekil 10-11).



Şekil 10. Tavşan plazması kullanılarak yapılan tüp koagülaz testinde pozitif reaksiyonun görünümü

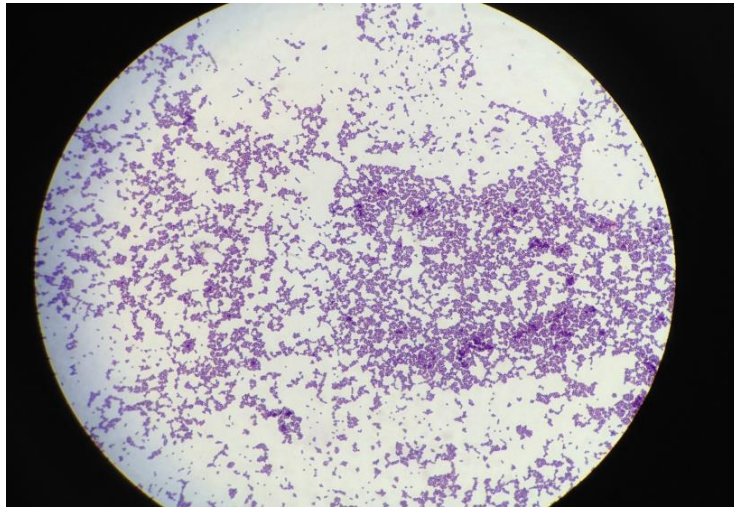


Şekil 11. Tavşan plazması kullanılarak yapılan tüp koagülaz testinde negatif reaksiyonun görünümü

3.2.2. *S. aureus*'ların İdentifikasyonu

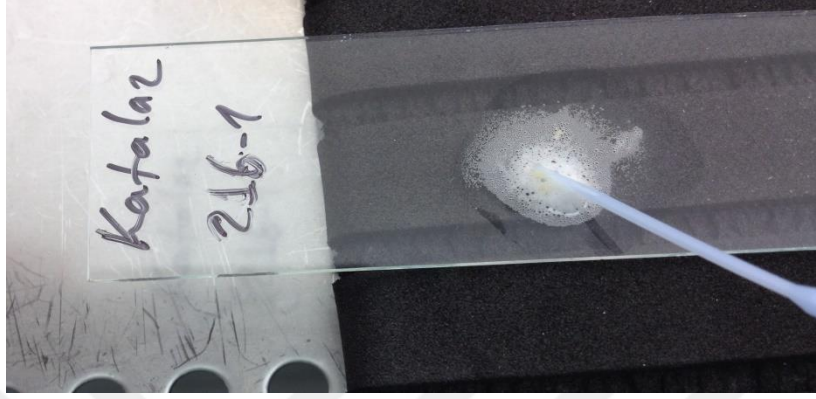
KPS'lere Gram boyama, katalaz, DNase, anaerobik mannitol fermentasyonu testleri uygulandı. Bu testlerin tamamına pozitif reaksiyon veren izolatlar *S. aureus* olarak identifiye edildi ve % 20 gliserinli BHI sıvı besiyeri içinde -80 °C'de depolandı (ISO 6888-2, 1999).

Gram Boyama: TSA'da saf olarak üreyen kolonilerden aseptik şartlarda, steril öze yardımı ile bir koloni alındı. Steril lam üzerine bir damla steril hücre süspansiyon tamponu (HST) damlatıldı. Alınan koloni lam üzerinde homojen bir şekilde yayılıp oda sıcaklığında kurutuldu ve alevde fikse edildi. Gram boyama kiti (RTA Labs, 07001) içeriğindeki kristal viyole boyası ile 2 dk boyandı. Ardından lamın üzeri lügol solüsyonu ile kaplanıp 2 dk bekletildi. Alkol/aseton karışımı ile 10 sn dekolarizasyonun ardından, 30 sn karbol fuksin ile boyanıp su ile yıkandı ve lamlar kurutulup, ışık mikroskopunda incelendi (Bennett ve Lancette, 1998, Şekil 12).



Şekil 12. Gram pozitif *Staphylococcus* spp.'lerin 100X büyütmede kümeler halinde görünümü

Katalaz Testi: Siyah düz zemine yerleştirilen steril lamalar üzerine, pipetle 500 µL % 3'lük H₂O₂ konuldu. TSA'da saf olarak üreyen kolonilerden bir-iki koloni, öze ile alınıp iyice karıştırıldı. Gaz ve kabarcık çıkışı pozitif olarak kaydedildi (Bennett ve Lancette, 1998, Şekil 13).



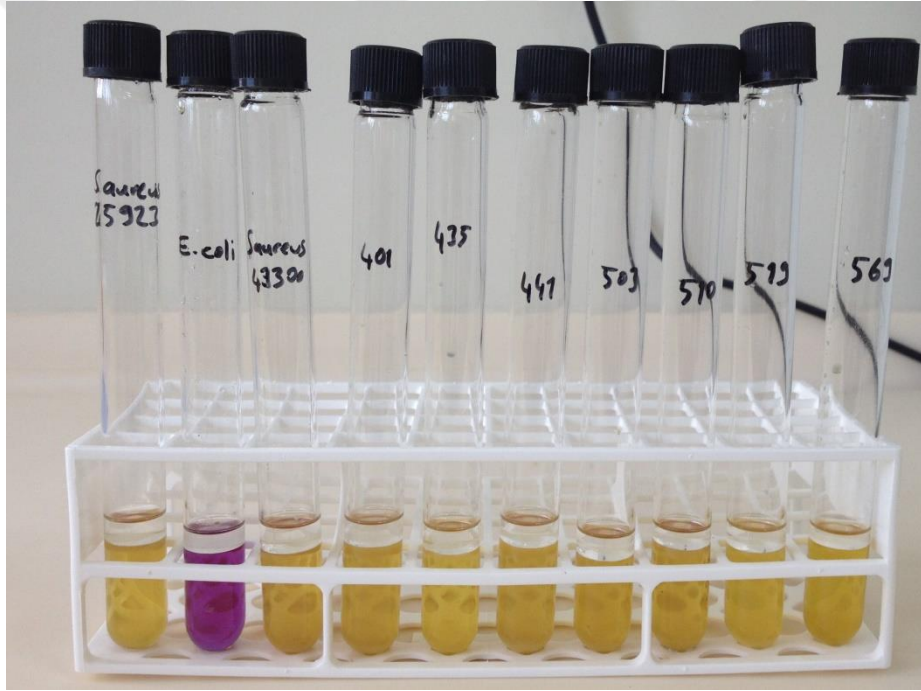
Şekil 13. Lam üzerinde katalaz pozitif reaksiyonun görünümü

DNase Testi: TSA'da saf olarak üretilen kolonilerden, steril öze yardımıyla bir-iki koloni alınıp, kalınca bir çizgi halinde DNase test agara çizme yöntemiyle ekildi. 37 °C'de 24 saatlik aerobik inkübasyonun ardından, agarın yüzeyi 1N HCl ile kaplandı. Üreme görülen alanın etrafında oluşan şeffaf zon pozitif olarak değerlendirildi (Smith ve ark., 1969, Şekil 14).



Şekil 14. DNase agarda *S. aureus* şüpheli izolatların pozitif ve negatif reaksiyonlarının karşılaştırmalı görünümü

Mannitol Fermentasyon Testi: Purple base broth sıvı besiyeri, deney tüplerine 2'şer mL dağıtılıp otoklavlandı. Mannitol şeker solüsyonu 0,20 µm'lik filtreden geçirilerek, steril ortamda herbir tüpe 200 µL eklendi. TSA'da saf olarak üretilen kolonilerden steril öze yardımıyla bir-iki koloni alınıp, BHI besi yerinde pasajlandı ve 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, üreme görülen tüplerden 100 µL bakteri solüsyonu alınıp mannitol ilaveli purple base broth sıvı besiyerine ekildi. Besiyerinin üzeri, oksijen temasını engellemek amacıyla, sıvı parafinle kaplandı. Pozitif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 25923 ve *S. aureus* ATCC 43300, negatif kontrol olarak *E. coli* O157 suşu kullanıldı. 37 °C'de 5 güne kadar inkübe edilen mor renkli besiyerlerinden, sarı renge dönenlere inoküle edilmiş olan izolatların, mannitol fermentasyon reaksiyonu pozitif olarak kaydedildi (Bennett ve Lancette, 1998, Şekil 15).



Şekil 15. Purple base mannitol broth sıvı besi yerinde mannitol pozitif reaksiyonlar ile negatif kontrol reaksiyonun görünümü

3.2.3. Moleküler Yöntemler İçin Bakteriyel DNA Ekstraksiyonu

TSA'da saf olarak üretilen *S. aureus* izolatlarından bir-iki koloni, 5 mL TSB içerisine alındı. 37 °C'de 16-24 saat inkübe edildi. Besiyerinden 200 µL steril bir ependorf tüpe alınarak 11.000 g de 1 dk. santrifüj ile çöktürüldü. Üstteki sıvı atıldı, dipte biriken bakteri peleti 45 µL steril distile su ile süspansiyon edildi. Üzerine 15 µL lizostafin eklenip vortekslendi.

37 °C'de 1 saat inkübe edildi. Bunu takiben 15 µL proteinaz K ve 150 µL 0,1 M Tris/HCl (pH: 7,5) eklenerek 56 °C'de 1 saat inkübe edildi. Son olarak örnekler 5 dakika kaynatıldı ve PCR çalışmalarına kadar -20 °C'de muhafaza edildi (Arciola ve ark., 2001).

3.2.4. *S. aureus*'ların İdentifikasyonlarının Moleküler Yöntemle Doğrulanması

Kültürel yöntemlerle izole edilen ve biyokimyasal testler sonucunda *S. aureus* olarak identifiye edilen izolatların identifikasyonları, moleküler yöntemlerle konfirme edildi. Bu amaçla, % 20 gliserinli BHI içinde -80 °C'de depolanan izolatlar önce TSB ve ardından TSA'ya ekimleri yapılarak saf kültür olarak elde edildi. Bu kültürlerden DNA ekstraksiyonları yapıldı. Ardından *S. aureus*'lara özgü ve termonükleaz üretiminden sorumlu *nuc* geni ile yine *S. aureus*'lara özgü ve serin proteazları üretiminden sorumlu *sspA* geni PCR yöntemi ile araştırıldı. Metisilin direncinin araştırılmasında gold standart olarak kabul gören *mecA* geni yine PCR yöntemi ile tespit edildi (Dominguez ve ark. 1997, Oliveira ve de Lencastre 2002). *S. aureus*'larda en çok rastlanan enterotoksinlerden A, B, C, D ve E tipi enterotoksin üretiminden sorumlu *sea*, *seb*, *sec*, *sed* ve *see* genleri multipleks PCR yöntemi ile araştırıldı. Elde edilen PCR ürünleri etidyum bromür içeren agaroz jellere yüklenerek elektroforez işlemine tabi tutulup elde edilen bantlar değerlendirildi.

***S.aureus*'ların *nuc* Geni PCR Analizi:** *S.aureus*'ların taşıdığı ve ısıya dirençli termonükleaz üretiminden sorumlu *nuc* geninin PCR analizi için Sudağıdan ve Aydın (2008) tarafından bildirilen ve 417 bp büyüklüğünde bant veren *nuc 1* ve *nuc 2* primer çiftleri kullanıldı (Tablo 3). Toplam 30 µL hacim için 10X KCl Buffer (pH 8.8) 5 µL, MgCl₂ (25 mM) 3 µL, dNTP mix (2 mM each) 0,7 µL, forward ve reverse primer (10 pmol) 1'er µL, *Taq* DNA polymerase (5 U/µL) 0,5 µL, steril distile su 13,8 µL miktarında katılıp vortekslendi. PCR tüplerine dağıtılan karışıma 5 µL hedef DNA eklendi (Tablo 11). Bu şekilde amplifikasyona hazır hale gelen örnekler, thermal cycler (Techne TC-512) cihazında 95 °C'de 5 dk. ilk denatürasyonu takiben, 95 °C'de 30 saniye denatürasyon, 45 °C'de 1 dk. bağlanma, 72 °C'de 1 dk. uzama reaksiyonu 35 siklus tekrarlandı. Ardından 72 °C'de 10 dk. son uzama ile reaksiyon sonlandırıldı (Tablo 8).

Tablo 8. *nuc* geni PCR amplifikasyonu için ısı şartları

Reaksiyon	Reaksiyon sıcaklığı	Reaksiyon süresi
İlk denatürasyon	95 °C	5 dakika
Denatürasyon	95 °C	30 saniye
Bağlanma	45 °C	1 dakika
Uzama	72 °C	1 dakika
Son Uzama	72 °C	10 dakika

***S.aureus*'ların *sspA* Geni PCR Analizi:** *S.aureus*'ların taşıdığı ve en önemli proteazlarından biri olan serin proteazlarının üretiminden sorumlu *sspA* geninin PCR analizi için, Karlson ve Arvidson (2002) tarafından bildirilen ve 292 bp büyüklüğünde bantlar veren *sspA 1* ve *sspA 2* primer çiftleri kullanıldı (Tablo 3). Toplam 30 µL hacim için 10X KCl Buffer (pH 8.8) 5 µL, MgCl₂ (25 mM) 3 µL, dNTP mix (2 mM each) 0,7 µL, forward ve reverse primer (10 pmol) 1'er µL, *Taq* DNA polymerase (5 U/µL) 0,5 µL, steril distile su 13,8 µL miktarında katılıp vortekslendi. PCR tüplerine dağıtılan karışıma 5 µL hedef DNA eklendi (Tablo 11). Bu şekilde amplifikasyona hazır hale gelen örnekler thermal cycler (Techne TC-512) cihazında 95 °C'de 5 dk. ilk denatürasyonu takiben 95 °C'de 30 saniye denatürasyon, 47 °C'de 1 dk. bağlanma, 72 °C'de 1 dk. uzama reaksiyonu 40 siklus tekrarlandı. Ardından 72 °C'de 10 dk. son uzama ile reaksiyon sonlandırıldı (Tablo 9).

Tablo 9. *sspA* geni PCR amplifikasyonu için ısı şartları

Reaksiyon	Reaksiyon sıcaklığı	Reaksiyon süresi
İlk denatürasyon	95 °C	5 dakika
Denatürasyon	95 °C	30 saniye
Bağlanma	47 °C	1 dakika
Uzama	72 °C	1 dakika
Son Uzama	72 °C	10 dakika

***S.aureus*'ların *coa* Geni PCR Analizi:** *S.aureus*'ların taşıdığı ve koagülaz üretiminden sorumlu *coa* geninin PCR analizi için, Hookey ve ark. (1999) tarafından bildirilen ve 500-1000 bp büyüklüğünde bantlar veren *coa 1* ve *coa 2* primer çiftleri kullanıldı (Tablo 3). Toplam 30 µL hacim için 10X KCl Buffer (pH 8.8) 5 µL, MgCl₂ (25 mM) 3 µL, dNTP mix (2 mM each) 0,7 µL, forward ve reverse primer (10 pmol) 1'er µL, *Taq* DNA polymerase (5 U/µL) 0,5 µL, steril distile su 13,8 µL miktarında katılıp vortekslendi. PCR tüplerine dağıtılan karışıma 5 µL hedef DNA eklendi (Tablo 11). Bu şekilde amplifikasyona hazır hale gelen örnekler, thermal cycler (Techne TC-512) cihazında 94 °C'de 5 dk. ilk denatürasyonu takiben, 94 °C'de 1 dk. denatürasyon, 58 °C'de 1 dk. bağlanma, 72 °C'de 1 dk. uzama reaksiyonu 30 siklus tekrarlandı. Ardından 72 °C'de 10 dk. son uzama ile reaksiyon sonlandırıldı (Tablo 10).

Tablo 10. *coa* geni PCR amplifikasyonu için ısı şartları

Reaksiyon	Reaksiyon sıcaklığı	Reaksiyon süresi
İlk denatürasyon	94 °C	5 dakika
Denatürasyon	94 °C	1 dakika
Bağlanma	58 °C	1 dakika
Uzama	72 °C	1 dakika
Son Uzama	72 °C	10 dakika

3.2.5. *mecA* Geni PCR Analizi ile MRSA'ların Belirlenmesi:

S.aureus'ların taşıdığı ve metisilin direncinden sorumlu *mecA* geninin PCR analizi için Oliveira ve de Lencastre (2002) tarafından bildirilen ve 162 bp büyüklüğünde bantlar veren *mecA P4* ve *mecA P7* primer çiftleri kullanıldı (Tablo 3). Toplam 30 µL hacim için 10X KCl Buffer (pH 8.8) 5 µL, MgCl₂ (25 mM) 3 µL, dNTP mix (2 mM each) 0,7 µL, forward ve reverse primer (10 pmol) 1'er µL, *Taq* DNA polymerase (5 u/ µL) 0,5 µL, steril distile su 13,8 µL miktarında katılıp vortekslendi. PCR tüplerine dağıtılan karışıma 5 µL hedef DNA eklendi (Tablo 11). Bu şekilde amplifikasyona hazır hale gelen örnekler, thermal cycler (Techne TC-512) cihazında, 95 °C'de 5 dk. ilk denatürasyonu takiben 95 °C'de 30 saniye denatürasyon, 56 °C'de 1 dk. bağlanma, 72 °C'de 1,5 dk. uzama reaksiyonu 40 siklus tekrarlandı. Ardından 72 °C'de 10 dk. son uzama ile reaksiyon sonlandırıldı. 162 bp büyüklüğünde bant veren izolatlar metisilin dirençli olarak değerlendirildi (Tablo 12).

Tablo 11. *nuc*, *coa*, *sspA* ve *mecA* genleri PCR analizleri için anakarışım formülasyonu

Anakarışım bileşeni	Karışım içindeki hacmi	Son Konsantrasyon
10x PCR Buffer with KCl	5 µL	1,5 X
MgCl ₂ (25 mM)	3 µL	2,5 mM
dNTP mix (2 mM each)	0,7 µL	0,16 mM
Forward primer (10 pmol)	1 µL	0,3 pmol
Reverse primer (10 pmol)	1 µL	0,3 pmol
Taq DNA polimeraz (5 U/µl)	0,5 µL	2,5 U
Hedef DNA	5 µL	
Steril distile su	13,8 µL	
Toplam Volüm	30 µL	

Tablo 12. *mecA* geni PCR amplifikasyonu için ısı şartları

Reaksiyon	Reaksiyon sıcaklığı	Reaksiyon süresi
İlk denatürasyon	95 °C	5 dakika
Denatürasyon	95 °C	30 saniye
Bağlanma	56 °C	1 dakika
Uzama	72 °C	1,5 dakika
Son Uzama	72 °C	10 dakika

3.2.6. *S.aureus*'ların *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* Genlerinin Multipleks PCR Analizi

S.aureus'ların ürettiği enterotoksinlerden en çok rastlanan stafilkokkal enterotoksin A, B, C, D ve E tipi toksinlerin üretiminden sorumlu *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* genlerinin PCR analizinde *sea*, *seb*, *sec* genleri için Johnson ve ark., (1991), *sed*, *see* genleri için Mehrotra ve ark., (2000) tarafından bildirilen ve sırasıyla 120 bp, 478 bp, 257 bp, 278 bp ve 209 bp büyüklüğünde bantlar veren *sea1*, *sea2*, *seb1*, *seb2*, *sec1*, *sec2*, *sed1*, *sed2*, *see1*, *see2* primer çiftleri kullanıldı (Tablo 3). Toplam 40 µL hacim için 10X KCl Buffer (pH 8.8) 5 µL, MgCl₂ (25 mM) 3 µL, dNTP mix (2 mM each) 1 µL, forward ve reverse primer (20 pmol) 1'er µL, Taq DNA polimerase (5u/ µL) 0,5 µL, su (steril distile) 10,5 µL miktarında katılıp vortekslendi. PCR tüplerine dağıtılan karışıma 10 µL hedef DNA eklendi (Tablo 13).

Amplifikasyona hazır hale gelen örnekler, thermal cycler (TechneTC-512) cihazında 94 °C’de 5 dk. ilk denatürasyonu takiben, 94 °C’de 2 dk. denatürasyon, 52 °C’de 2 dk. bağlanma, 72 °C’de 2 dk. uzama reaksiyonu 30 siklus tekrarlandı. Ardından 72 °C’de 10 dk. son uzama ile reaksiyon sonlandırıldı (Tablo 14).

Tablo 13. *sea, seb, sec, sed, see* genleri multipleks PCR analizi için anakarışım formülasyonu

Anakarışım bileşeni	Karışım içindeki hacmi	Son Konsantrasyon
10x PCR Buffer with KCl	5 µL	1,25 X
MgCl ₂ (25 mM)	3 µL	1,8 mM
dNTP mix (2 mM each)	1 µL	0,16 mM
Forward primerler (20 pmol)	1 µL	0,5 pmol
Reverse primerler (20 pmol)	1 µL	0,5 pmol
Taq DNA polimeraz (5 U/µl)	0,5 µL	2,5 U
Hedef DNA	10 µL	
Steril distile su	10,5 µL	
TOPLAM VOLÜM	40 µL	

Tablo 14. *sea, seb, sec, sed, see* genleri multipleks PCR amplifikasyonu için ısı şartları

Reaksiyon	Reaksiyon sıcaklığı	Reaksiyon süresi
İlk denatürasyon	94 °C	5 dakika
Denatürasyon	94 °C	2 dakika
Bağlanma	52 °C	2 dakika
Uzama	72 °C	2 dakika
Son Uzama	72 °C	10 dakika

3.2.7. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi

Örneklerin PCR amplifikasyonlarının ardından, elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforezine tabi tutulup görüntüledi. Bu amaçla agaroz (Amresco, N605-500) 1X TBE içerisinde % 1 oranında karıştırıldı. Kaynamaya müsaade etmeden eritilip yaklaşık 50 °C’ye kadar soğutulduktan sonra, 5 µg/mL oranında etidium bromür (Invitrogen, 10 mg/mL,

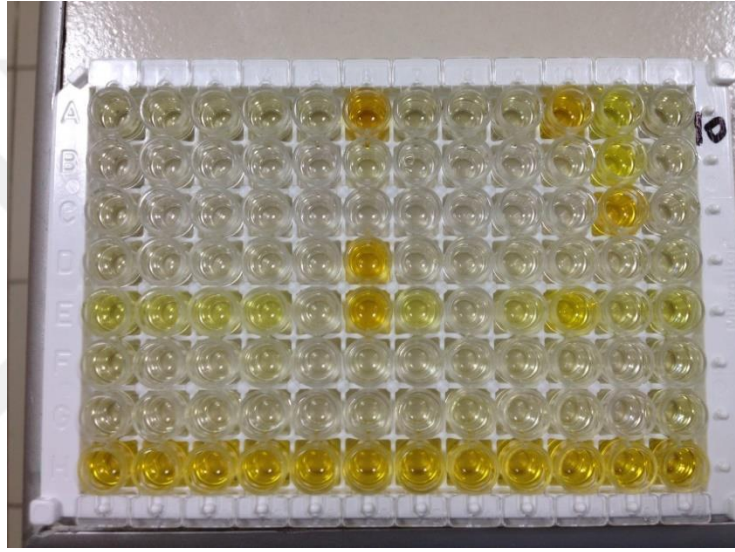
Cat.No.15585-011) ilave edilip karıştırıldı. Kalıba dökülüp oda ısısında donmaya bırakıldı. Elektroforez tankına (Clever Scientific, MSMINI 7) 1X TBE dolduruldu. Agaroz jel tanka yerleştirildi. Jelin ilk ve son kuyucuğuna, 3 µL 100 bp DNA Ladder Marker (Thermo Scientific, SM0241) aktarıldı. Steril zemin üzerinde, pozitif/negatif kontroller ile örneklerle ait 5'er µL PCR ürünleri, 1 µL loading dye (6X, Thermo Scientific, R0611) ile karıştırıldı ve jelin kuyucuklarına aktarıldı. Elektroforez cihazı (nanoPAC-300 MINI Power Supply) 110 volt ve 90 ampere ayarlandı. 45 dakika elektroforez uygulandı. Elektroforez işleminin ardından, araştırılan genlere ait bantlar UV transillüminatör (Spectroline TD-2100 E/F) kaynağı üzerinde, kamera (PULNIX) ile görüntülenip fotoğraflandı.

3.2.8. *S. aureus* İzolatlarının Enterotoksin Üretim Yeteneğinin ELISA ile Belirlenmesi

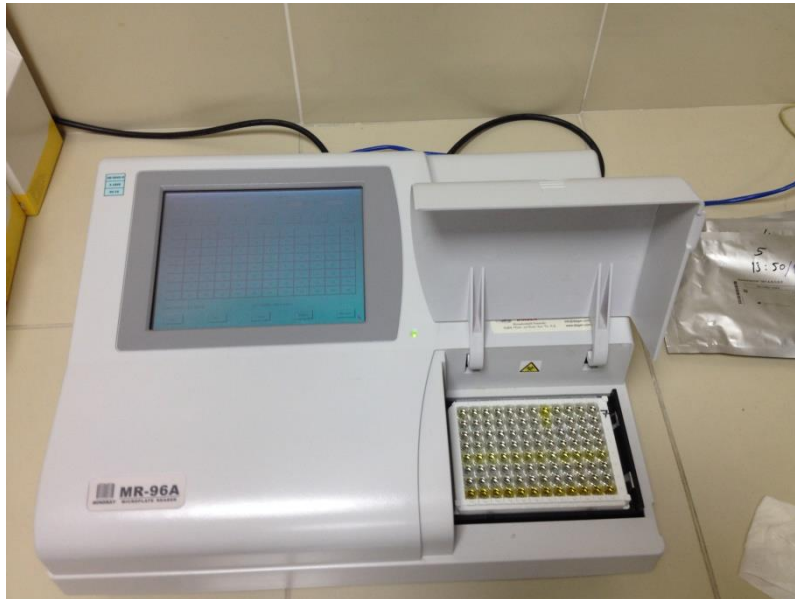
İzolasyon, biyokimyasal identifikasyon ve moleküler doğrulama sonucunda *S. aureus* olarak identifiye edilen izolatların enterotoksin üretebilme yetenekleri, ELISA ile tespit edildi (Freed ve ark., 1982).

Bu amaçla Ridascreen Set A, B, C, D, E (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany. Art. No:R4101) test kiti kullanıldı ve kit üreticisi firmanın talimatları uygulandı. Buna göre; öncelikle çalışmanın başından bu yana izole edilen ve -80°C'de % 20 gliserinli BHI sıvı besi yerinde muhafaza edilen izolatlar, taze BHI sıvı besi yerine pasajlandı. 37 °C'de aerobik olarak 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 5000 rpm'de 10°C'de soğutmali santrifüjde 10 dakika santrifüj edildi. Tüplerin üzerinde biriken süpernatant 0,20 µm filtre ve steril enjektör (5 mL) kullanılarak 1,5 mL'lik steril tüplere filtre edildi. ELISA pleytinin her bir sütunu bir izolat için olmak üzere, A,B,C,D ve E kuyucuklarına 100'er µL filtre edilen izolat süpernatantı eklendi. F ve G kuyucuklarına kit içeriğindeki negatif kontrol solüsyonu, H kuyucuğuna ise kit içeriğindeki pozitif kontrol solüsyonu ilave edildi. Pleytler, önceden 37 °C'ye ayarlanmış ve su kabı konularak nemli hava ortamı sağlanmış çalkalamalı inkübatörde (Heidolph titramax incubator 100), 1 saat inkübasyona tabi tutuldu. Ardından, kit içeriğinde sağlanan yıkama solüsyonu 1/10 sulandırıldı. Otomatik pleyt yıkayıcı (Biotek EL-50) ile her pleyt 5 kez yıkandı. Pleytlerin tüm kuyucuklarına, yine kit içeriğinde sağlanan conjugate 1 solüsyonu 100 µL ilave edilip, aynı inkübasyon şartlarında ikinci inkübasyona bırakıldı. Ardından yıkama işlemi tekrarlandı. İkinci yıkamayı takiben pleytlerin tüm kuyucuklarına, yine kit içeriğinde sağlanan conjugate 2 solüsyonu 100 µL ilave edildi ve 30 dakika üçüncü inkübasyona bırakıldı. Tüm pleytlere üçüncü kez yıkama işlemi tekrarlandı. Kit içeriğinde sağlanan substrate/chromogen solüsyonundan, pleytlerin tüm kuyucuklarına

100 μ L ilave edildi. Pleytler direk ışıktan muhafazalı şekilde 37 °C'de 15 dakika daha inkübasyona tabi tutuldu. Bu son inkübasyonun ardından, pleytlerin tüm kuyucuklarına 100 μ L stop solüsyonu ilave edildi ve bekletmeksizin ELISA okuyucuda (Mindray MR-96A) 450 nm filtre ile kuyucukların optik dansite (OD) değerleri okutuldu (Şekil 16-17). Pozitif kontrol 1,0 değerinin üzerinde, negatif kontrollerin ortalaması 0,2 değerinin altında olan pleytlerin testleri geçerli sayıldı. Pleytteki her test sütununun eşik değeri, negatif kontrol ortalama değerine 0,15 ilave edilerek hesaplandı. Test pleytinin her bir sütunundaki ilk beş kuyucuktan, o sütun için hesaplanan eşik değerin üzerinde OD değerine sahip olanlar, aynı harfle ifade edilen toksinler yönünden pozitif olarak değerlendirildi (Freed ve ark., 1982).



Şekil 16. Testi tamamlanmış bir toksin ELISA pleytinin görünümü



Şekil 17. Toksin ELISA testi tamamlanmış bir pleytin, pleyt okuyucuda OD değerlerinin okutulması

3.2.9. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) ile MRSA İzolatlarının Klonal İlişkilerinin Belirlenmesi

Çalışmada çevre, gıda ve insan kaynaklarından izole edilip identifikasyonları yapılan ve moleküler yöntemlerle doğrulanan *S.aureus*'larda, *mecA* geni tespiti ile MRSA olarak tespit edilen izolatlara, OMÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilen izolatlar ilave edilerek bir izolat havuzu oluşturuldu. Bu havuz içerisindeki izolat gruplarının, kendi içlerinde ve gruplar arasındaki genetiksel ilişkileri, biyotiplendirme alanında "gold standart" kabul edilen Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) yöntemi ile analiz edilip dendrogram üzerinde gösterildi. PFGE analizi için izolatların lizisi, DNA'larının restriksiyonu, jelde yürütülmesi, görüntüleme ve Bionumerics 7.6 programı kullanarak dendrogramın oluşturulması aşamaları uygulandı (McDougal ve ark., 2003, Anon, 2017a). İzolatların DNA'ları *SmaI* enzimi ile kesildikten sonraki yürütme ve görüntüleme işlemi, OMÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda, Bio-Rad Chef Mapper® XA System cihazı ve Bio-Rad ChemiDoc XRS görüntüleme cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen görüntüler, Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda, Bionumerics 7.6 programı kullanılarak yorumlandı.

Lizis Aşaması: İzolatlar TSA'ya pasajlandı, 37 °C'de 24 saat inkübasyonun ardından taze saf kültürler elde edildi. Steril 5 mL'lik cam tüplere 2 mL hücre süspansiyon tamponu (HST) konuldu. Her bir petriden 3-5 koloni alınıp HST içinde süspansiyon edildi ve 4-4,5 McFarland değerine ayarlandı. Tüpler, önceden +4 °C'ye ayarlanan soğutmalı santrifüjde (Nüve NF 1200R) 15 dk. 2500 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üstte biriken sıvı döküldü. Dipteki bakteri yığını tekrar HST ile süspansiyon edilip 4-4,5 McFarland değerine ayarlandı. 1X TE buffer içinde low melting agaroz % 2 oranında hazırlandı. Nazikçe karıştırıldı ve mikrodalga fırında kaynamasına müsaade edilmeden eritilip önceden 55 °C'ye ayarlanan benmariye (Nüve BM 402) konuldu. Agarozun döküleceği plug kalıpları buzdolabında soğutuldu. Steril 2 mL'lik tüplere, 250 µL bakteri süspansiyonu, 20 µL lizostafin (1 mg/mL) konulup otomatik pipetle pipetleme yapılarak karıştırıldı. Üzerine 55 °C'de bekletilen % 2'lik low melting agaroz, 250 µL ilave edilerek tekrar pipetlendi ve kalıpların her bir gözüne ayrı ayrı birer örnek-agaroz-lizostafin karışımı doldurulup 5 dk. oda ısısında donduruldu. Ardından kalıplar +4 °C'de 5 dk. daha bekletildi. Bu sırada 50 mL'lik falkon tüplere 5 mL lizis buffer dağıtıldı. Kalıplarda donan pluglar, lizis buffer içine alınıp, önceden 37 °C'ye ayarlanan benmaride 4 saat lizis inkübasyonuna bırakıldı. İnkübasyonun ardından falkon tüpler 15 dk. buzdolabında bekletildi. Ardından, tüplerden lizis buffer

boşaltılıp 5 mL 1X TE buffer ilave edildi. Oda ısısında 15 dk. çalkalayıcıda 300 rpm'de yıkandı. Yıkamanın ardından buffer döküldü. Tekrar 5 mL TE buffer ilave edildi ve bu yıkama işlemi 5 kez tekrarlandı. Yıkama sonunda pluglar, içerisinde 1 mL 1X TE buffer bulunan 2 mL'lik tüplere alınıp +4 °C'de depolandı (McDougal ve ark., 2003, Anon, 2017a).

Restriksiyon Aşaması: İzolatların DNA'larının restriksiyonu için *SmaI* enzimi kullanıldı. +4 °C'de depolanan plugların 1/3'ü steril ortamda bistüri ile kesildi. Tablo 15'de verilen karışım hazırlanıp 200 µL miktarında, steril 2 mL'lik tüplere dağıtıldı. Kesilen plug parçaları, enzim mastermiksi içine konuldu. 25 °C'de çalkalayıcı inkübatörde 4 saat inkübe edilerek restriksiyon tamamlandı (McDougal ve ark., 2003, Anon, 2017a).

Tablo 15. PFGE analizinde DNA'ların enzimle restriksiyonu için anakarışım formülasyonu

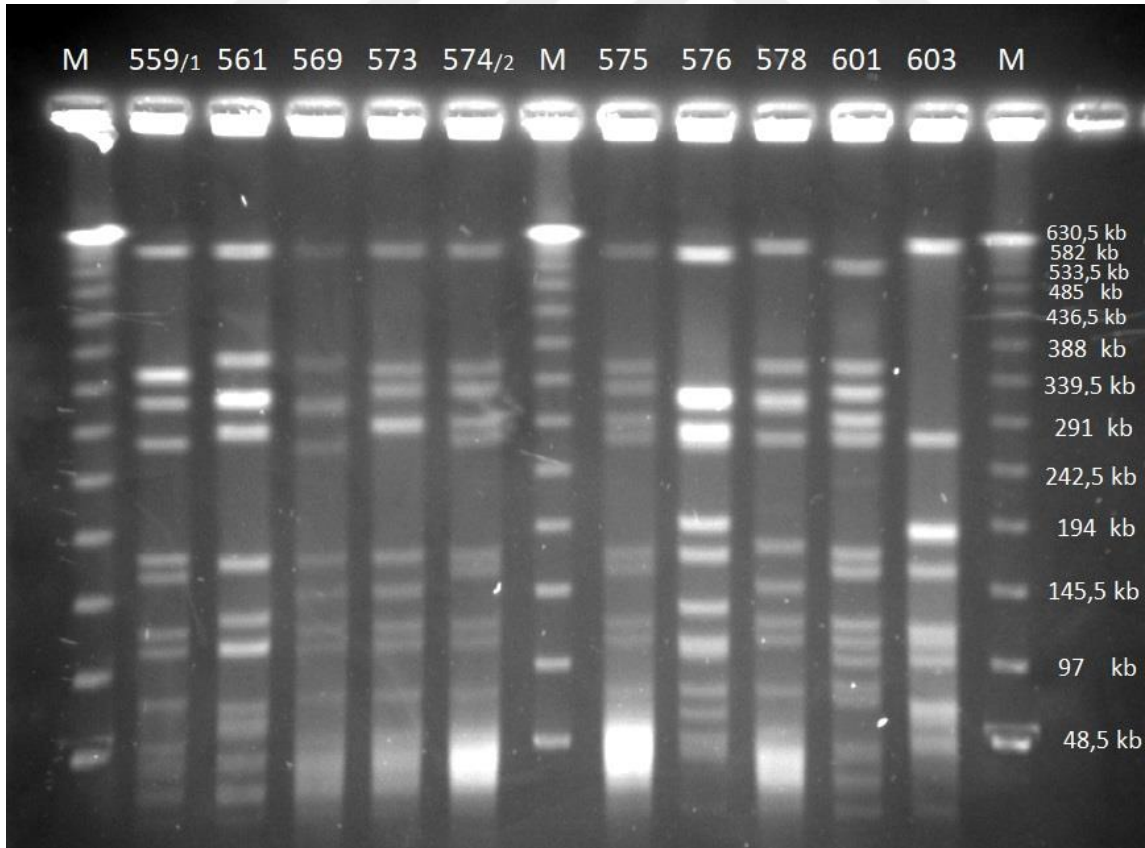
Anakarışım bileşeni	Karışım içindeki hacmi	Son Konsantrasyon
10x J Buffer	20 µL	1X
Multicore Buffer	10 µL	0,5X
BSA (Bovine serum albümin, 10 mg/mL)	2 µL	0,1 mg/mL
<i>SmaI</i> enzim (10U/ µL)	4 µL	0,8 U
Su (ultrapure, steril)	174 µL	
TOPLAM VOLÜM	200 µL	

Yürütme Aşaması: Yürütme aşaması Bio-Rad Chef Mapper® XA System cihazında uygulandı. Bu amaçla 2 litre 0,5X TBE, her yürütmeye taze olarak hazırlanıp cihazın elektroforez hücreğine dolduruldu. PFGE certified agaroz (Bio-Rad, 1620137), 1X TBE içinde % 1'lik olarak eritilerek 100 mL hazırlandı ve 55 °C'ye ayarlanmış çalkalayıcı benmariye (Nüve ST30) konuldu. Agarozun döküleceği kalıp hazırlandı. Tarağının her bir dişine restriksiyonu yapılmış plug parçası konuldu. Her bir jel için tarağın başına ortasına ve sonuna olmak üzere, üç adet Lambda Ladder Marker (Bio-Rad, Cat.No. 170-3635) kesilerek konuldu. Tarak yerine yerleştirilip agaroz dikkatlice döküldü ve oda ısısında donduruldu. Cihazın soğutucu ünitesi 14 C'ye, pompa ünitesi 70 değerine ayarlanıp çalıştırıldı. Ardından katılaştıran jel, elektroforez hücreğine yerleştirilip program (Tablo 16) girilerek yürütme başlatıldı.

Tablo 16. PFGE jel yürütme aşaması için Bio-Rad Chef Mapper XA System cihazı program ayarları

Elektroforez koşulu	Programlanan değerler
Elektroforez sıcaklığı	14 °C
Elektroforez voltajı	120 volt
Elektroforez akımı	6 V/cm ²
Başlangıç vuruş süresi	5 saniye
Final vuruş süresi	40 saniye
Vuruş açısı	120 °
Toplam yürütme süresi	20 saat

Yürütmenin ardından etidiyum bromür 500 mL ultra saf su içerisinde 1 µg/mL oranında hazırlandı ve jeller orbital çalkalayıcıda (Thermo scientific, MaxQ 2000) 20 dk. süreyle boyandı. Bio-Rad ChemiDoc XRS görüntüleme cihazında görüntülenip fotoğraflandı (Anon, 2017a, Şekil 18).



Şekil 18. 559, 561, 569, 573, 574, 575, 576, 578, 601, 603 nolu örneklerin PFGE analizleri sonrası bant paternlerinin görüntüsü (M: lambda ladder marker)

Dendrogram Oluşturulması: Elde edilen jel görüntüleri BioNumerics 7.6 programına yüklendi. Referanslara ait değerler girilip, her bir izolata ait bant profillerinde gerekli düzeltmeler yapıldı. Normalizasyon işleminin ardından, program tarafından yapılan analiz sonucunda dendrogram elde edildi. Dendrogram zerinden Dice katsayısı kullanılarak izolatların PFGE tipleri, grupları, kümeleşme oranları gibi değerlendirmeler yapıldı (McDougal ve ark., 2003, Anon, 2017a).

3.2.10. İstatistiksel Yöntem

Çalışmada rnekleme yapılan et ve et ürünleri ile süt ve süt ürünleri gıda gruplarında *S. aureus* ve MRSA ile kontamine bulunma oranları arası farklılığı tespit etmek için oranların farkına ait z test metodu kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Bu çalışmada örnekleme düzeni, çalışmanın amacına uygun olarak çevre, gıda ve insan kaynakları olmak üzere üç ayrı ana kaynağın örnekleme şeklinde oluşturuldu. Bu amaçla, Samsun ve çevresinde bulunan et ve süt işletmelerinden 60 çevresel sıvı örneği, 500 gıda örneği ve 184 personel örneği (92 burun sıvabı ve 92 el yıkantısı) olmak üzere toplam 744 örnek temin edildi. Örneklerde *S. aureus*'ların izolasyon ve identifikasyonu ISO 6888-2'ye göre yapıldı. Elde edilen izolatlar moleküler yöntemlerle doğrulandı. *S. aureus* izolatlarının metisilin dirençleri ve enterotoksin genleri varlığı PCR ile belirlendi. *S. aureus* izolatlarının enterotoksin üretme yetenekleri ELISA testi ile belirlendi. Bu çalışmada elde edilen MRSA izolatlarına OMÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilen MRSA izolatları da dahil edilerek, izolatların kendi içlerinde ve gruplar arasındaki genetik ilişkileri PFGE yöntemi ile analiz edildi. Elde edilen sonuçlar dendrogram üzerinde gösterildi.

4.1. Koagülaz Pozitif *Staphylococcus* spp. İzolasyon Sonuçları

Çalışmada ekimi yapılan 744 örnek için üreme görülen her bir BPRPF agardan ortalama 2-3, toplamda 1214 *Staphylococcus* spp. şüpheli koloni seçilip TSA'ya pasajlandı. TSA'da saf kültür olarak elde edilen *Staphylococcus* spp. şüpheli izolatları, koagülaz reaksiyonlarının doğrulanması amacıyla tüp koagülaz testi uygulandı. Sonuçta ekimi yapılan 744 örneğin 170 (% 22,8)'inden, 194 koagülaz pozitif *Staphylococcus* spp. elde edildi. Elde edilen izolatların örnek türlerine göre dağılımı ve izolasyon oranları Tablo 17'de gösterildi. Bu sonuçlara göre, ekimi yapılan örneklerden en çok izolasyon, işletmelere gelen çiğ sütlerden yapıldı. Örnek alınan 100 çiğ süttten, yapılan ekimler sonucu 199 koloni seçilmiş, tüp koagülaz testi sonucu 41 (% 41) örnekte 48 (% 48) koagülaz pozitif *Staphylococcus* spp. izole edildi. En az üreme ise işletmelerde kullanılan bıçaklardan alınan sıvı örneklemelerinde görüldü. İşletmelerdeki bıçaklardan toplam 12 sıvı örneği alındı. Bunların 2 (% 16,6)'sinden 7 şüpheli koloni üretti ve 1 bıçak sıvı örneği (% 8,3)'nden 1 koagülaz pozitif *Staphylococcus* spp. izole edildi. Teknelerden alınan sıvı örneklerinde ise üreme tespit edilmedi.

Tablo 17. Çalışmada izole edilen koagülaz pozitif *Staphylococcus* spp.'lerin örneklere göre dağılımı
izolasyon oranı (%)

Örnek türü	Örnek sayısı (n)	BPRPF Agarda Üreme	Tüp koagülaz uygulanan koloni	Koagülaz (+) örnek (%)	Koagülaz (+) <i>Staphylococcus</i> spp.
Personel burun sıvabı	92	90	186	28 (30,4)	28
Personel el yıkantısı	92	89	178	21 (22,8)	21
İşletme çevre (zemin)	12	7	18	3 (25)	4
İşletme çevre (tezgah)	12	6	16	2 (16,6)	2
İşletme çevre (duvar)	12	5	10	2 (16,6)	2
İşletme çevre (bıçak)	12	2	7	1 (8,3)	1
İşletme çevre (tekne)	12	0	0	0	0
Gıda (kıyma)	100	62	118	13 (13)	15
Gıda (köfte)	100	68	151	17 (17)	21
Gıda (kuşbaşı)	100	78	174	22 (22)	26
Gıda (süt)	100	99	199	41 (41)	48
Gıda (peynir)	100	67	157	20 (20)	26
Toplam	744	573	1214	170 (22,8)	194

4.2. *S. aureus* İzolasyon Sonuçları

Koagülaz pozitif 194 *Staphylococcus* spp. izolatı Gram boyama, katalaz, DNase ve anaerobik mannitol fermentasyon testlerine tabi tutuldu ve tüm testlere pozitif sonuç veren izolatlar *S. aureus* olarak isimlendirildi. Toplam 744 örneğin 152 (% 20,4)'sinden *S. aureus* tespit edildi. Bu 152 örnekten toplam 173 *S. aureus* izolatı elde edildi. Koagülaz pozitif *Staphylococcus* spp. ve *S. aureus* izole edilen örneklerin tüm örnek türlerine göre dağılımı ve izolasyon oranları ile izolat sayıları Tablo 18'de, örnekleme yapılan gıda işletmelerine göre dağılımı ve oranları ise Tablo 19'da gösterildi. Buna göre en çok izolasyon yapılan örnek grubu 40 (% 40) örnek ile işletmelere gelen çiğ süt oldu. İşletme çevresel örneklerinden bıçak ve tezgah örneklerinden 1 (% 8,3)'er örnek kontamine bulundu ve en az *S. aureus* izolasyonu yapılan grup olduğu görüldü. Ayrıca yine işletme çevresel örneklerinden teknelerden alınan sıvaplardan *S. aureus* izolasyonu yapılmadı.

Çalışmada et ve et ürünleri ile süt ve süt ürünleri gıda gruplarından izole edilen *S. aureus*'ların izolasyon oranları (et ve et ürünlerinde %16,67 ile süt ve süt ürünlerinde %24,5) arasında istatistiki olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir (p=0.035)

Tablo 18. *S. aureus* 'ların örneklerde bulunma oranı (%) ve örnek gruplarından izole edilen *S. aureus* izolat sayıları

Örnek türü	Örnek sayısı (n)	Koagülaz (+) örnek	<i>S. aureus</i> (%)	<i>S. aureus</i> izolatı
Personel burun sıvabı	92	28	26 (28,2)	26
Personel el yıkantısı	92	21	20 (21,7)	20
İşletme çevre (zemin)	12	3	3 (25)	3
İşletme çevre (tezgah)	12	2	1 (8,3)	1
İşletme çevre (duvar)	12	2	2 (16,6)	2
İşletme çevre (bıçak)	12	1	1 (8,3)	1
İşletme çevre (tekne)	12	0	0	0
Gıda (kıyma)	100	13	13 (13)	13
Gıda (köfte)	100	17	16 (16)	18
Gıda (kuşbaşı)	100	22	21 (21)	22
Gıda (süt)	100	41	40 (40)	45
Gıda (peynir)	100	20	9 (9)	22
Toplam	744	170	152 (20,4)	173

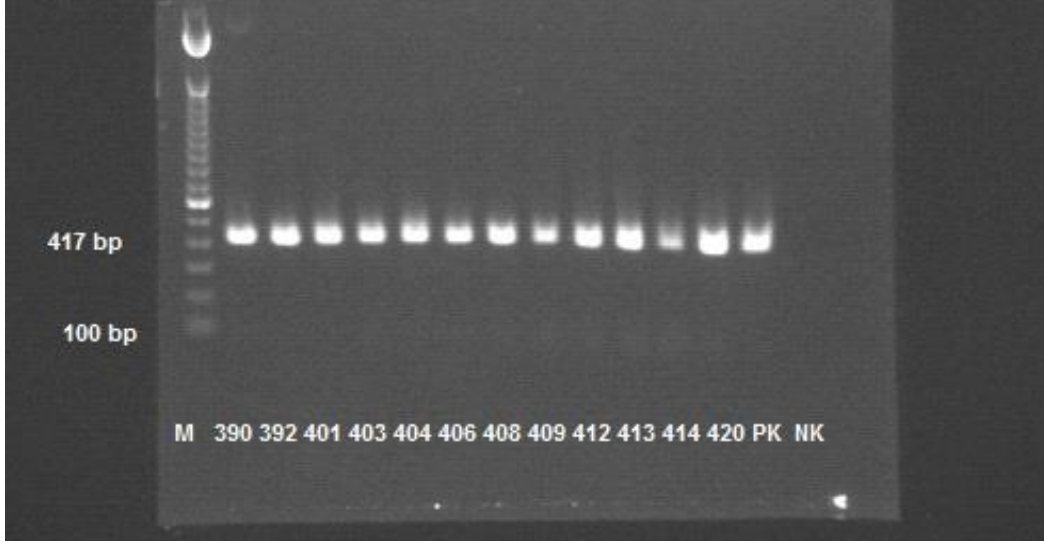
Tablo 19. Çalışmada *S. aureus* izole edilen örneklerin işletmelere göre dağılımı ve örnek türüne göre oranları (%)

Örnek türü	Et-et ürünleri İşletme A	Et-et ürünleri İşletme B	Süt-süt ürünleri İşletme C	Süt-süt ürünleri İşletme D
	<i>S. aureus</i> (+) / örnek sayısı (n) (%)	<i>S. aureus</i> (+) / örnek sayısı (n) (%)	<i>S. aureus</i> (+) / örnek sayısı (n) (%)	<i>S. aureus</i> (+) / örnek sayısı (n) (%)
P.b.s.	3/18 (16,6)	4/24 (16,6)	7/25 (28)	12/25 (48)
P.e.y.	1/18 (5,5)	1/24 (4,1)	9/25 (36)	9/25 (36)
İ.ç.(zemin)	0/3 (0)	2/3 (66,6)	0/3 (0)	1/3 (33,3)
İ.ç.(tezgah)	1/3 (33,3)	0/3 (0)	0/3 (0)	0/3 (0)
İ.ç. (duvar)	2/3 (66,6)	0/3 (0)	0/3 (0)	0/3 (0)
İ.ç.(bıçak)	0/3 (0)	0/3 (0)	0/3 (0)	1/3 (33,3)
İ.ç. (tekne)	0/3 (0)	0/3 (0)	0/3 (0)	0/3 (0)
G. (kıyma)	4/50 (8)	9/50 (18)	-	-
G. (köfte)	10/50 (20)	6/50 (12)	-	-
G. (kuşbaşı)	8/50 (16)	13/50 (26)	-	-
G.(süt)	-	-	24/50 (48)	16/50 (32)
G. (peynir)	-	-	2/50 (4)	7/50 (14)
Toplam	29 / 201 (14,4)	35 / 213 (16,4)	42 / 165 (25,4)	46 / 165 (27,8)

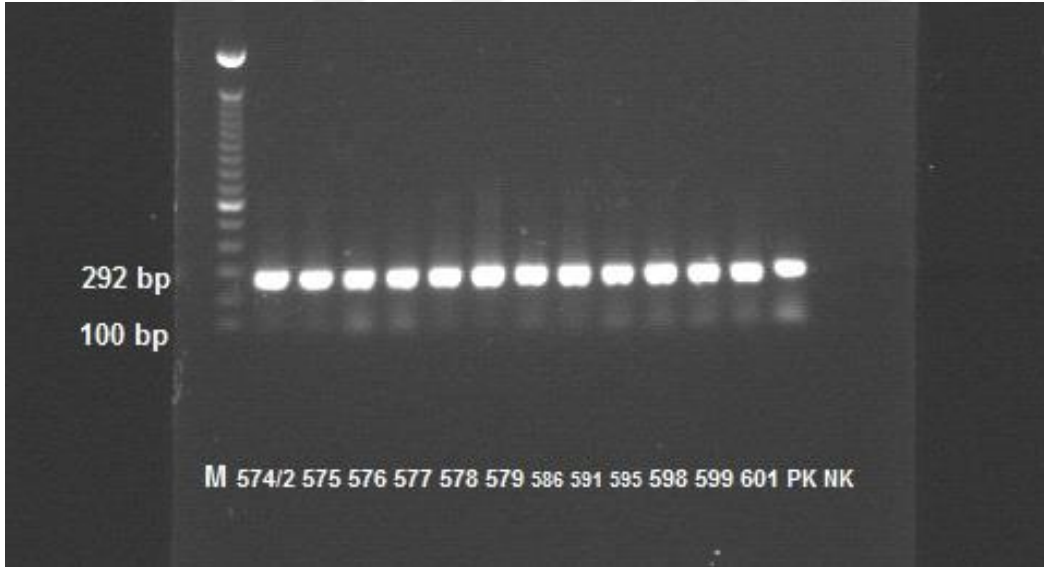
P.b.s. : Personel burun sıvabı, P.e.y. : Personel el yıkantısı, İ.ç.: İşletme çevresi, G.: Gıda

4.3. *S. aureus*'ların Moleküler Yöntemlerle Konfirmasyon Sonuçları

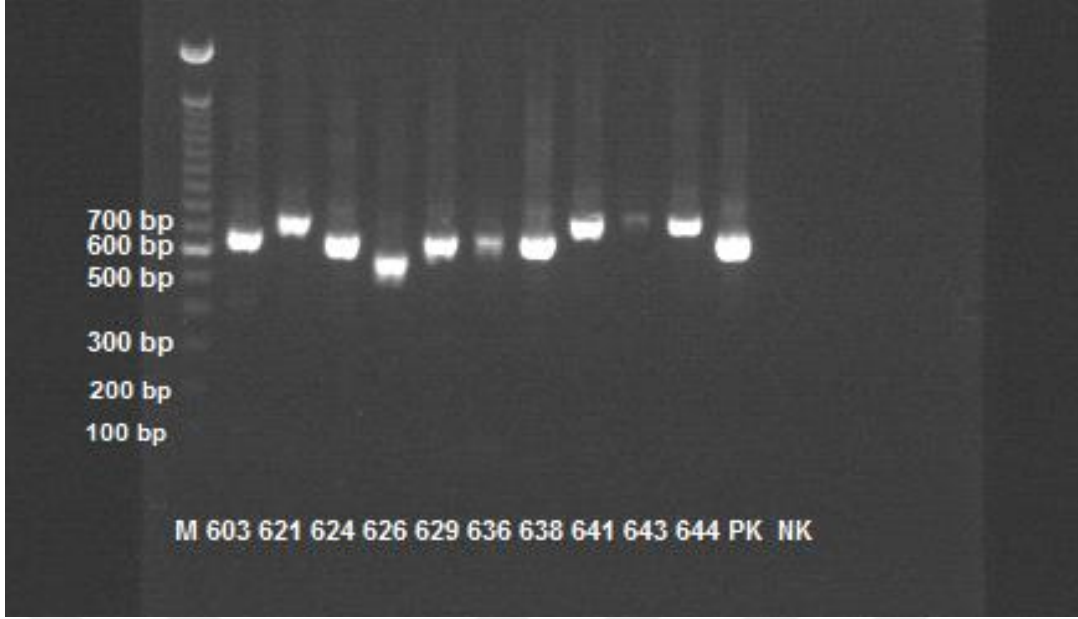
Mikrobiyolojik ekim ve biyokimyasal test sonuçlarına göre identifiye edilen 173 *S. aureus* izolatu, moleküler olarak konfirme edildi. Bu amaçla *S. aureus* izolatlarının *nuc*, *sspA* ve *coa* genleri taşıma durumları PCR ile araştırıldı. PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen PCR ürünleri, agaroz jelde elektroforeze tabi tutuldu. Elektroforez sonucunda tüm *S. aureus* izolatlarının *nuc* geni için 417 bp, *sspA* geni için 292 bp ve *coa* geni için 500-1000 bp bant verdikleri tespit edildi (Şekil 19, 20, 21).



Şekil 19. *S. aureus*'ların *nuc* genine ait 417 bp büyüklüğündeki bantların PCR agar jel görünümü
M: 100 bp moleküler marker, 390-420 arası *S. aureus* izolat numaraları, PK: pozitif kontrol (*S. aureus* ATCC 25923), NK: negatif kontrol (DNase-RNase free su)



Şekil 20. *S. aureus*'ların *sspA* genine ait 292 bp büyüklüğündeki bantların PCR agar jel görünümü
M: 100 bp moleküler marker, 574/2-601 arası *S. aureus* izolat numaraları, PK: pozitif kontrol (*S. aureus* ATCC 25923), NK: negatif kontrol (DNase-RNase free su)



Şekil 21. *S. aureus*'ların *coa* genine ait 500-1000 bp büyüklüğündeki bantların PCR agar jel görünümü
M: 100 bp moleküler marker, 603-644 arası *S. aureus* izolatları, PK: pozitif kontrol (*S. aureus* ATCC 25923), NK: negatif kontrol (DNAse-RNAse free su)

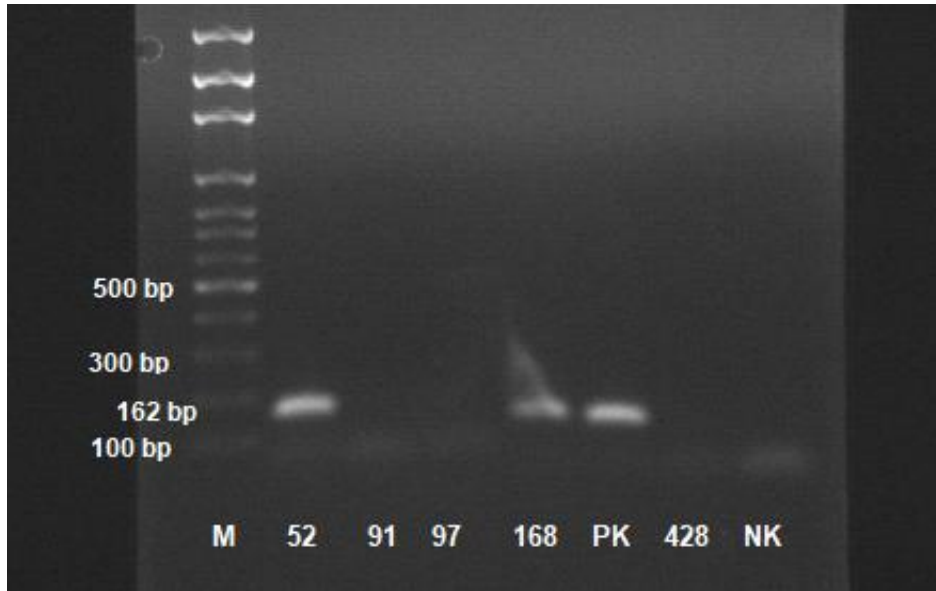
4.4. *mecA* Geni PCR Analizi Sonuçları

S. aureus izolatlarının metisilin dirençlerinin belirlenmesinde gold standart olarak kabul edilen *mecA* geninin tespitinde PCR işlemi uygulandı. PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen PCR ürünleri, agaroz jelde elektroforeze tabi tutuldu. Jel görüntülerinin incelenmesi sonucunda 173 *S. aureus* izolatının 54 (% 31,2)'ünün, 162 bp büyüklüğünde pozitif bant verdikleri görüldü. Bu izolatlar MRSA olarak kaydedildi (Şekil 22). Örnek bazında değerlendirildiğinde *S. aureus* izolasyonu yapılan 152 örneğin 46 (% 30,2)'sının, MRSA'larla kontamine olduğu görüldü. MRSA'larla en yüksek oranda kontamine olan *S. aureus* pozitif örnek grubu % 88,8 ile (8/9) peynir örnekleri oldu. Bunu takiben zemin sıvı örneklerinin % 66,6 (2/3), duvar sıvı örneklerinin % 50 (1/2), kıymaların % 38,4 (5/13), personel burun sıvı örneklerinin % 30,7 (8/26), personel el yıkantılarının % 30 (6/20), sütlerin % 30 (12/40), kuşbaşı örneklerinin % 19 (4/21)'unun MRSA ile kontamine olduğu tespit edildi. MRSA'ların örnek türlerine göre dağılımı Tablo 20'de sunuldu.

Çalışmada et ve et ürünleri ile süt ve süt ürünleri gıda gruplarından izole edilen MRSA'ların izolasyon oranları (et ve et ürünlerinde %3 ile süt ve süt ürünlerinde %10) arasında istatistiki olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p=0.003$)

Tablo 20. *mecA* geni pozitif MRSA'ların örnek türlerine göre dağılımı ve *S. aureus*' lara oranı (%)

Örnek türü	Örnek sayısı (n)	MRSA (+) örnek (%)	MRSA / <i>S. aureus</i> (%)	MRSA (+) örnek / <i>S. aureus</i> (+) örnek sayısı (%)
Personel burun sıvabı	92	8 (8,6)	8/26 (30,7)	8/26 (30,7)
Personel el yıkantısı	92	6(6,5)	6/20 (30)	6/20 (30)
İşletme çevre (zemin)	12	2(16,6)	2/3 (66,6)	2/3 (66,6)
İşletme çevre (tezgah)	12	0 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)
İşletme çevre (duvar)	12	1(8,3)	1/2 (50)	1/2 (50)
İşletme çevre (bıçak)	12	0 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)
İşletme çevre (tekne)	12	0 (0)	0/0 (0)	0/0 (0)
Gıda (kıyma)	100	5 (5)	5/13 (38,4)	5/13 (38,4)
Gıda (köfte)	100	0 (0)	0/18 (0)	0/16 (0)
Gıda (kuşbaşı)	100	4 (4)	4/22 (18,1)	4/21 (19)
Gıda (süt)	100	12 (12)	12/45 (26,6)	12/40 (30)
Gıda (peynir)	100	8 (8)	16/22 (72,7)	8/9 (88,8)
Toplam	744	46 (6,18)	54 / 173 (31,2)	46 / 152 (30,2)



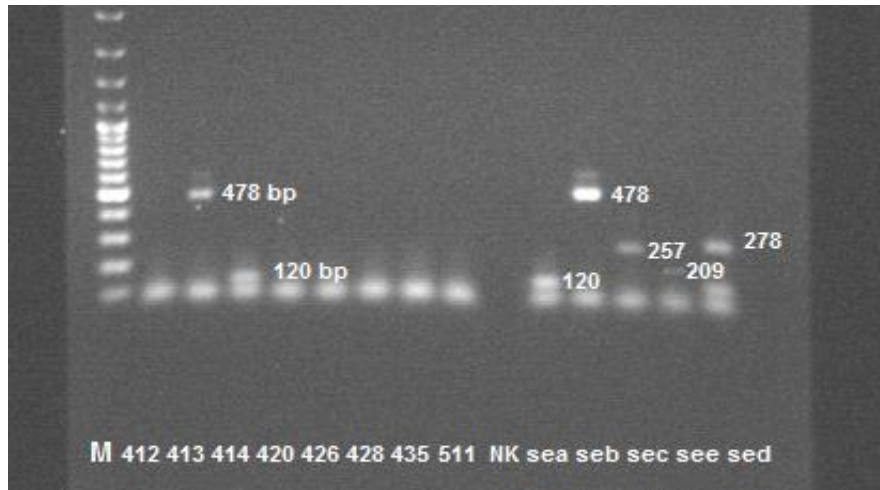
Şekil 22. *S. aureus*'ların *mecA* genine ait 162 bp büyüklüğündeki bantların PCR agar jel görünümü
M: 100 bp moleküler marker, 52,168 *mecA* pozitif *S. aureus* izolatları, 91, 97, 428 *mecA* negatif *S. aureus* izolatları, PK: pozitif kontrol (*S. aureus* ATCC 43300), NK: negatif kontrol (DNase-RNase free su)

4.5. *sea, seb, sec, sed, see* Genlerinin Multipleks PCR Sonuçları

S. aureus'ların taşıdığı *sea, seb, sec, sed* ve *see* enterotoksin genlerinin PCR ile tespiti sonrası UV görüntüleme sonucu sırasıyla 120, 478, 257, 278 ve 209 bp'de bant veren izolatlar pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 23).

Toplam 744 örnek içinde *S. aureus* ile kontamine 52 örneğin 37 (%71,15)'si enterotoksin geni taşıyan *S. aureus*'la kontamine bulundu. En fazla sayıda enterotoksin geni tespit edilen örnek grubu 9 örnekle çiğ süt grubu oldu. *S. aureus* ile kontamine el yıkantılarının %19,2 (5/26)'si, burun sıvaplarının %35 (7/20)'i, zemin sıvaplarının %33,3 (1/3)'ü, duvar sıvaplarının %50 (1/2)'si, bıçakların %100 (1/1)'ü, kıymaların %7,7 (1/13)'si, köftelerin %12,5 (2/16)'i, kuşbaşıların %14,3 (3/21)'ü, çiğ sütlerin %22,5 (9/40)'i ve peynirlerin %77,7 (7/9)'si enterotoksin geni taşıyan *S. aureus* ile kontamine bulundu (Tablo 21). İzolat bazında değerlendirildiğinde toplam 173 izolatın 50 (%28,9)'si bir veya daha fazla toksin geni yönünden pozitif bulundu.

Toksin geni/genleri tespit edilen 50 izolatdan 16 (% 31,3)'sının yalnızca bir toksin geni taşıdığı, 31 (% 60,7)'inin iki, 3 (% 5,8)'ünün ise üç toksin genini birlikte taşıdığı tespit edildi. İzolatlardan 22'sinin *sea* ve *sec* genini (% 43,1) birlikte taşıdıkları görüldü. Bunu takiben ikinci sırada yalnız *sea* geni taşıyan 6 (% 11,7) izolat, yalnız *sed* geni taşıyan 5 (% 9,8) izolat, *sea* ve *see* genlerini birlikte taşıyan 4 (% 7,8) izolatın bulunduğu tespit edildi. Enterotoksin genlerini tek veya diğer genlerle birlikte taşıma durumuna göre değerlendirildiğinde 32 izolatın (% 62,7) *sea* genine sahip olduğu görüldü (Tablo 22).



Şekil 23. *sea, seb, sec, sed, see* genlerine ait 120, 478, 257, 278 ve 209 bp büyüklüğündeki bantların agar jel görünümü, M: 100 bp moleküler marker, 413 *seb* pozitif, 414 *sea* pozitif izolatlar, 412, 420, 426, 428, 435, 511 negatif izolatlar, *sea, seb, sec, sed, see*: pozitif kontroller, NK: negatif kontrol (DNase-RNase free su)

Tablo 21. *S. aureus* izole edilen örneklerden *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* genlerine sahip örnek sayısı ve dağılımları

<i>S. aureus</i> (+) örnek sayısı (n)												<i>se</i> tespit edilen ör./ n (%)	
	<i>sea</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>see</i>	<i>sea</i> <i>sec</i>	<i>sea</i> <i>seb</i>	<i>sea</i> <i>sed</i>	<i>sea</i> <i>see</i>	<i>seb</i> <i>sec</i>	<i>sed</i> <i>see</i>	<i>see</i> <i>sed</i> <i>see</i>		
P. b. s. (n:26)	1	-	-	2	-	-	-	1	-	1	-	5/26 (19,2)	
P. e. y. (n:20)	1	-	2	1	-	-	-	1	-	1	1	7/20 (35)	
İ. ç. (zemin n:3)	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1/3 (33,3)	
İ. ç. (tezgah n:1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
İ. ç. (duvar n:2)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/2 (50)	
İ. ç. (bıçak n:1)	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1/1 (100)	
İ. ç. (tekne n:0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
G. (kıyma n:13)	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/13 (7,7)	
G. (köfte n:16)	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	2/16 (12,5)	
G. (kuşbaşı n:21)	1	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	3/21 (14,3)	
G. (süt n:40)	1	1	-	-	2	-	1	1	1	-	2	9/40 (22,5)	
G. (peynir n:9)	-	-	-	-	7	-	-	-	-	-	-	7/9 (77,7)	
Toplam	52	6	2	5	3	9	1	1	4	1	2	3	37/52 (71,1)

P.b.s. : Personel burun sıvabı, P.e.y. : Personel el yıkantısı, İ.ç.: İşletme çevresi, G. : Gıda, n : Örnek sayısı

Tablo 22. *sea, seb, sec, sed, see* genlerini taşıyan *S. aureus* izolatlarının örnek türlerine göre dağılımları ve toplam *S. aureus* izolatlarına oranları (%).

Örnek türü												Toksine sahip izolat / <i>S. aureus</i> (%)
	<i>sea</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>see</i>	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sed</i>	<i>see</i>	<i>sec</i>	<i>see</i>	<i>sed</i>	
P. b. s. (n:92)	1	-	-	2	-	-	-	1	-	1	-	5/26 (19,2)
P. e. y. (n:92)	1	-	2	1	-	-	-	1	-	1	1	7/20 (35)
İ. ç. (zemin n:12)	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1/3 (33,3)
İ. ç. (tezgah n:12)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/1 (0)
İ. ç. (duvar n:12)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/2 (50)
İ. ç. (bıçak n:12)	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1/1(100)
İ. ç. (tekne n:12)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G. (kıyma n:100)	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/13(7,6)
G. (köfte n:100)	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	2/18 (11,1)
G. (kuşbaşı n:100)	1	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	3/22 (13,6)
G. (süt n:100)	1	1	-	-	2	-	1	1	1	-	2	9/45 (20)
G. (peynir n:100)	-	-	-	-	20	-	-	-	-	-	-	7/22 (31,8)
TOPLAM 744	6	2	5	3	22	1	1	4	1	2	3	50 / 173 (28,9)

P.b.s. : Personel burun sıvabı, P.e.y. : Personel el yıkantısı, İ.ç.: İşletme çevresi, G. : Gıda, n : Örnek sayısı

MRSA olarak tespit edilen 54 izolatın 20 (% 37)'sinin bir veya daha fazla enterotoksin geni taşıdığı, 34 (% 73)'ünün ise analiz edilen toksin genlerini taşımadığı tespit edildi. Toksin geni taşıyan 20 MRSA'dan 4 (% 20)'ünün bir toksin geni taşıdığı, 15 (% 75)'inin iki, 1 (% 5)'inin de üç toksin genini birlikte taşıdığı görüldü. MRSA'ların da benzer şekilde en fazla *sea* ve *sec* genini (14 izolat, % 25,9) birlikte taşıdıkları anlaşıldı. *sea* geni taşıyan 3 (%5,5) MRSA izolatı ikinci, *sed*, *seae* ve *seade* genlerini taşıyan 1 (%1,8)'er izolat ise üçüncü sırada geldi. Enterotoksin genlerini tek veya diğer genlerle birlikte taşıma durumuna göre değerlendirildiğinde, enterotoksin geni taşıyan MRSA izolatlarında da benzer şekilde en fazla

sea geninin bulunduğu (19 izolat, % 95) görüldü. Enterotoksin genlerinden bir veya daha fazlasına pozitif bant veren MRSA'ların örnek türlerine göre dağılımı ve izole edilen MRSA'lara oranları Tablo 23'de gösterildi.

Tablo 23. Enterotoksin genlerinden bir veya daha fazlasını içeren MRSA'ların örnek türlerine göre dağılımı ve MRSA'lara oranı (%)

Örnek türü	MRSA	<i>sea</i>	<i>sed</i>	<i>seac</i>	<i>seae</i>	<i>sea</i>	<i>se</i> 'ye sahip
							MRSA / top. MRSA (%)
Personel burun sıvabı	8	1	-	-	1	-	2/8 (25)
Personel el yıkantısı	6	-	-	-	-	-	-
İşletme çevre (zemin)	2	-	1	-	-	-	1/2 (50)
İşletme çevre (duvar)	1	-	-	-	-	-	-
Gıda (kuşbaşı)	4	1	-	-	-	-	1/4 (25)
Gıda (kıyma)	5	-	-	-	-	-	-
Gıda (süt)	12	1	-	-	-	1	2/12 (16)
Gıda (peynir)	16	-	-	14	-	-	14/16 (87)
Toplam	54	3	1	14	1	1	20 / 54 (37)

4.6. İzolatların ELISA Testi ile Toksin Üretebilme Sonuçları

Çalışmada izole edilen 173 *S. aureus* izolatının enterotoksin üretebilme yetenekleri ELISA ile tespit edildi. Bu amaçla Ridascreen Set A, B, C, D, E (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany. Art. No:R4101) test kiti kullanıldı. Çalışma materyalini oluşturan 744 örnekten *S. aureus*'la kontamine 52 örneğin 48 (% 92,3)'inin bir veya daha fazla enterotoksini üretebilme kabiliyetine sahip *S. aureus* ile kontamine olduğu tespit edildi. Test edilen izolat sayısına göre değerlendirildiğinde ise 173 *S. aureus* izolatının 61 (% 35,2)'inin bir veya daha fazla enterotoksini üretebilme kabiliyetinde olduğu tespit edildi. *S. aureus* izolatlarından 112 (% 64,8)'sinin ise, test edilen enterotoksinlerden hiçbirini üretmedikleri görüldü. *S. aureus* ile kontamine el yıkantılarının %46,1 (12/26)'i, burun sıvaplarının %45 (9/20)'i, zemin sıvaplarının %66,6 (2/3)'ü, duvar sıvaplarının %100 (2/2)'ü, bıçakların %100 (1/1)'ü, kıymaların %7,7 (1/13)'si, köftelerin %6,2 (1/16)'i, kuşbaşıların %14,3 (3/21)'ü, çiğ sütlerin %25 (10/40)'i ve peynirlerin %77,7 (7/9)'si enterotoksin üretebilen *S. aureus* ile kontamine bulundu (Tablo 24).

ELISA testi sonucunda enterotoksin üretebilen 61 izolatın 11 (% 18)'inin bir tip toksin üretebildiği anlaşıldı. Aynı anda iki tip toksin üretebilen izolat sayısının 36 (% 59), üç tip toksin üretebilen izolat sayısının ise 14 (% 22,9) olduğu görüldü. Tek tip toksin üreten izolatların SEA (1 izolat), SEB (1 izolat) ve SEE (9 izolat) toksinlerini ürettikleri tespit edildi. Toksin üretebilen izolatların, PCR sonuçlarına benzer şekilde, en fazla SEA ve SEC toksinlerini (20 izolat, % 32,7) birlikte ürettikleri görüldü. Enterotoksinleri tek veya diğer enterotoksinlerle birlikte üretme durumuna göre değerlendirildiğinde, *S. aureus* izolatlarının en fazla SEA toksinini (46 izolat, % 75,4) ürettikleri görüldü. *S. aureus*'la kontamine örneklerin, enterotoksin üretebilen *S. aureus*'la kontamine örneklere göre dağılımları ve oranları Tablo 24'de, enterotoksin üretebilen *S. aureus* izolatlarının, örneklere göre dağılımları ve toplam *S. aureus*'lara oranları ise Tablo 25'de gösterildi.

Çalışmada izole edilen 54 MRSA izolatının 22 (% 40,7)'sinin bir veya daha fazla enterotoksin üretebildiği, 32 (% 59,3)'sinin ise test edilen toksinlerden hiçbirini üretemediği tespit edildi. Enterotoksin üretebilen 22 MRSA'dan 3 (% 13,6)'ünün bir tip enterotoksin ürettiği, 18 (% 81,8)'inin iki, 1 (% 4,5)'inin de üç tip enterotoksin ürettiği görüldü. MRSA'ların da hem *S. aureus* izolatlarına hem de toksin geni PCR sonuçlarına benzer şekilde, en fazla SEA ve SEC toksinlerini (14 izolat, % 63,6) birlikte ürettikleri görüldü.

Enterotoksinleri tek veya diğer enterotoksinlerle birlikte üretme durumuna göre değerlendirildiğinde, MRSA izolatlarının en fazla SEA toksinini (19 izolat, % 86,3) ürettikleri görüldü. Bunu 15 (% 68,1) izolat ile SEC toksini, 5 (% 22,7) izolat ile SEE toksini, 2 (% 9) izolat ile SED toksini ve 1 (% 4,5) izolat ile SEB toksini izledi. Enterotoksin üretebilen MRSA'ların örnek türlerine göre dağılımları ve izole edilen MRSA'lara oranları Tablo 26'da sunuldu.

Tablo 24. *S. aureus*'la kontamine örnekler içinde enterotoksin üretme yeteneğine sahip *S. aureus*'la kontamine örnek sayıları ve oranları (%)

<i>S. aureus</i> (+) örnek sayısı (n)	SE											SE tespit edilen ör. / n (%)	
	SEA	SEB	SEE	AB	AC	AD	AE	CE	DE	ABC	ADE		
P. b. s. (n:26)	-	-	4	-	-	-	3	-	-	-	5	12/26(46,1)	
P. e. y. (n:20)	-	-	2	-	-	-	2	-	2	-	3	9/20 (45)	
İ. ç. (zemin n:3)	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	2/3 (66,6)	
İ. ç. (tezgah n:1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
İ. ç. (duvar n:2)	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	2/2 (100)	
İ. ç. (bıçak n:1)	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1/1(100)	
İ. ç. (tekne n:0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
G. (kıyma n:13)	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1/13(7,7)	
G. (köfte n:16)	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1/16 (6,2)	
G. (kuşbaşı n:21)	1	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	3/21(14,3)	
G. (süt n:40)	-	1	1	-	-	1	1	-	-	5	1	10/40 (25)	
G. (peynir n:9)	-	-	-	-	7	-	-	-	-	-	-	7/9 (77,7)	
Toplam	52	1	1	9	1	7	1	9	1	4	5	9	48/52(92,3)

P.b.s. : Personel burun sıvabı, P.e.y. : Personel el yıkantısı, İ.ç.: İşletme çevresi, G. : Gıda, n : Örnek sayısı
SE : Stafilokokkal enterotoksin

Tablo 25. Enterotoksin üretebilen *S. aureus* izolatlarının örnek türlerine göre dağılımı ve toplam *S. aureus*'lara oranı (%)

Örnek Türü	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	Toksin üretebilen izolat / <i>S. aureus</i> (%)	
	A	B	E	AB	AC	AD	AE	CE	DE	ABC	ADE		
P. b. s. (n:92)	-	-	4	-	-	-	3	-	-	-	5	12/ 26 (46)	
P. e. y. (n:92)	-	-	2	-	-	-	2	-	2	-	3	9/20 (45)	
İ. ç. (zemin n:12)	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	2/3 (66)	
İ. ç. (tezgah n:12)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/1 (0)	
İ. ç. (duvar n:12)	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	2/2 (100)	
İ. ç. (bıçak n:12)	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1/1 (100)	
İ. ç. (tekne n:12)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
G. (kıyma n:100)	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1/13 (7,6)	
G. (köfte n:100)	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1/18 (5,5)	
G. (kuşbaşı n:100)	1	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	3/22 (13)	
G. (süt n:100)	-	1	1	-	-	1	1	-	-	5	1	10/45 (22)	
G. (peynir n:100)	-	-	-	-	20	-	-	-	-	-	-	20/22 (90)	
Toplam	744	1	1	9	1	20	1	9	1	4	5	9	61 / 173 (35,2)

P.b.s. : Personel burun sıvabı, P.e.y. : Personel el yıkantısı, İ.ç.: İşletme çevresi, G. : Gıda, n : Örnek sayısı
SE : Stafilokokkal enterotoksin

Tablo 26. Enterotoksin üretebilen MRSA'ların örnek türlerine göre dağılımları ve toplam MRSA'lara oranı (%)

Örnek türü	MRSA	SEA	SEE	SEAC	SEAD	SEAE	SEDE	SEABC	SE'ye sahip MRSA/top. MRSA(%)
P. b. s. (n:92)	8	-	1	-	-	2	1	-	4/8 (50)
P. e. y. (n:92)	6	-	1	-	-	-	-	-	1/6 (16,6)
İ. ç. (zemin, n:12)	2	-	-	-	-	-	-	-	-
İ. ç. (duvar n:12)	1	-	-	-	-	-	-	-	-
G. (kıyma n:100)	5	-	-	-	-	-	-	-	-
G. (kuşbaşı, n:100)	4	1	-	-	-	-	-	-	1/4 (25)
G. (süt, n:100)	12	-	-	-	1	-	-	1	2/12 (16,6)
G. (peynir, n:100)	16	-	-	14	-	-	-	-	14/16 (87,5)
Toplam	54	1	2	14	1	2	1	1	22/54 (40,7)

P.b.s. : Personel burun sıvabı, P.e.y. : Personel el yıkantısı, İ.ç.: İşletme çevresi, G. : Gıda, n : Örnek sayısı
SE : Stafilokokkal enterotoksin

4.7. PFGE Analizi Sonuçları ve MRSA İzolatlarının Klonal İlişkileri

S. aureus'lardan *mecA* geni tespiti ile MRSA olarak tespit edilen 54 izolata, OMÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilen 53 izolat ilave edilerek bir izolat havuzu oluşturuldu. Bu havuz içerisindeki izolat gruplarının kendi içlerinde ve gruplar arasındaki genetiksel ilişkileri PFGE yöntemi ile analiz edilip, dendrogram üzerinde gösterildi (Şekil 24).

Toplam 107 MRSA izolatının PFGE analizinde, saf kültür olarak elde edilmesi, lizisi, enzimle DNA restriksiyonu ve agaroz jel elektroforezi sonucunda hiç bant profili göstermeyen 9 izolat (bu çalışmada elde ettiğimiz 44, 52, 636 nolu MRSA izolatları ile H11, H28, H43, H44, H45, H46 nolu hastane kaynaklı MRSA izolatları) çalışma dışı bırakıldı.

PFGE çalışmasına alınan 98 MRSA'nın lizislerinin ardından, DNA'larının *SmaI* enzimi ile kesilmesi ve agaroz jelde 20 saatlik çok noktadan vuruşlu elektroforezi sonucu 9 ile 16 arasında değişen sayılarda bant paternleri elde edildi. Bu bant paternlerine ait görüntülerin, Bionumerics 7.6 programına yüklenip gerekli işlemlerinin yapılmasının ardından oluşturulan dendrogramın incelenmesi sonucu 67 ayrı PFGE tipi oluşturdukları tespit edildi. İzolatların

klonal benzerlik katsayıları incelendiğinde % 85 ve üzeri benzerlik gösteren 22 PFGE grubunun olduğu, bu grupların 63 izolatu barındırdığı tespit edildi. Aynı küme içinde kümeleşen MRSA izolatlarının, toplam analiz edilen MRSA'lara kümeleşme oranı % 48,9 olarak hesaplandı (Tablo 27).

Tablo 27. PFGE çalışması sonucu izolatların benzerliklerine göre oluşturdukları gruplar, grup içi benzerlik katsayıları (%) ve grupları oluşturan izolatlar

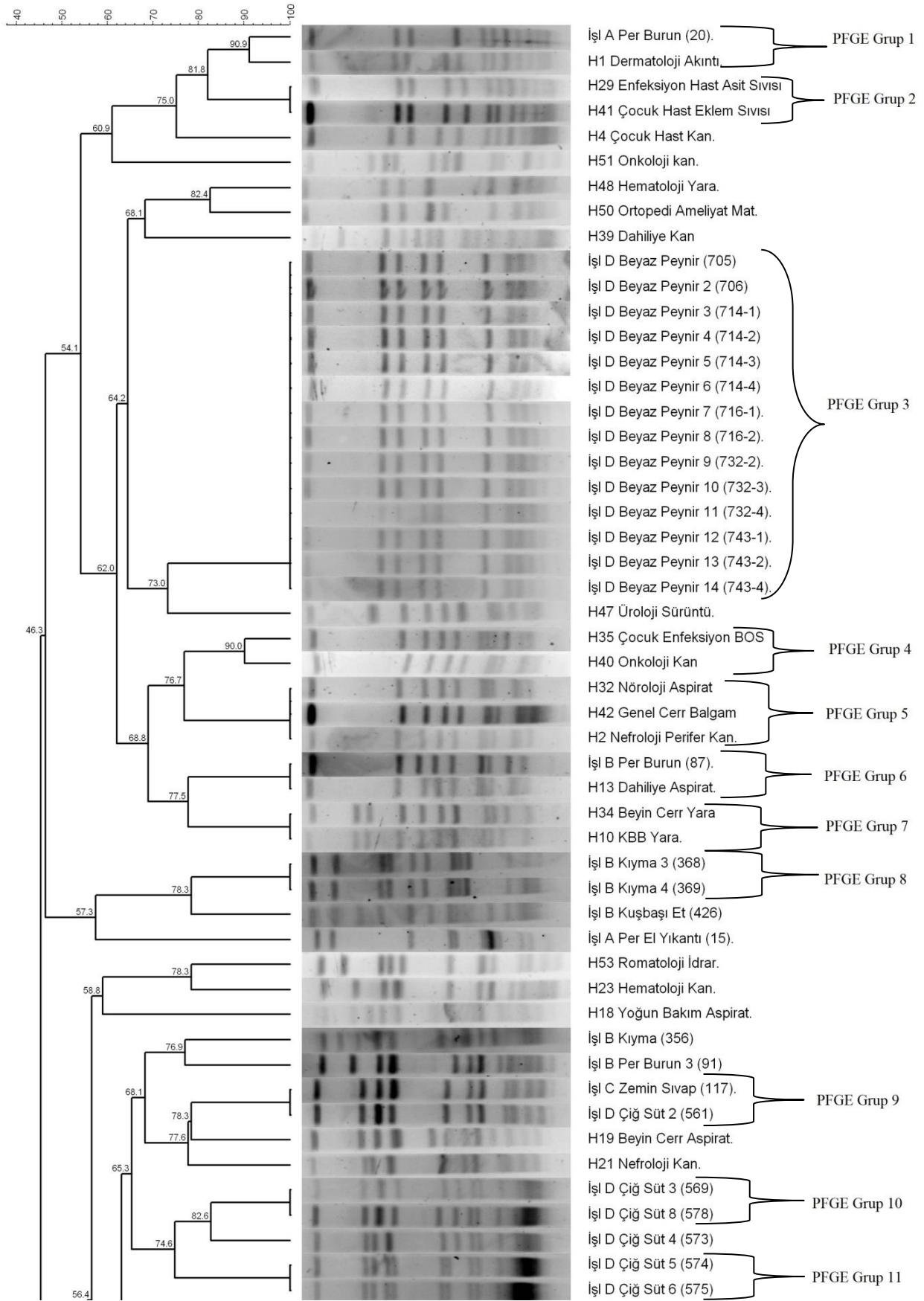
PFGE Grup numarası	Benzerlik katsayısı (%)	Gruptaki izolatlar
PFGE Grup 1	90,9	Et/et ür. işletme A Pers. burun sıvabı (20 nolu izolat) Dermatoloji akıntı (H1 nolu izolat)
PFGE Grup 2	100	Enfeksiyon hastalıkları asit sıvısı (H29 nolu izolat) Çocuk hastalıkları eklem sıvısı (H41 nolu izolat)
PFGE Grup 3	100	Süt/süt ür. işletme D Beyaz peynir (705 nolu izolat) Süt/süt ür. işletme D Beyaz peynir (706 nolu izolat) Süt/süt ür. işletme D Beyaz peynir (714/1 nolu izolat) Süt/süt ür. işletme D Beyaz peynir (714/2 nolu izolat) Süt/süt ür. işletme D Beyaz peynir (714/3 nolu izolat) Süt/süt ür. işletme D Beyaz peynir (714/4 nolu izolat) Süt/süt ür. işletme D Beyaz peynir (716/1 nolu izolat) Süt/süt ür. işletme D Beyaz peynir (716/2 nolu izolat) Süt/süt ür. işletme D Beyaz peynir (732/2 nolu izolat) Süt/süt ür. işletme D Beyaz peynir (732/3 nolu izolat) Süt/süt ür. işletme D Beyaz peynir (732/4 nolu izolat) Süt/süt ür. işletme D Beyaz peynir (743/1 nolu izolat) Süt/süt ür. işletme D Beyaz peynir (743/2 nolu izolat) Süt/süt ür. işletme D Beyaz peynir (743/4 nolu izolat)
PFGE Grup 4	90	Çocuk enfeksiyon BOS (H35 nolu izolat) Onkoloji kan (H40 nolu izolat)

Tablo 27. PFGE çalışması sonucu izolatların benzerliklerine göre oluşturdukları gruplar, grup içi benzerlik katsayıları (%) ve grupları oluşturan izolatlar

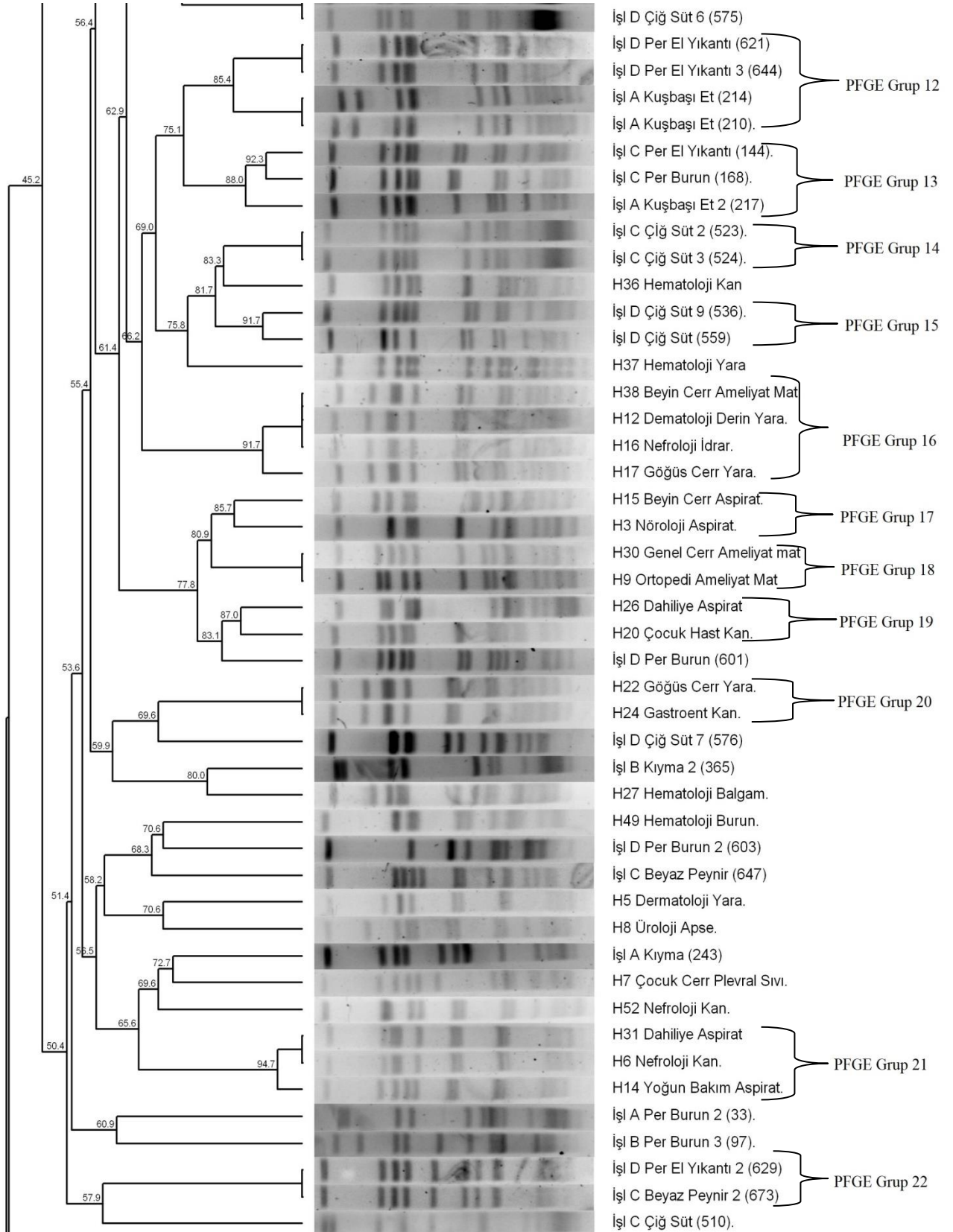
PFGE Grup numarası	Benzerlik katsayısı (%)	Gruptaki izolatlar
PFGE Grup 5	100	Nöroloji aspirat (H32 nolu izolat) Genel cerrahi balgam (H42 nolu izolat) Nefroloji perifer kan (H2 nolu izolat)
PFGE Grup 6	100	Et/et ür. işletme B Pers. burun sıvabı (87 nolu izolat) Dahiliye aspirat (H13 nolu izolat)
PFGE Grup 7	100	Beyin cerrahi yara (H34 nolu izolat) KBB servis yara (H10 nolu izolat)
PFGE Grup 8	100	Et/et ür. işletme B Kıyma (368 nolu izolat) Et/et ür. işletme B Kıyma (369 nolu izolat)
PFGE Grup 9	100	Süt/süt ür. işletme C zemin sıvap (117 nolu izolat) Süt/süt ür. işletme D çiğ süt (561 nolu izolat)
PFGE Grup 10	100	Süt/süt ür. işletme D çiğ süt (569 nolu izolat) Süt/süt ür. işletme D çiğ süt (578 nolu izolat)
PFGE Grup 11	100	Süt/süt ür. işletme D çiğ süt (574 nolu izolat) Süt/süt ür. işletme D çiğ süt (575 nolu izolat)
PFGE Grup 12	85,4	% 100 { Süt/süt ür. işletme D pers. el yıkantı (621 nolu izolat) Süt/süt ür. işletme D pers. el yıkantı (644 nolu izolat) % 100 { Et/et ür. işletme A kuşbaşı et (214 nolu izolat) Et/et ür. işletme A kuşbaşı et (210 nolu izolat)
PFGE Grup 13	88	% 92,3 { Süt/süt ür. işletme C pers. el yıkantı (144 nolu izolat) Süt/süt ür. işletme C pers. burun sıvap (168 nolu izolat) Et/et ür. işletme A kuşbaşı et (217 nolu izolat)

Tablo 27. PFGE çalışması sonucu izolatların benzerliklerine göre oluşturdukları gruplar, grup içi benzerlik katsayıları (%) ve grupları oluşturan izolatlar

PFGE Grup numarası	Benzerlik katsayısı (%)	Gruptaki izolatlar
PFGE Grup 14	100	Süt/süt ür. işletme C çiğ süt (523 nolu izolat) Süt/süt ür. işletme C çiğ süt (524 nolu izolat)
PFGE Grup 15	91,7	Süt/süt ür. işletme D çiğ süt (536 nolu izolat) Süt/süt ür. işletme D çiğ süt (559 nolu izolat)
PFGE Grup 16	91,7	% 100 { Beyin cerrahi ameliyat materyali (H38 nolu izolat) Dermatoloji derin yara (H12 nolu izolat) Nefroloji idrar kültürü (H16 nolu izolat) Göğüs cerrahi yara (H17 nolu izolat)
PFGE Grup 17	85,7	Beyin cerrahi aspirat (H15 nolu izolat) Nöroloji aspirat (H3 nolu izolat)
PFGE Grup 18	100	Genel cerrahi ameliyat materyali (H30 nolu izolat) Ortopedi ameliyat materyali (H9 nolu izolat)
PFGE Grup 19	87	Dahiliye aspirat (H26 nolu izolat) Çocuk hastalıkları kan kültürü (H20 nolu izolat)
PFGE Grup 20	100	Göğüs cerrahi yara (H22 nolu izolat) Gastroenteroloji kan kültürü (H24 nolu izolat)
PFGE Grup 21	94,7	Dahiliye aspirat (H31 nolu izolat) Nefroloji perifer kan (H6 nolu izolat) Yoğun bakım aspirat (H14 nolu izolat)
PFGE Grup 22	100	Süt/süt ür. işletme D pers. el yıkantı (629 nolu izolat) Süt/süt ür. işletme C beyaz peynir (673 nolu izolat)



Şekil 24. Çevre, gıda ve insan kaynaklı 97 MRSA izolatının PFGE analizi sonrası klonal ilişkilerini ve yakınlık oranlarını (%) gösteren dendrogram.



Şekil 24. Çevre, gıda ve insan kaynaklı 97 MRSA izolatının PFGE analizi sonrası klonal ilişkilerini ve yakınlık oranlarını (%) gösteren dendrogram (devamı)

Bu gruplardan 13'ünün % 100 benzerliğe sahip olup, aynı kümede yer alan 39 MRSA izolatı tarafından oluşturulduğu gözlemlendi. Diğer 9 grubun benzerlik katsayıları ise büyükten küçüğe % 94,7, % 91,7, % 91,7, % 90,9, % 90, % 88, % 87, % 85,7, % 85,4 olup, bu gruplarda da 24 izolat bulunduğu görüldü.

En büyük grup olan PFGE Grup 3, birbirleriyle % 100 benzerlik gösteren 14 MRSA izolatı barındırdığı ve tek kümeye yerleştikleri, birbirleriyle % 100 benzerlik gösteren ikişer MRSA izolatı barındıran 14 küme bulunduğu belirlendi.



5. TARTIŞMA

Toplum sağlığı bir bütün olarak dşnldğinde, gıda kaynaklı enfeksiyon ve intoksikasyonlar, toplumun her kesimini etkileyen ciddi sorunlar olarak karşıımıza çıkmaktadır (Loir ve ark., 2003). Oldukça önemli bir gıda patojeni olan *S. aureus*'ların hayvan enfeksiyonları ile ilişkili olduğu, bu etkenlere çok yakın genetik benzerlik gösteren izolatların, aynı zamanda insan enfeksiyonlarından da izole edildiği gösterilmektedir (Smith, 2015).

S. aureus'lar besin amacıyla yetiştirilen hayvanlardan gıdalara, gıdalardan insanlara veya insanlardan gıdalara bulaşması ile besin zincirine girebilmektedir (Anon, 2009). Sonuçta, enterotoksijenik özellik taşıyan stafilokokların, gıdalarda 10^6 kob/g ve yukarı seviyeye ulaşması ile bir ekzotoksin türü olan enterotoksin üretmesi ve bunun alimenter yolla alınması sonucu stafilokokal gıda zehirlenmeleri oluşmaktadır (Loir ve ark. 2003). Gıda sektörü çalışanları arasında kişisel hijyen eksikliği, gıda kaynaklı enfeksiyon ve intoksikasyonların oluşumunda önemli bir risk faktörü olarak yer almaktadır (Anon, 2009).

MRSA'lar, günümüzde halen hastane enfeksiyonlarında büyük problem teşkil etmekte, tedavide büyük zorluklara neden olmakta ve birçok vaka ölümle sonuçlanmaktadır (Şen ve Özdemir, 2016). Dirençli bakteriler, nozokomiyal ve toplum kaynaklı enfeksiyonlardan gittikçe artan oranlarda izole edilmektedir. Farklı ülkelerde 1990'ların ortalarında, toplum kökenli ve hastane dışı enfeksiyonların sebebi olarak gösterilen yeni insan kaynaklı MRSA izolatları tespit edilmiş, birkaç yıl sonra benzer izolatların atlardan izole edildiği görülmüştür (Anon, 2015). Dirençli suşlar sebebiyle ortaya çıkan bu enfeksiyon ve intoksikasyonların tipinin bilinmesi, etkenin rezervuarının ve kaynağının açıklığa kavuşturulması, bulaşma yollarının aydınlatılarak engellenmesi gereklidir. Aksi takdirde, dirençli suşların yayılmasını kontrol etmek mümkün olmayacaktır (Anon, 2015).

Bu çalışmada, MRSA'larla mücadele amacına katkı sağlamak üzere, Samsun ve çevresinde faaliyet gösteren iki et, iki süt ürünleri olmak üzere dört hayvansal gıda üretim tesisinin alet/ekipman/çevresel ortamları, işletmede çalışan personeller ve ürettikleri ürünler olmak üzere üç farklı kaynaktan (çevre, gıda ve insan kaynağı) toplam 744 örnek toplandı.

Toplanan 744 örnekten 173 *S. aureus* izolatı elde edildi. İzolatların 54 (%31,2)'ünde *mecA* geni tespit edildi ve bu izolatlar MRSA olarak değerlendirildi. 50 (%28,9) izolatın enterotoksin genlerinden bir veya daha fazlasını taşıdığı, 61 (%35,2) izolatın da enterotoksin üretebildiği görüldü.

S. aureus insanlarda en fazla burundan, boğaz boşluğundan, cilt yaraları ve apselerden izole edilmektedir. Bulaşma açısından burun bölgesi taşıyıcılığı, en yüksek riski

barındırmaktadır (Sepin-Özen ve ark., 2013). ABD’de 1975 ile 1998 yılları arasında ortaya çıkan gıda zehirlenme salgınlarının incelenmesinde, salgınların %93’ünde, salgın öncesi veya sonrasında, hasta olan gıda üretiminde çalışan personeller ile salgınların ilişkili olduğu bildirilmiştir (Guzewich, 1999). Personellerin düşük el hijyeni ve uygun olmayan eldiven kullanımının da etkisiyle, üretimi sırasında çok fazla elle manipülasyonun gerektiği gıdaların, *S. aureus* ile kontaminasyona çok açık olduğu gösterilmiştir (Ayçiçek ve ark., 2004). EFSA raporlarına göre *S. aureus*, sağlık durumu iyi olan taşıyıcı bireylerin burnunda, hastalık oluşturmaksızın kolonize olmakta ve bunun oranının bazı çalışmalarda %20’ye kadar ulaştığı, sürekli olmayan aralıklı taşıyıcı bireylerin oranını da %60’a kadar çıktığı bildirilmektedir (Anon, 2009).

Bu çalışmada, gıda işletmelerinde çalışan 92 personelin el yıkantıları ve burun sıvap örnekleri, *S. aureus* portörlüğü açısından incelendi ve personel burun sıvaplarında 26 (%28,2) personel el yıkantılarında 20 örnekten (%21,7) *S. aureus* izole edildi.

Ülkemizde bu anlamda yapılan çalışmalar incelendiğinde, Şimşek ve ark. (2009), Şanlıurfa’da 299 gıda işletmesi personeli burun sıvaplarından %23,1’inden, Bal (2015), Ankara’da eczacı ve eczane çalışanı 300 personelden topladığı burun sıvaplarında 64 (%21,3)’ünden *S. aureus* izolasyonu yaptıklarını bildirmişlerdir. Daha yüksek sonuçlara ulaşan Aydın ve ark. (2007), İstanbul, Tekirdağ ve Edirne İllerinde faaliyet gösteren gıda işletmelerinin personellerinden, 20 saniye boyunca ellerini steril MRD içinde yıkamak suretiyle el yıkantıları toplamışlar, sonuçta 266 örneğin 103 (%38,7)’ünden, Ayçiçek ve ark., (2004) hastane mutfak çalışanlarının 180 el yıkantısının 126 (%70)’sından *S. aureus* izole etmişlerdir.

Bununla birlikte farklı illerde yapılan araştırmaların çoğunun daha düşük sonuçlandığı göze çarpmaktadır. Pala ve ark. (2010), Bursa İlinde 1115 gıda çalışanında, portör muayenesi için toplanan burun sıvaplarının 169 (%15,2)’unu *S. aureus* yönünden, Gökmen ve ark. (2013), Konya’da gıda işletmelerinde çalışan 80 personelin el sıvap örneklerinin 8 (%10)’ini *S. aureus*, 11 (%13,7)’ini *S. intermedius* yönünden pozitif bulmuşlardır. Erdoğan ve Aslan (2011), otel ve restoran personeli 715 kişinin burun ve boğaz sürüntü örneklerinden 52 burun, 21 boğaz kültürü olmak üzere toplam 73 (%10,2) örnekten, Hacıbektaşoğlu ve ark. (1993) ise gıda ile temas eden 450 personelden 46 (%10,2)’sının burun sıvap örneğinden *S. aureus* tespit etmişlerdir. Gülbandılar (2009), Kütahya’da portör muayenesi için başvuru yapan 3048 gıda işletmesi personelinin burun mukozalarından alınan sıvaplardan 217 (%7,11)’sinden, Sepin-Özen ve ark. (2013), Antalya’da sekiz aylık süreçte, portör muayenesi yapılan 15.600 gıda çalışanının 526 (%3,37)’sında *S. aureus* taşıyıcılığı tespit ettiklerini yayınlamışlardır.

Farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda ise benzer sonuçlar alınmıştır. Boncompain ve ark. (2017), Arjantin’de, iki ayrı hastanede çalışan toplam 320 sağlık çalışanından burun sıvap örnekleri almışlar, 96 (%30) personelde *S. aureus* kolonizasyonu tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Kottler ve ark. (2010), Kolombiya’da veteriner sağlık çalışanı 211 personelin burun sıvaplarının 54 (%25,6)’ünde, insan sağlığı çalışanı 162 personelin burun sıvaplarının 41 (%25,3)’inde, Jorda ve ark., (2012), Arjantin’de gıda üretiminde çalışan 88 kişinin burun sıvaplarından 33 (%37,5)’ünde, Afrough ve ark. (2013) ise İran’da üç farklı hastaneden 157 personelin burun sıvaplarından 40 (%25,4)’ünde *S. aureus*’u pozitif tespit etmişlerdir. Ho ve ark. (2013), Hong Kong’ta 434 ticari mutfak çalışanı olan personellerin burun sıvaplarının 99 (%22,1)’undan, Assefa ve ark. (2015), Etiyopya’da 230 kafeterya çalışanından topladıkları el yıkantı örneğinin 54 (%23,5)’ünden, Khatri ve ark., (2017), Nepal’de 252 sağlık çalışanının burun sıvaplarından 46 (%18,3)’sından *S. aureus* izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Daha yüksek sonuçlara ulaşan Loeto ve ark. (2007), bir Afrika ülkesi olan Bostwana’da, 200 gıda ile temas eden personelden burun sıvapları ve steril ıslak mendiller aracılığıyla el ve yüz sürüntüleri toplamışlar ve 200 personelin 115 (%57,5)’inden *S. aureus* izole etmişlerdir. İzole ettikleri 204 *S. aureus*’un 91 (%44,6)’ini burun sıvaplarından, 63 (%30,9)’ünü el sürüntülerinden ve 50 (%24,5)’sini yüz sürüntülerinden elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Personellerin el örneklerinin toplanması aşamasında, sıvap yöntemi kullanılan çalışmaların izolasyon oranının, yıkama yöntemine göre daha düşük olduğu ve ön zenginleştirme uygulanan çalışmaların da daha yüksek izolasyon oranlarına ulaştıkları dikkat çekmektedir. Bizim çalışmamızda da yıkama yöntemi ile selektif ön zenginleştirme uygulandı ve sıvap yöntemi uygulanan çalışmalara göre daha yüksek oranda izolasyon yapıldı.

Tüm bu sonuçlara bakıldığında, insanlarda *S. aureus* taşıyıcılığının, özellikle diğer insanlara bulaştırma potansiyeli yüksek olan gıda ve sağlık sektörlerinde çok ciddi boyutlarda olduğu görülmektedir. Bu yüzden özellikle bu sektör çalışanlarında kişisel hijyen kurallarının mutlaka uygulanması, eldiven, maske, bone kullanımına riayet edilmesi, portör muayenelerinin aksatılmaması gibi önlemler önem kazanmaktadır.

Gıdaların üretildiği, üretim sonrası işlemlerin yapıldığı ortamın havasında ve gıdaların temas ettiği yüzeylerde, yüksek sayıda bakteri bulunduğu, gıdalara bu yolla gerçekleşen çapraz kontaminasyonun, gıdaların mikrobiyolojik kalitelerini etkileyen en büyük risk faktörü olduğu gösterilmiştir (Syne ve ark.,2013). Benzer şekilde, et işleme tesislerinde de insan elinin ve üretimde kullanılan ekipmanları içeren çevresel faktörlerin, *S. aureus*

kontaminasyonunu çok yüksek seviyelere taşıdığı, yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Saide-Albornoz ve ark., 1995).

Bu çalışmada, işletme çevresel örneklemelerinde, zemin örneklerinden %25 (3/12), duvar örneklerinden %16,6 (2/12), tezgahlardan %8,3 (1/12), bıçaklardan %8,3 (1/12) oranında *S. aureus* izole edildi. İşletmelerde kullanılan teknelerden alınan örneklerden ise *S. aureus* izolasyonu yapılamadı. Toplamda çevresel örneklerden %11,6 (7/60) oranında *S. aureus* tespit edildi.

Sayın (2007), Siirt ilinde faaliyet gösteren 15 lokanta/restoranın ekipman ve çevresel ortamlarından 135 sıvap örneği aldığını ve tezgah örneklerinin %13,3'ünden, buzdolabı kapı kolları örneklerinin %13,3'ünden, musluk başı örneklerinin %7,7'sinden havluluk örneklerinin %7,1'inden, tencere örneklerinin %7,7'sinden, tava örneklerinin %25'inden, iş önlükleri örneklerinin %14,3'ünden *S. aureus* izole ettiğini bildirmiştir.

Aydın ve ark. (2007), İstanbul, Tekirdağ ve Edirne illerinde faaliyet gösteren gıda işletmelerinin kazanlardan, teknelerden, et asma çengellerinden, doğrama tahtalarından ve tezgâhlardan aldıkları toplam 70 sıvap örneğinin 18 (%25,3)'inden *S. aureus* izole etmişlerdir.

Fidan ve Ağaoğlu (2004), Ağrı'da bulunan lokanta mutfaklarından çevresel örnekler toplamışlar ve doğrama tahtalarının % 40'ını, işlem tezgâhlarının %30'unu, işlem bıçaklarının %15'ini, buzdolabı kapı kollarının %65'ini, servis masalarının %50'sini, kurulama bezlerinin %15'ini, iş önlüklerinin %10'unu koagülaz pozitif stafilkoklar yönünden pozitif bulmuşlardır.

Bir çok çalışma sonucunda araştırmacılar, gıda işletmelerinde alet ve ekipmanların temizliği ve dezenfektan kullanımının düzenli ve kontrollü hale getirilmesiyle birlikte, hijyenik kontrollerinin de düzenli olarak yapılmasını tavsiye etmektedirler (Aydın ve ark. 2007). Bizim çalışmamızda da, çevresel örneklerin *S. aureus* ile kontaminasyon düzeyleri yüksek bulunmuş olup, kişisel hijyenin yanı sıra, alet-ekipman hijyeninin sağlanması ve devam ettirilebilmesi yönünden, çalışanlara eğitim verilmesi, çevresel ortamların hijyen kontrollerinin mutlaka düzenli yapılması gerektiği kanaati ortaya çıkmıştır.

Hayvan enfeksiyonları ile ilişkili *S. aureus*'ların insan enfeksiyonları ile de ilişkili olduğu, bu ilişkinin hastane kaynaklı enfeksiyon etkeni *S. aureus*'ları da kapsadığı, son yıllardaki bir çok çalışma ile ispat edilmiştir (Smith, 2015). Brezilya'da 1999'da pastörize edilmemiş sütleri tüketen 328 kişinin etkilendiği bir salgında, kontaminasyonun tek kaynağının mastitisli bir sığır olduğu belirlenmiştir (Carmo ve ark., 2002).

Bu çalışmada, işletmelere gelen çiğ sütlerden toplanan örneklerin %40 (40/100) oranında *S. aureus* ile kontamine olduğu tespit edildi. Ülkemizde çiğ sütte yapılan çalışmalar

incelendiğinde bizim çalışmamıza benzer olarak, Kuyucuoğlu ve Uçar (2001), Afyon İliinden topladıkları 164 süt örneğinden yaptıkları izolasyon çalışması sonucunda %40,1 oranında *S. aureus* bulduklarını bildirmişlerdir. Gökmen ve ark. (2013) da, Konya’da faaliyet gösteren süt işletmelerinden temin ettikleri 80 çiğ süt örneğinden, 49 *S. aureus* izolatu elde etmişlerdir. Yine Muratoğlu (2010) İstanbul’dan toplanan 122 süttten, %43,3 oranında *S. aureus* izole ettiğini bildirmiştir.

Bazı araştırmacılar da farklı illerde benzer çalışmalar yapmışlar ve çalışmamızdan daha düşük oranlara ulaşmışlardır. Alisharlı ve Solmaz (2003) Van ili ve çevresinden topladıkları 100 adet çiğ süt örneğinde %31, Yücel ve Anıl (2011) Ankara’dan toplanan 190 süttten %35, Nassara (2011) İstanbul’dan toplanan çiğ sütlerde %29,3, Genç ve Kaya (2015) Aydın İliinden topladıkları 100 süttten %28 oranında *S. aureus* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Saka ve Terzi Gülel (2018) de, Samsun ilinden topladıkları 100 manda süttünün 30 (%30)’undan *S. aureus* izole ettiklerini belirtmişlerdir.

Benzer çalışmalar, farklı dünya ülkelerinde farklı oranlarla sonuçlanmıştır. Bunlar içinde en yüksek oranlara ulaşanlardan biri Norveç’te Jorgensen ve ark. (2005)’nin elde ettiği sonuçlardır. 220 inek süttü toplama tankının %75’inden, 213 keçi süttü toplama tankının %96,2’sından *S. aureus* izole etmişlerdir. Oranın bu kadar yüksek olmasının sebebi, kontamine sütlerin sayısı az olsa da, ilave edildikleri tankı bulaştırıyor olmasından kaynaklanmaktadır. İzolasyon oranı yüksek bir çalışma da Brezilya’da, Rall ve ark. (2008) tarafından yapılmıştır. Topladıkları 54 süt örneğinin 38 (%70,4)’inden *S. aureus* izole etmişlerdir. Araştırmacılar, izolasyon oranının yüksek olmasını sütlerin hijyenik kalitesinin çok düşük ve taşıma-depolamada soğuk zincirin korunmamasından kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Bizim çalışma sonuçlarımıza benzer olarak Wang ve ark. (2018), Çin’de topladıkları 195 çiğ süt örneğinin 90 (%46,2)’sından *S. aureus* izole etmişlerdir. Yine Ganai ve ark. (2016), Afganistan’da 60 çiğ süt örneğinden 36 (%60)’sından *S. aureus* izole etmişler, izolatların %44,1’inin *mecA* pozitif MRSA olduğunu bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızdan daha düşük oranda izolasyon oranına ulaşan Korpysa-Dzirba ve Osek (2011), Polonya’da topladıkları 237 çiğ süt örneğinin 77 (%37,5)’sinden, Suleiman ve ark. (2012), Nijerya’da subklinik mastitisli sığırlardan topladıkları 339 süt örneğinin 102 (%30,1)’sinden, Jahan ve ark. (2015), Bangladeş’te topladıkları 47 çiğ süt örneğinin 12 (%25,5)’sinden, Patel ve ark. (2018), Hindistan’da topladıkları 118 çiğ süt örneğinin 12 (%10,16)’sinden *S. aureus* izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Örnekleme yapılan gıda, sıvı örnekleri ve yıkantılarda, araştırılan bakteriler arasında, soğuk-sıcak, pH, a_w , tuz konsantrasyonu, rekabetçi flora vb. koşulların, optimal seviyede olmaması nedeniyle, elbette hücrel olarak zarar görmüş bakteriler bulunmaktadır. Çalışmada uyguladığımız selektif ön zenginleştirme metodu, bu hasarlı bakterilere onarım şansı tanıyıp, izolasyon şansını ve miktarını artırdığı kanaatine varılmıştır. Tüm bunlarla birlikte, çiğ süt toplayan ve Samsun'da faaliyet gösteren süt işletmelerinden yapılan süt örnekleminde ulaştığımız *S. aureus* izolasyon oranı, süt üretilen sığırların klinik-subklinik mastitisli olabileceklerini, sağım hijyeni, depolama ve taşıma işlemlerinin hijyenik kalitesinin düşük olduğunu işaret etmektedir.

Türkiye'de ve Dünyada yapılan çalışmalar, hijyenik olmayan şartlarda üretilip satılan peynirlerin, yüksek miktarda *S. aureus* ile kontamine olduğunu göstermektedir. Kontamine peynirlerde, enterotoksijenik suşlar tarafından üretilen SE'ler ısıya yüksek direnç göstermektedir. Bu yüzden bir gıda maddesinde yapılan mikrobiyolojik kontrollerde az sayıda *S. aureus* tespit edilmesi stafilokokkal zehirlenmeye neden olmayacağı anlamına gelmemektedir.

Peynir tüketimine bağlı *S. aureus* intoksikasyonlarının sebepleri incelendiğinde, kontamine hammadde kullanımı, ısı işleminin yetersiz uygulanması, üretim esnasında çapraz kontaminasyon ve uygun olmayan depolamanın öne çıktığı bildirilmektedir (Küçükçetin ve Milci, 2007). Bu çalışmada örnekleme yapılan işletmelerde üretilen ve reyonlarında ambalajlı olarak satışa sunulan pastörize beyaz peynirlerde, %9 (9/100) oranında *S. aureus* izolasyonu yapıldı. Elde edilen 22 *S. aureus* izolatının 16 (%72,7)'sının MRSA olduğu tespit edildi.

Ülkemizde peynirlerde *S. aureus* izolasyon çalışmaları incelendiğinde, Muratoğlu (2010), İstanbul'dan toplanan 92 peynir örneğinin 25 (%27,2)'inden, Yücel ve Anıl (2011), Ankara'dan temin edilen 90 kaşar, tulum ve lor peynirlerinin % 20,2'sinden, Bingöl ve ark. (2012), İstanbul'dan topladıkları 150 salamura, mihaliç hellim, tulum, örgü ve çivil peynirlerinin 40 (%26,6)'ında, Urhan (2012), Ankara'da marketlerden (5 adet) ve semt pazarlarında açıkta satıştan (45 adet) temin edilen 50 beyaz peynir örneğinin 11 (%22)'inden *S. aureus* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Aslan (2012), Bursa'da perakende satış reyonlarından topladığı çeşitli peynir türlerinden oluşan 45 örneğin 10 (%22)'unun, *S. aureus* ile kontamine olduğunu belirlediğini yayınlamıştır. Saka ve Terzi Gülel (2018) de, Samsun'da topladıkları 50 manda peynirinden 17 (%34)'sinden *S. aureus* izole ettiklerini belirtmişlerdir.

Gökmen ve ark. (2013), Konya’da gıda işletmelerinden topladıkları 80 pastörize beyaz peynir örneğinin 3 (%3,75)’ünden *S. aureus* izolasyonu yapmışlardır. Kaynar ve ark. (2005) ise, Ankara’da marketlerden temin ettikleri 20 pastörize beyaz peynir örneğinde *S. aureus* izole etmediklerini bildirmişlerdir. Çelik (1982) ise yaptığı deneysel çalışmada çiğ süttten yapılmış ve olgunlaşmasını tamamlamış salamura beyaz peynirlerde *S. aureus* tespit edilirken, pastörize süttten yapılarak olgunlaştırılmış beyaz peynirlerde bu bakteriye rastlamadığını belirtmiştir. Mutluer ve ark. (1993), benzer şekilde yaptıkları deneysel çalışmada, 10^5 kob/ml *S. aureus* ile kontamine ettikleri beyaz peynirde, olgunlaşma sürecinde *S. aureus* sayısının azaldığı, 60. günde 10^2 kob/g seviyesine düştüğü, ancak tamamen elemine olmadığını tespit etmişlerdir.

Diğer ülkelerde de benzer çalışmalar yapılmış, bu çalışmada elde edilen sonuçlara yakın olarak, Sasidharan ve ark. (2011), Malezya’da topladıkları 50 süt, yoğurt ve peynir örneğinin 5 (%10)’inden, Basanisi ve ark. (2017) İtalya’da toplanan 3760 süt ve peynirlerde 484 (%12,9)’ünden *S. aureus* izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Costa ve ark. (2012), Brezilya’da pastörize sütlerden üretilen ve marketlerde pazarlanan 100 minas frescal tip peynirden 24 (%24)’ünün, *S. aureus* ile kontamine olduğunu tespit etmişlerdir.

Farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda, süttün pastörize edilmeden peynir yapılması ve açıkta pazarlanmasının *S. aureus* kontaminasyonunu artırdığı gösterilmiştir. Andre ve ark. (2008), Brezilya’da topladıkları 24 peynir örneğinin 17 (%70,8)’sinin, Jaber (2011), Irak’da üç farklı bölgede topladığı beyaz peynirlerin sırasıyla %53,3 , %50 ve %13,3’ünün, *S. aureus* ile kontamine olduğunu bildirmişlerdir.

İncelenen peynirlerin pastörize sütlerden üretilmiş olmasına rağmen, elde edilen bu yüksek oran, peynir yapımında kullanılan sütlerin, subklinik mastitis etkeni *S. aureus*’larla kontamine olarak işletmeye geldiğini, işletmelerde uygulanan pastörizasyonun yetersiz olabileceğini veya çalışmada örnek aldığımız işletmelerin, çevresel örneklerinden de *S. aureus* izole edildiğinden dolayı, üretim esnasında çapraz kontaminasyonu akla getirmektedir. Bununla birlikte, ambalajlama esnasında da çapraz kontaminasyonun oluşması muhtemeldir. Bu sonuç işletme ve personel hijyeninin yetersizliğini göstermekte, ek önlemlerin alınmasını gerekli kılmaktadır.

Et/et ürünleri örnek grubundan, çalışma boyunca toplanan 100 kuşbaşı et örneğinin 21’inin (% 21), 100 hazır köfte örneğinin 16’sının (%16), 100 kıyma örneğinin ise 13’ünün (% 13) *S. aureus* ile kontamine olduğu tespit edildi.

Çalışma sonuçlarımıza benzer şekilde Aydın ve ark. (2011a), Bursa, Edirne ve İstanbul illerinden toplanan etlerden %10,4 oranında *S. aureus* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Gündoğan ve Ataol (2012), Ankara’da marketlerden temin ettikleri 30 kıyma ve tavuk eti örneğinden 6 (%20)’sından *S. aureus* izolasyonu yaptıklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmadan biraz düşük olarak Özdemir ve Keyvan (2016), Ankara İlinden marketlerden topladıkları 75 et örneğinden 11 (%14,6)’inden, Keyvan (2014), Ankara’da iki farklı mezbahane 120 karkas örneklemeinden 15 (%12,5)’inden, Aslan (2012), Bursa’da içinde hazır köfte ve dönerin de bulunduğu 190 şarküteri ve hazır gıda ürününün 47 (%24,7)’sinden, Kök ve ark. (2007), Aydın’da 100 fermente sucuğun 12 (%12)’sinden *S. aureus* izolasyonu yapmışlardır.

Benzer çalışmaların yapıldığı farklı ülkelerde de paralel sonuçlara ulaşılmıştır. ABD’de Bhargava ve ark. (2011), altı aylık bir süreçte topladıkları 156 sığır etinin 32 (%20,5)’sinin *S. aureus* ile kontamine olduğunu bildirmişlerdir. Hollanda’da de Boer ve ark. (2009), topladıkları et ve et ürünleri içerisinde sığır etinden %10,9 oranında *S. aureus* izole etmişlerdir. Yine Mısır’da Khalifa ve ark. (2014), kasap ve marketlerden 250 et ve et ürünü toplamışlar, 25 (%10)’ini *S. aureus* ile kontamine bulmuşlardır.

Genel olarak çalışma boyunca toplanan kuşbaşı et, kıyma ve hazır köfteden izolasyon oranı hem ülkemizde hem de farklı ülkelerde yapılan çalışmalar ile benzerlik göstermektedir. Bu çalışmada kuşbaşı örneklerinden %21 oranında *S. aureus* izole edilmesi, mezbahanelerde karkasın kontaminasyonu ile birlikte, kasap reyonlarında kuşbaşı etin kesilip hazırlanmasında, daha fazla elle temas ediliyor olmasına bağlı olabilir.

Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA), Avrupa, Amerika, Kuzey Afrika, Ortadoğu ülkeleri ve Orta Asya’da, antibiyotik dirençli patojenler içinde en yaygın patojen olarak bildirilmektedir (Laxminarayan ve ark., 2013). Gıda kaynaklı en önemli patojenlerden biri olan MRSA’lar, besin amacıyla yetiştirilen hayvanlardan gıdalara, gıdalardan insanlara veya insanlardan gıdalara bulaşması ile besin zincirine girebilmekte ve sonuçta insanlarda gıda zehirlenmelerine sebep olabilmektedir (Anon, 2009).

MRSA’ların, elde edilen izolatlar arasından tespit edilmesinde *mecA* geninin PCR ile araştırılması gold standart olarak kabul edilmektedir (Dominguez ve ark. 1997). Bu çalışmada incelenen 744 örnekten 46 (%6,2)’sının, MRSA ile kontamine olduğu tespit edildi. Bu örneklerden izole edilen 173 *S. aureus* izolatının 54 (%31,2)’ü *mecA* geni pozitif bulundu ve MRSA olarak değerlendirildi. Örnek bazında değerlendirildiğinde *S. aureus* izolasyonu yapılan 152 örneğin 46 (%30,2)’sının, MRSA’larla kontamine olduğu görüldü. MRSA’larla en yüksek oranda kontamine olan *S. aureus* pozitif örnek grubu %88,8 ile (8/9) peynir örnekleri oldu. Bunu takiben zemin sıvı örneklerinin %66,6 (2/3), duvar sıvı örneklerinin %50

(1/2), kıymaların % 38,4 (5/13), personel burun sıvıplarının % 30,7 (8/26), personel el yıkantılarının % 30 (6/20), sütlerin % 30 (12/40), kuşbaşı örneklerinin % 19 (4/21)'unun MRSA ile kontamine olduğu tespit edildi.

Pala ve ark. (2010), Bursa ilinde, gıda sanayii işçilerinin burun sıvıplarından elde ettiği 169 *S. aureus* izolatının 29 (% 17,2)'unu, Sepin-Özen ve ark. (2013), Antalya İlinde gıda işletmesi çalışanlarından izole ettikleri 526 *S. aureus* izolatının 28 (% 5,3)'ini MRSA olarak tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Sudağıdan ve ark. (2008), 48 biyomalzeme yüzeyinden *mecA* geni taşıyan 11 (% 22,9) MRSA izolatı tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Basanisi ve ark. (2017), sütlerden izole ettikleri 484 *S. aureus* izolatının 40 (% 8,3)'ının, Shanehbandi ve ark. (2014), 100 peynir örneğinden elde ettikleri 110 *S. aureus* izolatının 23 (% 21)'ünün, Wang ve ark. (2018), iki süt çiftliğinden temin ettikleri 195 süt örneğinden izole ettikleri 90 *S. aureus* izolatından yalnızca 1'inin, *mecA* geni taşıdığını tespit etmişlerdir. Kottler ve ark. (2010), insanlar ve pet hayvanlarından izole ettikleri 159 *S. aureus* izolatının 33 (% 20,8)'ünün, Zamani ve ark. (2007) hastane enfeksiyonlarından izole ettikleri 70 *S. aureus* izolatının 35 (% 50)'inin *mecA* geni taşıdığını tespit edildiğini bildirmişlerdir.

Hayvanların, insanlarda enfeksiyonlara neden olan MRSA'lar için rezervuar olabileceği, insanlar ve pet hayvanlarının taşıyıcılığının araştırıldığı çalışmalarla ortaya konulmuştur (Kottler ve ark. 2010), Bununla birlikte insanların da, hayvanlarda enfeksiyonlara neden olan MRSA'lar için rezervuar olabileceği, hayvan hastanesi personellerinin taşıdığı izolatların, nozokomiyal enfeksiyon tespit edilen hayvanlardan da izole edilmesiyle gösterilmiştir (Seguin ve ark. 1999). Bu çalışmamda da hem insan el-burun örneklerinde, hem işletme çevresel örneklerinde, hem de bu işletmelerin ürettikleri ürünlerde, MRSA'lar yüksek sayılabilecek oranda izole edildi ve klonal yakınlıkları PFGE ile gösterildi. Ayrıca OMÜ Tıp Fakültesinden temin edilen MRSA'larla, bu çalışmada izole edilen MRSA'lar arasındaki klonal yakınlık, yine PFGE ile araştırıldı ve yüksek oranda yakınlık tespit edildi. Bu sebeple gıda işletmelerinde ek kontrol tedbirlerinin uygulanmasına ihtiyaç olduğu kanaatine varıldı.

Stafilokokal enterotoksinler (SE), enterotoksijenik *S. aureus*'ların gıdalarda uygun şartları kullanarak 10^6 kob/g-ml düzeyine kadar çoğalmaları sonucu oluşturdukları, pepsin, tripsin, kimozin, papain gibi proteolitik enzimlere dirençli olan, 100-120°C'lere 30-90 dakikaya kadar dayanabilen, 26-29 kDa arasında düşük molekül ağırlıklara sahip tek zincirli globüler polipeptidlerden oluşan toksinlerdir (Tibana ve ark., 1987, Dinges ve ark., 2000, Loir ve ark., 2003, Bhatia ve Zahor, 2007). Tüketilen gıdalarda ortalama 20-100 ng toksinin

bulunmasıyla, abdominal kramplar, mide bulantısı, kusma, ishal ve nadiren (vakaların %0,03'ünde) ölüme vakalarına sebep olabilmektedir (Guillier ve ark. 2016).

Bu çalışmada incelenen 744 örnek içinde *S. aureus* ile kontamine 52 örneğin 37 (%71,15)'si enterotoksin geni taşıyan *S. aureus*'la kontamine bulundu. Elde edilen 173 izolatın 50 (% 28,9)'sinin bu genlerden bir veya daha fazlasını taşıdığı görüldü. *S. aureus* ile kontamine el yıkantılarının %19,2 (5/26)'si, burun sıvıplarının %35 (7/20)'i, zemin sıvıplarının %33,3 (1/3)'ü, duvar sıvıplarının %50 (1/2)'si, bıçakların %100 (1/1)'ü, kıymaların %7,7 (1/13)'si, köftelerin %12,5 (2/16)'i, kuşbaşıların %14,3 (3/21)'ü, çığ sütlerin %22,5 (9/40)'i ve peynirlerin %77,7 (7/9)'si enterotoksin geni taşıyan *S. aureus* ile kontamine bulundu. Aynı izolatta birden fazla *se* geni bulunma durumuna göre, en fazla *sea* ve *sec* genini (22 izolat, %43,1) birlikte taşıdıkları, *se* genleri tek olarak değerlendirildiğinde en fazla *sea* genini taşıyan izolatın (32 izolatta, %62,7) bulunduğu görüldü.

Ayrıca ELISA testi ile 744 örnekten, SE üretebilen *S. aureus* ile kontamine 48 (%6,45) örnek bulundu. İzole edilen 173 *S. aureus*'un 61 (%35,2)'inin SE üretebildiği tespit edildi. Aynı izolatta birden fazla SE üretimine bakıldığında, izolatların en fazla SEA ve SEC toksinlerini (20 izolat, %32,7) birlikte ürettikleri, tek olarak değerlendirildiğinde en fazla SEA toksinini (46 izolat, %75,4) ürettikleri sonucuna ulaşıldı. SE üretebilen izolatlarla, enterotoksin geni taşıyan izolatların paralellik gösterdiği görüldü.

Aydın ve ark. (2011b.), Marmara Bölgesi'nden et/süt ve bunların ürünlerinden oluşan 1070 gıda örneğinden izole edilen 147 *S. aureus*'un 92 (%62,6)'sinin SE genleri taşıdığını, %46,7'sinin SE üretebildiğini, SE üreten izolatlardan %72,1'inin SEA ve SED'yi birlikte ürettiklerini bildirmişlerdir. Karahan ve ark. (2009) da, süt ürünlerinden izole ettikleri 92 *S. aureus* izolatının 27 (%29,3)'sinin SE genlerinden en az birini taşıdığını tespit etmiştir. Özdemir ve Keyvan (2016), 225 et ürününden 114 *S. aureus* izole etmişler, bunların 80 (%70,1)'inin, inceledikleri dokuz toksin geninin en az birini taşıdığını belirlemişlerdir.

Boynukara ve ark. (2008), Van'da 480 subklinik mastitisli sütte izole ettikleri 106 *S. aureus*'dan 27 (%25,5)'inin SE ürettiğini, bunlardan 25 (%23,6)'inin SEA ürettiğini tespit etmişlerdir. Günşen ve ark (2003), 230 et ve süt ürününü SE yönünden ELISA ile analiz etmişler ve 4 örneği SEA pozitif bulmuşlardır.

Jorgensen ve ark. (2005), ise süt tanklarından izole ettikleri 370 *S. aures* izolatının %22,1'inin SE üretebildiğini, %52,5'inin de *se* genlerinden en az birini taşıdığını, *se* geni taşıyan izolatların, en fazla *sec* (%38,7) geni taşıdıkları ve benzer olarak % 37,4'ünün SEC ürettiğini tespit edildiğini, Costa ve ark. (2012), 30 peynir örneğinden izole ettikleri 111 *Staphylococcus* spp. izolatından 34 (% 30,6)'ünün beş *se* geninden (*a*, *b*, *c*, *d*, *e*), en az birini

taşıdığını yayınlamışlardır. Korpysa-Dzirba ve Osek (2011) ise, Polonya’da 237 çiğ süttten izole ettikleri 77 *S. aureus* izolatının 3’ünü *sec*, 2’sini *sea* olmak üzere 5 (%6,49)’ini SE genleri yönünden pozitif bulmuşlardır. Shanehbandi ve ark. (2014) ise, geleneksel peynirlerden izole ettikleri 23 MRSA’nın 14 (%60)’ünü en az bir SE geni yönünden pozitif bulmuşlar, bunların içinde en fazla *sea* (%34,8) ve *seb* (%13) bulunduğunu yayınlamışlardır. Wang ve ark. (2018) da, benzer şekilde, sütlerden izole ettikleri 90 *S. aureus* izolatının 77 (%85,5)’sinden en az bir *se* geni tespit etmişler, *se* geni taşıyan izolatlardan %65,6’sının *sec*, %60,4’ünün *sea* geni taşıdığını bulmuşlardır.

Ho ve ark. (2014), 434 gıda ile temas eden personellerden izole ettikleri 99 izolatın 40 (%40,4)’ının *se* geni taşıdığını, bunlardan %20’sinin *sea*, % 11’inin *seb* olduğunu tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Rall ve ark. (2008) ise, 57 izolatın 39 (%68,4)’unun, inceledikleri oniki *se* genlerinin en az birini taşıdığını, en yaygın *sea* (%41) geni, ardından *sec* (%20,5) ve *sed* (%12,8) genlerinin bulunduğunu bildirmişlerdir.

Görüldüğü gibi bu çalışmada elde edilen sonuçlara benzer olarak, ülkemizde ve diğer ülkelerde yapılan çalışmalarda da, et/süt ürünleri ve personel örneklerinde enterotoksijenik suşlara yaygın olarak rastlanıldığı görülmektedir. Gıda ve gıda hammaddelerinde, pişirme öncesi toksin oluşumu engellenememişse, toksin oluşumundan sonra ısı işlem veya pastörizasyon ile toksin inaktive edilememektedir. Bu gıdaların tüketimi ve toksinin bağırsaklardan kana geçmesini takiben, abdominal kramplar, mide bulantıları, kusma ve ishal semptomları ortaya çıkmaktadır (Loir ve ark., 2003). Bölgemizde de bu intoksikasyonların önüne geçilebilmesi için gıdaların üretildiği hayvanların sağlık şartlarının sağlanmasının yanı sıra, personel ve işletme hijyenine de tam anlamıyla riayet edilmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

PFGE yöntemi, analiz edilen etkenlerin genetiksel ilişkilerin belirlenmesine imkan sağlamakla birlikte, tekrarlanabilirlik özelliğinin de yüksek olması bakımından, moleküler biyolojik yöntemler içerisinde öne çıkmaktadır. Geleneksel elektroforezden farklı olarak, büyük DNA moleküllerinin eşsiz bir biçimde ayrıştırılabilmesine olanak sağlamış ve altın standart olarak kabul görmüştür (Gunderson ve Chu, 1991).

PFGE, 50 kb’lık kromozomdan, megabaz ile ölçülebilen maya kromozomlarına kadar birçok canlı türüne ait kromozomal DNA’yı ayrıştırabilir. Bakteri, virüs ve memeli DNA’larında, eşsiz bir ayrıştırma kabiliyeti göstermektedir (Maule, 1998).

Bu yöntemde, öncelikle hedef genomik DNA’nın, bütün ve taze olarak elde edilmesi amacıyla kültür pasajlanır. Ardından, bu taze kültür jele gömülür ve genomik DNA’yı barındıran yapılar DNA’ya zarar vermeden elemine edilir. Uygun bir restriksiyon

endonükleaz enzimiyle genomik DNA kesilir. DNA'yı taşıyan jel, elektroforezin uygulanacağı ana jele yüklenir. Farklı açılardan, farklı sürelerde ve farklı büyüklükte elektrik akımı verilerek, kesilen büyük DNA parçacıklarının ayrışması sağlanır. Ayrıştırılan bantlar, uygun boyalarla görünür hale getirilip yorumlanır (McDougal ve ark. 2003).

Ülkemizde farklı kaynaklardan izole edilen MRSA'ların PFGE ile araştırıldığı çalışma sayısı sınırlıdır. Erdem (2011), Aydın'da farklı işletmelerden 145 subklinik mastitisli süt örneği ile 56 sığır ve 34 insan burun sıvabı örneğinden elde ettiği toplam 12 MRSA izolatını PFGE ve multilocus sequence typing (MLST) yöntemleriyle incelemiştir. Süt örnekleri, sığır burun sıvabı örnekleri ve veteriner hekim sıvabı örneklerinden izole ettikleri MRSA'ların aynı PFGE grubu içinde olduğunu tespit etmiştir. Buradan hareketle, veteriner hekimden sığıra bulaşan etkenin mastitise neden olduğu sonucuna varmıştır. Ayrıca, hastane kökenli SCC*mec* tiplerini sığırlarda da tespit ettiklerini bildirmiştir. Araştırmacı izolatlar arasındaki benzerliğin %91,6 oranında olduğuna ve sığır izolatlarının insan kaynaklı olabileceğine işaret etmiştir.

Ünal ve İstanbulluoğlu (2009), Kırıkkale ve çevresinden topladıkları 46 mastitisli inek sütü, 35 inek meme başı derisi, 3 inek burun, 3 bakıcı el ve 9 bakıcı burun sıvabından izole ettikleri 96 *S. aureus* izolatını, PFGE ile incelemişler, sığır izolatlarını MSSA, 12 bakıcı izolatının 3'ünün MRSA olduğu belirlemişlerdir. Meme başı derisi ile süt izolatlarını, bakıcıların el/burun izolatları ile süt ve meme başı izolatlarını benzer pulsotipte bularak yakın ilişkiye dikkat çekmişlerdir.

Moodley ve ark. (2006), yaptıkları tiplendirme çalışmasında, İrlanda'da köpek, kedi, at, çevresel yüzey ve personellerden izole edilen toplam 67 MRSA izolatını birbirleri arasında, Malik ve ark. (2006) da Avusturalya'da sağlıklı/hasta kedi ve köpeklerden izole ettikleri MRSA'ları, insanlardan izole edilen suşlarla, yüksek derecede benzer bulmuşlardır.

Zadoks ve ark. (2000), Hollanda'da sığır meme dokusundan elde edilen 38 MRSA izolatı ile 55 insan MRSA izolatını PFGE ile değerlendirmişler, sonuçta izolatların konakçıya özgün gruplandıklarını, insan ve sığır izolatlarında %100 benzer izolat tespit edilmediğini, 5 insan ve 16 sığır izolatının %90-95 benzerlik gösterdiğini, bu yakınlığın artmakta olup ileride, sığır MRSA'larının, insanlarda MRSA'lardan kaynaklanan enfeksiyonlarda ciddi artışa neden olacağını bildirmişlerdir.

Andre ve ark. (2008), Brezilya'da 48 peynir ve 92 gıda üretiminde çalışan personellerden alınan örneklerden 73 *S. aureus* izole etmişler ve PFGE ile yaptıkları analizde burun ve el izolatlarının peynir izolatlarına yakın olmadığını bildirmişlerdir.

Suleiman ve ark. (2012), Nijerya'da yaptıkları çalışmada, 339 çiğ süt örneğinden 20 *S. aureus* izolatı elde etmişler ve PFGE analizi sonucu 18 izolatın %100 benzer olduğunu, bu sonucun, bölgede mastitise neden olan dominant bir klona işaret ettiğini göstermişlerdir.

Bu çalışmada, çalışmanın amacına uygun şekilde çevre, gıda ve insan kaynaklı örneklerden izole edilen 54 MRSA izolatına, OMÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilen 53 izolat da ilave edilerek bir izolat havuzu oluşturuldu. Bu havuz içerisindeki izolat gruplarının, kendi içlerinde ve gruplar arasındaki genetiksel ilişkileri PFGE yöntemi ile analiz edilip, genetiksel ve klonal yakınlık oranları dendrogram üzerinde gösterildi.

Dendrogram incelenmesi ile izolatların 67 ayrı PFGE tipi oluşturdukları, kümeleşme oranının %48,9 olduğu, %85 ve üzeri benzerlik gösteren 22 PFGE grubunun olduğu, bu grupların 63 izolatı barındırdığı tespit edildi.

Bu kümelerden birinin, aynı zamanda PFGE Grup 1'i oluşturduğu ve gıda çalışanları MRSA izolatları ile hastane MRSA izolatları arasındaki ilişkiyi gösterdiği görüldü. Bu grupta yer alan iki izolattan birinin, et/et ürünleri işletme A'nın personel burun sıvabından izole edilen 20 no'lu izolat, diğerinin dermatoloji servisi yara akıntısı kültüründen izole edilen H1 no'lu izolat olduğu ve %90,9 benzerlik gösterdikleri görüldü. Bu ilişkiyi güçlendiren PFGE Grup 6'da, et/et ürünleri işletme B'nin personel burun sıvabından izole ettiğimiz 87 no'lu izolat ile dahiliye bölümü aspirat örneğinden izole edilen H13 no'lu izolatlar olduğu ve %100 benzer olup aynı kümeye yerleştikleri tespit edildi. Bu sonuç bize toplum kaynaklı bir MRSA klonunun, yumuşak doku enfeksiyonunda aktif rol aldığı kanaatini verdi.

PFGE Grup 9'u oluşturan, süt/süt ürünleri işletme C zemininden izole edilen 117 no'lu izolat ile süt/süt ürünleri işletme D'den alınan çiğ süttten izole edilen 561 no'lu izolat, %100 benzer bulundu ve aynı kümeye yerleşti. Bu iki farklı işletme, aynı bölgedeki süt üreticilerinden süt toplamaktadır. Elde edilen bu benzerlik, mastitis kaynaklı bir MRSA klonu ile, süt toplama araçları, süt toplama tankları ve tesislerin zemininin de kontamine olduğunu göstermektedir.

PFGE Grup 12'de yer alan dört izolat ile PFGE grup 13'ün üç izolatı, çapraz kontaminasyona işaret etmektedir. Bu izolatlardan kendi aralarında %100 benzer olan 621 ve 644 no'lu izolatlar, işletme D'nin iki farklı personelinden alınan el yıkantısı izolatları olup, personeller arası bulaş sonucu aynı klonun iki farklı personelin elinde kolonize olduğunu gösterdi. Bununla birlikte, %100 benzer bulunup, kendi içinde aynı kümeye yerleşen diğer iki izolat ise, et/et ürünleri işletme A'nın ürettiği kuşbaşı et örneklerinden izole edilen 210 ve 214 no'lu izolatlardı. Bu ikişerli kümenin aynı grupta yer aldığı ve benzerlik katsayısının %85,4

olduğu görüldü. PFGE grup 13'te yer alan 144 ve 168 no'lu izolatlar ise (benzerlik %92,3), işletme C'nin bir personelinin el yıkantısı ve burun sıvabından, 217 no'lu izolat ise işletme A'dan alınan kuşbaşı etten izole edildi. Bu üç izolat %88 benzerlik gösterdi. Gıdalardan ve personellerden izole edilen bu izolatların yüksek benzerlik katsayısı ile epidemiyolojik olarak aynı gruplarda yer alması, perakende satış reyonundaki kuşbaşı etlerin, personeller tarafından burun ve ellerinde kolonize olan bir MRSA klonunun kontaminasyonuna maruz bırakıldığı kanaatini verdi.

PFGE Grup 14'de yer alan 523 ve 524 no'lu izolatlar, süt/süt ürünleri işletme C'den örneklenen çiğ sütlerden izole edildi ve %100 benzerlik katsayısı ile aynı kümeye yerleşti. Hematoloji servisi kan kültüründen izole edilen H36 no'lu MRSA izolatı ise bu gruba %83,3 benzerlik gösterdi. Çiğ sütlerden izole edilen MRSA'lar ile hastalardan izole edilen MRSA'lar arasındaki bu yüksek benzerlik oranı, hayvan enfeksiyonlarına neden olan suşlar ile insanlarda enfeksiyona neden olan suşların klonal olarak birbirlerine büyük oranda yaklaştıklarına işaret etmektedir.

PFGE Grup 22'de, birbirleriyle %100 benzerlik gösteren 629 ve 673 no'lu izolatlar yer aldı. Bu izolatlardan biri süt/süt ürünleri işletme D'nin personelinden alınan el yıkantısından, diğeri ise işletme C'nin ürettiği beyaz peynirlerden izole edildi. İzolasyonun aynı bölgeden süt toplayan iki farklı süt işletmesinden yapılmış olması, bölgede sirküle olan mastitis etkeni bir klonun, hem süt toplama tanklarını, hem personellerin ellerini, hem de bu sütlerden üretilen ürünleri kontamine ettiğini, ayrıca tesislerde üretim aşamasında uygulanan ısı işleminin yetersiz olduğunu gösterdi.

En büyük grup olan PFGE Grup 3'ün, birbirleriyle %100 benzerlik gösteren 14 MRSA izolatı barındırdığı ve bu izolatların tek kümeye yerleştikleri tespit edildi. Bu gruptaki izolatlar, süt/süt ürünleri işletmesi D'nin ürettiği peynirlerden, yaklaşık altı aylık periyotta, farklı zamanlarda yapılan beş örneklemeden izole edildi. İşletmede üretilen pastörize peynir serilerinin tamamında uzun bir zaman periyodunda, aynı klona ait MRSA'ların izole edilmesiyle, etkenin tanklar, tekneler, bıçaklar gibi alet-ekipmanda kolonize olduğu ve hatta biyofilm oluşturabilen bir klon olabileceği sonucuna varıldı.

PFGE Grup 8'de, birbirleriyle %100 benzer olan 368, 369 no'lu izolatlar, işletme B'den alınan iki kıymadan, bu izolatlarla %78,3 benzerlik gösteren 426 no'lu izolat ise yine işletme B'nin ürettiği kuşbaşı etten izole edildi. Bu üç izolat işletme A'nın personellerinden birinin el yıkantısından izole edilen 15 no'lu izolat ile %57,3 benzerlik gösterdi. Bu sonuç işletme içi hijyen eksikliğinin yanı sıra, personelden gıdaya bulaşma olduğuna da işaret etmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada; çevre, gıda ve insan kaynaklı MRSA'ların farklı kaynaklardan izolasyonu, identifikasyonu, metisilin dirençlerinin, stafilokokkal enterotoksin üretme yeteneklerinin belirlenmesi, çalışmada elde edilen izolatlarla hastane ve toplum kökenli MRSA'lar da ilave edilerek, farklı kaynaklardan elde edilen MRSA suşlarının, aralarındaki genetiksel ve klonal ilişkilerin ortaya konulması amaçlandı.

Samsun ve çevresindeki dört gıda işletmesinden Mart 2016 – Eylül 2017 tarihleri arasında, 500 gıda (çiğ süt, peynir, kuşbaşı et, kıyma, köfte), 184 personel el yıkantısı/burun sıvabı, 60 işletme çevresel (tezgah, tekne, bıçak, zemin, duvar) sıvabları *S. aureus* yönünden incelendi. Gıda örneklerinin 99 (%19,8)'u, personel örneklerinin 46 (%25)'sı, çevre örneklerinin 7 (%11,6)'si *S. aureus* ile kontamine bulundu ve toplam 173 *S. aureus* izole edildi. İzolatların 54 (%31,2)'ünün *mecA* geni taşıdığı, 50 (%28,9)'sinin *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* genlerinden bir veya daha fazlasını içerdiği, 61 (%35,2)'inin toksinlerden en az birini üretebildiği belirlendi. Çalışmaya OMÜ Tıp Fakültesinin, hastane/toplum kaynaklı 53 MRSA izolatı da eklenerek, klonal ve genetiksel ilişkileri PFGE ile araştırıldı. Bir gıda personeli burun izolatı ile bir hastane aspirat izolatı %100, başka bir gıda personeli burun izolatı ile bir hastane yara akıntısı izolatı %90,9, bir el yıkantısı izolatı ile bir peynir izolatı ve bir zemin izolatı ile bir çiğ süt izolatı %100 klonal benzerlik gösterdi. İki çiğ süt izolatı ile bir hastane kan kültürü izolatı %83,3 oranında benzer bulundu.

Sonuç olarak gıda üretiminde çalışan personellerin ve bu personeller eliyle üretilen hayvansal gıdaların yüksek oranda *S. aureus* taşıdığı, bu suşların yüksek oranda metisilin direnç geni taşıdıkları ve enterotoksijenik özellikte oldukları görüldü. İşletme çevresel ortamları, gıdalar ve insanlardan ve izole edilen MRSA suşlarının klonal olarak yüksek düzeyde yakınlık gösterdiği tespit edildi. Bu suşların kişisel hijyen/işletme hijyeni eksikliği ve uygun olmayan proses sebebiyle gıdalara bulaştığı, gıdalardan tekrar insanlara bulaştığı, toplum kaynaklı MRSA'ların, insan MRSA enfeksiyonlarıyla yakın ilişkili oldukları görüldü.

Ciddi halk sağlığı riski oluşturan bu durumun önlenmesi için, kişisel ve çevresel hijyen eğitimlerinin sık sık tekrarlanması gerekmektedir. Gıda işletmelerinin, portör muayeneleri, hijyen uygulamaları, HACCP ve benzeri kontrol programlarına tam riayet etmeleri, üretim proseslerini patojenleri önleyici tedbirlerle donatmaları, gıdaların taşınması, depolanması, perakende satışında soğuk zincire mutlaka riayet edilmesi büyük önem arz etmektedir. Tek sağlık konsepti bağlamında, veteriner hekimler, beşeri hekimler ve diğer toplum sağlığı disiplinlerinin işbirliği içinde ortak çalışmalar yapmaları hayati öneme sahiptir. Gıda patojenlerinin potansiyel riskleri ile ilgili, daha ileri düzeyde çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

- Adams MR, Moss MO. *Staphylococcus aureus*. Adams MR, Moss MO Editors. Food Microbiology. 3rd edition, Cambridge, UK, Royal Society Chem 2008; 252-256.
- Afrough P, Pourmand MR, Sarajian AA, Saki M, Saremy S. Molecular investigation of *Staphylococcus aureus*, *coa* and *spa* genes in Ahvaz Hospitals, staff nose compared with patients clinical samples. Jundishapur J Microbiol 2013; 6(4): 5377-5382.
- Agerso Y, Hasman H, Cavaco LM, Pedersen K, Aarestrup FM. Study of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in danish pigs at slaughter and in imported retail meat reveals a novel MRSA type in slaughter pigs. Vet Microbiol 2012; 157 (1-2): 246–250.
- Akkaya L, Sancak YC. Growth abilities and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* strains in herby cheese. Bull Vet Inst Pulawy 2007; 51: 401-406.
- Alişarlı M, Sancak YC, Akkaya L, Elibol C. Bazı sütlü gıdalarda *Staphylococcus aureus*'un izolasyonu, termonükleaz aktivitesi ve enterotoksijenik özelliklerinin araştırılması. Turk J Vet Anim Sci 2003; 27(6): 1457-62.
- Alişarlı M, Solmaz H. Sağmal ineklerin meme başı derileri ve çiğ sütlerden elde edilen *Staphylococcus aureus*'ların patojenite özellikleri ile bazı antibiyotiklere duyarlılıkları. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 2003; 35(4): 333-339.
- Andre MC, Campos MRH, Borges LJ, Kipnis A, Pimenta FC, Serafini AB. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following *SmaI* digestion. Food Cont 2008; 19: 200–207.
- Anon 2009. Scientific Opinion of The panel on Biological Hazards. Assessment of the public health significance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods. The EFSA Journal 2009; 993: 1-73.
- Anon 2011. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111229M3-6.htm>. 2017.
- Anon 2015. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. World Health Organisation, Foodborne diseases burden epidemiology reference group 2007-2015; Full report 2015; 5-6.
- Anon 2016. AOAC International. *Staphylococcus* sec. 17.5. In: Official Methods of Analysis, 16th ed., New York City. AOAC International, Arlington, VA. 1995; 94.
- Anon 2017. Foodborne Illness and Germs. <https://www.cdc.gov/foodsafety/foodborne-germs.html>, page last update 20.12.2017.

- Anon 2017a. Oxacillin resistant *Staphylococcus aureus* on PulseNet (OPN): Laboratory protocol for molecular typing of *S. aureus* by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). <https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/pfge.html>. 2017.
- Anon 2018. Virulence factors of *Staphylococcus aureus*. <https://i.pinimg.com/736x/6c/46/ea/6c46ea1dacc9977daa5afbed892e49d9--factors.jpg>, 2018.
- Appelbaum PC. Reduced glycopeptide susceptibility in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Int J Antimicrob Agents* 2007; 30 (5): 398-408.
- Arciola CR, Collamati S, Donati E, Montanaro L. A rapid PCR method for the detection of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus* in periprostheses infections. *Diagn Mol Pathol* 2001;10(2): 130-137.
- Arslan Ö. Bazı gıdalardan izole edilen *Staphylococcus aureus*'ların enterotoksijenik özellikleri ve farklı antibiyotiklere duyarlılıklarının saptanması. Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa, Yüksek Lisans Tezi, 2012; 42-51.
- Assefa T, Tasew H, Wondafrash B, Beker J. Assessment of bacterial hand contamination and associated factors among food handlers working in the student cafeterias of Jimma University Main Campus. *J Community Med Health Educ* 2015; 5: 2.
- Ayçiçek H, Aydoğan H, Küçükaraaslan A, Baysallar M, Başustaoglu AC. Assessment of the bacterial contamination on hands of hospital food handlers. *Food Control* 2004; 15(4): 253-9.
- Aydın A, Aksu H, Arun ÖÖ. Hygienic properties of food handlers and equipment in food production and sales units. *Medycyna Wet* 2007; 63 (9): 1067-1070.
- Aydın A, Muratoğlu K, Sudağidan M, Bostan, K, Okuklu B, Harsa S. Prevalence and antibiotic resistance of foodborne *Staphylococcus aureus* isolates in Turkey. *Foodborne Pathog Dis* 2011a; 8: 63-69.
- Aydın A, Sudağidan M, Muratoğlu K. Prevalence of staphylococcal enterotoxins, toxin genes and genetic-relatedness of foodborne *Staphylococcus aureus* strains isolated in the Marmara Region of Turkey. *Int J Food Microbiol* 2011b; 148: 99-106.
- Baird-Parker AC. A Classification of micrococci and staphylococci based on physiological and biochemical Tests. *J Gen Microbiol* 1963; 30: 409-427.
- Baird-Parker AC. The *Staphylococci*: An introduction. *J Appl Bacteriol Symposium Supplement* 1990; 1-8.
- Bal H. Eczanelerde çalışan eczacı ve eczane personelinde *Staphylococcus aureus* burun taşıyıcılığının saptanması, suşların metisilin direnci ve *mecA* geni yönünden araştırılması. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Yüksek Lisans Tezi, 2015; 49-56.

- Basanisi MG, Bella GL, Nobili, Franconieri I, Salandra GL. Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk and dairy products in South Italy. *Food Microbiol* 2017; 62: 141-146.
- Basım E, Basım H. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Technique and its use in molecular biology. *Turk J Biol* 2001; 25: 405-418.
- Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase negative *Staphylococci*. *Clin Microbiol Rev* 2014; 27(4): 870-926.
- Becker K. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* enterotoxins. Fetsch A. Editör, 1st edition, London, Elseiver Inc., 2018; 31-58.
- Bennet RW, Lancette GA. *Staphylococcus aureus*. In; Bennet RW, Lancette GA, editors. *Bacteriological Analytical Manual*. 8th edition, 1998; Revision A, Chapter 12, <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071429.htm> 2017.
- Bergdoll MS. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle MP, editor. *Foodborne Bacterial Pathogens*. 1st edition, New York City, Marcel Dekker Inc. 1989; 463-523.
- Berube B, Wardenburg JB. *Staphylococcus aureus* α -Toxin: Nearly a century of intrigue. *Toxins* 2013; 5: 1140-1166.
- Bhargava K, Wang X, Donabedian S, Zervos M, De Rocha I, Zhang Y. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in retail meat, Detroit, MI, USA. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 1135–1137.
- Bhatia A, Zahoor S. *Staphylococcus aureus* enterotoxins: A review. *J Clin Diag Res* 2007; 4(3): 188-197.
- Bhunja AK. Introduction to Foodborne Pathogens. *Foodborne Microbial Pathogens*. 2nd edition, New York City, Springer Science Business Media. 2018; 1-8.
- Bingöl EB, Çetin Ö, Çolak H, Hampikyan H. Presence of enterotoxin and verotoxin in Turkish cheeses sold in İstanbul. *Turk J Vet Anim Sci* 2012; 36(4): 424-432.
- Bohach GA, Stauffacher CV, Ohlendorf DH, Chi YI, Vath GM, Schlievert PM. The Staphylococcal and Streptococcal pyrogenic toxins family. In: Singh BR. editor. *Natural Toxins 2*. 1st ed., Massachusetts, Plenum Press, 1996; 140-141.
- Boncompain CA, Suarez CA, Morbidoni HR. *Staphylococcus aureus* nasal carriage in health care workers: First report from a major public hospital in Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2017; 49(2):125-131.
- Boynukara B, Gülhan T, Alişarlı M, Gürtürk K, Solmaz H. Classical enterotoxigenic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Van, Turkey. *Int J Food Microbiol* 2008; 125: 209-211.

- Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* Gene. J Clin Microbiol 1992; 30(7):1654-1660.
- Bremer PJ, Fletcher GC, Osborne C, Editors. *Staphylococcus aureus*. Christchurch, New Zealand, New Zealand Institute for Crop and Food Research Limited 2004; 29(8), 640-653.
- Brown DF, Edwards DI, Hawkey PM, Morrison D, Ridgway GL, Towner KJ, Wren MW. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). J Antimicrob Chemother 2005; 56(6): 1000-1018.
- Bukowski M, Wladyka B, Dubin G. Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. Toxins 2010; 2: 1148-1165.
- Buzby JC, Roberts T. Economic costs and trade impacts of microbial foodborne illness. World Health Stat Q 1997; 50(1-2): 57-66.
- Carmo LS, Dias RS, Linardi VR. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. Food Microbiol 2002; 19 (1): 9-14.
- Collen D. Staphylokinase: a potent, uniquely fibrin-selective thrombolytic agent. J Nat Med 1998; 4: 279-284.
- Costa JCB, Freitas EI, Lemos AA, Rosas CO, Medeiros VM, Warnkem MB, Miyazaki NHT, Marin VA. Isolation of *Staphylococcus* from minas frescal type cheese and detection of enterotoxin genes. Rev Inst Adolfo Lutz 2012; 71(2): 250-258.
- Cunningham L, Catlin BW, De Garile MP. A deoxyribonuclease of *Micrococcus pyogenes*. J Am Chem Soc 1956; 78: 4642-4644.
- Cuny C, Friedrich A, Kozytska S, Layer F, Nubel U, Ohlsen K, Strommenger B, Walther B, Wieler L, Witte W. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in different animal species. Int J Med Microbiol 2010; 300(2-3): 109-117.
- Çakıcı N, Demirel-Zorba NN, Akçalı A. Gıda endüstrisi çalışanları ve stafilocokal gıda zehirlenmeleri. Turk Hij Deney Biyol Derg 2015; 72(4): 337-350.
- Çelik C. Çeşitli starter kültürleri kullanılarak salamura beyaz peynirin (Edirne tipi) standardizasyonu üzerinde araştırmalar. TÜBİTAK 1982; VHAG Araştırma Grubu VHAG-488 nolu proje sonuç raporu.
- Çıtak S, Duman T. *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* from raw chicken samples in Turkey: prevalence and antimicrobial resistance. J Food Agric Environ 2011; 9(1): 156-158.
- De Boer E, Zwartkruis-Nahuis JTM, Wit B, Huijsdens XW, De Neeling AJ, Bosch T, Van Oostrem RAA, Vila A, Heuvelink AE. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. Int J Food Microbiol. 2009; 134: 52-56.

- De Jonge R, Verdier JE and Haveelaar. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* amongst Professional meat handlers in the Netherlands, March–July 2008. Euro Surveillace 2010; 15(46): pii=19712.
- de Wit JC, Kampelmacher EH. Some aspects of microbial contamination of hands of workers in food industries. Zentralbl Bakteriolog Mikrobiol Hyg B 1981;172 (4-5): 390-400.
- Dias NL, Silva DCB, Oliveira DCBS, Fonseca Jr AA, Sales ML, Silva N. Detection of genes of *Staphylococcus aureus*, enterotoxins and methicillin resistance in milk. Arq Bras Med Vet Zootec 2011; 63(6): 1547–1552.
- Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev 2000; 13(1):16-34.
- Dominguez MA, Linares J, Martin R. Molecular mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Microbiologia. 1997; 13(3): 301-308.
- Doyle M E, Hartmann F A, Lee Wong A C. Methicillin-resistant staphylococci: implications for our food supply? Anim Health Res Rev 2012; 13 (02): 157- 180.
- Drewry DT, Galbraith L, Wilkinson BJ, Wilkinson SG. Staphylococcal Slime: A cautionary tale. J Clin Microbiol 1990; 28(6): 1292-1296.
- Durmaz R. Dirençli bakteri suşları arasındaki klonal ilişkinin belirlenmesi. ANKEM Dergisi 2007; 21(ek-2): 178-183.
- DuMont LA, Nygaard TK, Watkins RL, Smith A, Kozhaya L, Kreiswirth BN, Shopsin B, Unutmaz D, Voyich JM, Torres VJ. Characterization of a new cytotoxin that contributes to *Staphylococcus aureus* pathogenesis. Mol Microbiol 2011; 79(3): 814–825.
- Ebrahimi A, Shams N, Shahrokh S, Mirshokraei P. Characteristics of staphylococci isolated from mastitic goat milk in Iranian dairy herds. Vet World 2010; 3(5): 205–208.
- Erdem Z. Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının moleküler tiplendirmesi. Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın, Yüksek Lisans Tezi, 2011; 86-87.
- Erdoğan H, Arslan H. Otel personelinin burun ve boğaz kültüründe *Staphylococcus aureus* taşıyıcılığının araştırılması ve risk faktörlerinin irdelenmesi. KLİMİK Derg 2011; 24(2): 90-3.
- Erol İ, İşeri Ö. Stafilokokal enterotoksinler. Vet Fak Derg 2004; 51: 239-245.
- Erol İ. *Staphylococcus aureus* Enfeksiyonları. Erol İ. Editor, Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi'nde, 5. Baskı, Ankara, Pozitif Matbaacılık. 2007; 135-144.

- Evenson ML, Hinds MW, Bernstein, RS, Bergdoll, MS. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *Int J Food Microbiol* 1988; 7: 311-316.
- Fairweather N, Kennedy S, Foster TJ, Kehoe M, Dougan G. Expression of a cloned *Staphylococcus aureus* a-hemolysin determinant in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 1983; 41(3): 1112-1117.
- Fessler AT, Kadlec K, Hassel M, Hauschild T, Eidam C, Ehricht R, Monecke S, Schwarz S. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from food and food products of poultry origin in Germany. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77(20): 7151-7157.
- Fidan F, Ağaoğlu S. Ağrı bölgesinde bulunan lokantaların hijyenik durumu üzerine araştırmalar. *Yüzüncüyıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2004; 15 (1-2): 107-114.
- Freed RC, Evenson ML, Reiser RF, Bergdoll MS. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. *Appl Environ Microbiol* 1982; 44(6): 1349-1355.
- Ganai AW, Kotwal SK, Wani N, Malik MA, Jeelanı R, Kour S, Zargar R. Detection of *mecA* gene of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by PCR assay from raw milk. *Indian J Anim Sci* 2016; 86 (5): 508-511.
- Genç F, Kaya O. Subklinik Mastitisli Sığırlardan *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* ve *Streptococcus dysgalactiae* etkenlerinin izolasyonu ve antibiyotiklere duyarlılıklarının belirlenmesi. *Animal Health Production and Hygiene* 2015; 4(2): 415-419.
- Gotza F, Verheij HM, Rosenstein R. Staphylococcal lipases: molecular characterisation, secretion, and processing. *Chem Phys Lipids* 1998; 93:15-25.
- Gökmen M, Gürbüz Ü, Torlak E, İnal M. Identification of *Staphylococcus* spp. Isolated in different production stages of white cheese and detection of enterotoxin. *Kocatepe Veteriner Dergisi* 2013; 6(2): 7-11.
- Guillier L, Bergis H, Guillier F, Noel V, Auvray F, Hennekinne JA. Dose-response modelling of staphylococcal enterotoxins using outbreak data. *Procedia Food Sci* 2016; 7: 129-132.
- Gunderson K, Chu G. Pulsed-field electrophoresis of megabase-sized DNA. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 3348-3354.
- Guzewich J. Evaluation of risks related to microbiological contamination of ready-to-eat food by food preparation workers and the effectiveness of interventions to minimize those risks. *FDA Center for Food Safety and Applied Nutrition* 1999; 1-28.
- Gülbandılar A. Kütahya yöresinde burun mukozasındaki *Staphylococcus aureus* taşıyıcılığının ve antibiyotik duyarlılığının araştırılması. *DPÜ Fen Bilimleri Dergisi* 2009; 18: 1-6.

- Gündoğan N, Ataol Ö. Et örneklerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* ve koagülaz negatif stafilokok'ların biyofilm üretimi ve DNaz aktivitelerinin belirlenmesi. Turk Hij Denev Biyol Derg 2012; 69(3): 135-142.
- Günşen U, Yaroğlu T, Yılmaz C. Çeşitli hayvansal gıda ürünlerinde stafilokokal enterotoksin varlığının belirlenmesi. Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi 2003; 4: 28-34.
- Hacıbektaşoğlu A, Eyigün CP, Özsoy MF. Gıda elleyicileri'nde burun ve boğaz portörlüğü. Mikrobiyol Bul 1993; 27: 62-70.
- Hammad AM, Watanabe W, Fujii T, Shimamoto T. Occurrence and characteristics of methicillin-resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* and methicillin resistant coagulase-negative staphylococci from Japanese retail ready-to-eat raw fish. Int J Food Microbiol 2012; 156(3): 286–289.
- Haran KP, Godden SM, Boxrud D, Jawahir S, Bender JB, Sreevatsan S. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, isolated from bulk tank milk from Minnesota dairy farms. J Clin Microbiol 2012; 50(3): 688–695.
- Hiroi M, Kawamori F, Harada T, Sano Y, Miwa N, Sugiyama K, Hara-kudo Y, Masuda T. Antibiotic resistance in bacterial pathogens from retail raw meats and food-producing animals in Japan. J Food Prot 2012; 75(10): 1774–1782.
- Ho J, O'Donoghue MM, Boost MV. Occupational exposure to raw meat: a newly-recognized risk factor for *Staphylococcus aureus* nasal colonization amongst food handlers. Int J Hyg Environ Health 2014; 217(2-3): 347-53.
- Hookey JV, Edwards V, Cookson BD, Richardson JF. PCR-RFLP analysis of the coagulase gene of *Staphylococcus aureus*: application to the differentiation of epidemic and sporadic methicillin-resistant strains. J Hosp Infect 1999; 42: 205–212.
- Hu C, Xiong N, Zhang Y, Rayner S, Chen S. Functional characterization of lipase in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. Biochem Biophys Res Commun 2012; 419: 617-620.
- Huber H, Koller S, Giezendanner N, Stephan R, Zweifel C. Prevalence and characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans in contact with farm animals, in livestock, and in food of animal origin, Switzerland, 2009. Euro Surveill 2010; 15(16) pii=19542.
- Huseby M, Shi K, Brown CK, Digre J, Mengistu F, Seo KS, Bohach GA, Schlievert M, Ohlendorf DH, Earhart CA. Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 2007; 189(23): 8719-8726.
- Hynes WY, Walton LS. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. FEMS Microbiol Lett 2000; 183: 201-207.
- Ibberson CB, Jones CL, Singh S, Wise MC, Hart ME, Zurawski DV, Horswill AR. *Staphylococcus aureus* Hyaluronidase Is a codY-regulated virulence factor. Infect Immun 2014; 82(10): 4253–4264.

- ISO 1999. ISO-International Organisation of Standardisation. ISO 6888-2. Microbiology of food and animal feeding stuffs- horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other Species)- Part 2: Technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium 6888-2, International Organization for Standardization 1999.
- Jaber NN. Isolation and biotyping of *Staphylococcus aureus* from white cheese in Basrah local markets. Basrah Journal of Veterinary Research 2011; 10: 55-66.
- Jahan M, Rahman M, Parvej S, Chowdhury SZH, Haque E, Md. Talukder AK, Ahmed S. Isolation and characterization of *Staphylococcus aureus* from raw cow milk in Bangladesh. J Adv Vet Anim Res 2015; 2(1): 49-55.
- Jarraud S, Cozon G, Vandenesch F, Bes M, Etienne J, Lina G. Involvement of enterotoxins G and I in staphylococcal toxic shock syndrome and staphylococcal scarlet fever. J Clin Microbiol 1999; 37(8): 2446-2449.
- Jay JM, Loessnerr MJ, Golden DA. Staphylococcal Gastroenteritis. In: Modern Food Microbiology, Seventh Edition. California: Springer. 2005; 545-566.
- Jin T, Bokarewa M, Foster T, Mitchell J, Higgins J, Tarkowski A. *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. J Immunol 2004; 172: 1169-1176.
- Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton FE, Pollard DR, Rozee KR. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1991; 29(3): 426-430.
- Jorda GB, Marucci RS, Guida AM, Pires PS, Manfredi EA. Carriage and characterization of *Staphylococcus aureus* in food handlers. Rev Argent Microbiol 2012; 44(2): 101-104.
- Jorgensen HJ, Mork T, Hogasen HR, Rorvik LM. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. J Appl Microbiol 2005; 99: 158-166.
- Jones C. Revised structures for the capsular polysaccharides from *Staphylococcus aureus* Types 5 and 8, components of novel glycoconjugate vaccines. Carbohydrate Res 2005; 340: 1097-1106.
- Kadariya J, Smith TC, Thapaliya D. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: An ongoing challenge in public health. BioMed Research Internat 2014; Article ID 827965: 1-9.
- Karahan M, Açık MN, Investigation of toxin genes by polymerase chain reaction in *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Turkey. Foodborne Pathog Dis 2009; 6(8): 1029-1035.
- Karlson A, Arvidson S. Variation in extracellular protease production among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* due to different levels of expression of the protease repressor *sarA*. Infect Immun 2002; 70(8): 4239-4246.

- Kato Y, Matsunaga S, Misuna Y, Ushioda H, Yamamoto T, Kaneuchi C. Isolation and characterization of *Staphylococcus aureus* in rats trapped at restaurants in buildings in downtown Tokyo. *J Vet Med Sci* 1995; 57: 499–502.
- Kaynar Z, Kaynar P, Koçak C. Ankara piyasasında tüketime sunulan beyaz peynirlerin hijyenik kalitelerinin belirlenmesi üzerine bir araştırma. *Turk Hij Deney Biyol Derg* 2005; 62 (1,2,3): 1 – 10.
- Keyvan E. Sığır karkaslarında *Staphylococcus aureus*'un varlığı, karakterizasyonu ve antimikrobiyal dirençliliğinin belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Doktora Tezi, 2014; 53-58.
- Khalifa SM, Abdel-Rhman H.SH, Abd El Galil KH, Habib E, Barwa R. Occurrence and characterization of *Staphylococcus aureus* in meat and meat products marketed in Mansoura, Egypt. *Egyptian J Med Microbiol* 2014; 23 (3): 47-56.
- Khatri S, Pant ND, Bhandari R, Shrestha KL, Shrestha CD, Adhikari N. Asia poudel nasal carriage rate of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* among health care workers at a tertiary care hospital in Kathmandu, Nepal. *J Nepal Health Res Counc* 2017; 15(35): 26-30.
- Kiedrowski MR, Kavanaugh JS, Malone CL, Mootz JM, Voyich JM, Smeltzer MS, Bayles KW, Horswill AR. Nuclease modulates biofilm formation in community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 2011; 6(11): e26714. doi:10.1371/journal.pone.0026714.
- Kloos WE. Systematics and the natural history of *Staphylococci*. *J Applied Bacteriol Symposium Supplement* 1990; 69: 25-37.
- Kobayashi SD, De Leo FR. *Staphylococcus aureus* Protein a promotes immune suppression. *MBio* 2013; 4(45): doi: 10.1128/mBio.00764-13.
- Kondoh K, Furuya D, Yagihashi A, Uehata N, Nakamura M, Koyabashi D, Tsuji N, Watanabe N. Comparison of arbitrarily primed-polymerase chain reaction and pulse-field gel electrophoresis for characterizing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lett Appl Microbiol* 2002; 35: 62-67.
- Koneman E W, Winn WC, Allen S.D, Janda WM, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL, Editors. *Staphylococci and related Gram-positive cocci*. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th Ed., Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins Inc. 2006; 624-662.
- Korpysa-Dzirba W, Osek J. Identification of genes encoding classical staphylococcal enterotoxins in *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk. *Bull Vet Inst Pulawy* 2011; 55: 55-58.
- Kottler S, Middleton JR, Perry J, Weese JS, Cohn LA. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage in three populations. *J Vet Intern Med* 2010; 24: 132–139.

- Kök F, Özbey G, Muz A. Aydın ilinde satışa sunulan fermente sucukların mikrobiyolojik kalitelerinin incelenmesi. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2007; 21(6): 249-252.
- Kuipers A, Stapels DAC, Weerwind TL, Ko YP, Ruyken M, Lee JC, Van Kessel KPM, Rooijackers SHM. The *Staphylococcus aureus* polysaccharide capsule and Efb-dependent fibrinogen shield act in concert to protect against phagocytosis. *Microbiology* 2016; 162: 1185-1194.
- Kuyucuoğlu Y, Uçar M. Afyon bölgesi süt ineklerinde subklinik ve klinik mastitislerin görülme oranları ve etkili antibiyotiklerin tespiti. *Vet Hek Mikrobiyol Derg*, 2001; 1: 19-24.
- Küçükçetin A, Milci S. *Staphylococcus aureus* ile kontamine olan peynirlerden kaynaklanan gıda zehirlenmeleri. *Gıda* 2008; 33(3): 129-135.
- Ladhani S. Understandin the mechanisim of action of the exfoliative toxin of *Staphylococcus aureus*. *Immun Med Microbiol* 2003; 39: 181-189.
- Lagace-Wiens PRS, Alfa JM, Manickam K, Karlowsky JA, Thermostable DNase is superior to tube coagulase for direct detection of *Staphylococcus aureus* in positive blood cultures. *J Clin Microbiol* 2007; 45 (10): 3478-3479.
- Laurent TC, Fraser JR. Hyaluronan. *FASEB J* 1992; 6(7): 2397-2404.
- Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi A K M, Wertheim H F M, Sumpradit N, Vlieghe E, Hara G L, Gould I M, Goossens H, Greko C, So A D, Bigdeli M, Tomson G, Woodhouse W, Ombaka E, Peralta A Q, Qamar F N, Mir F, Kariuki S, Bhutta Z A, Coates A, Bergstrom R, Wright G D, Brown E D, Cars O. Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infect Dis* 2013; 13: 1057-1098.
- Lee JH. Methicillin (Oxacillin)-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69(11): 6489-6494.
- Loeto D, Matsheka MI, Gashe BA. Enterotoxigenic and antibiotic resistance determination of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food handlers in Gaborone, Botswana. *J Food Prot* 2007; 70(12): 2764-2768.
- Loir LY, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res* 2003; 2(1): 63-76.
- Louie L, Majury A, Goodfellow J, Louie M, Simor AE. Evaluation of a latex agglutination test (MRSA-Screen) for detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 2001; 39(11): 4149-4151.
- Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 2003; 111 (9): 1265-1266.

- Lozano C, Lopez M, Gomez-Sanz E, Ruiz-Larrea F, Torres C, Zarazaga M. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in food samples of animal origin in Spain. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64: 1325–1326.
- Malik S, Peng H, Barton MD. Partial nucleotide sequencing of the *mecA* genes of *Staphylococcus aureus* isolates from cats and dogs. *J Clin Microbiol* 2006; 44 (2): 413-416.
- Matos JE, Harmon RJ, Langlois BE. Lecithinase reaction of *Staphylococcus aureus* strains of different origin on Baird-Parker medium. *Lett Appl Microbiol*. 1995; 21 (5): 334-335.
- Maule J. Pulsed-field gel electrophoresis. *Mol Biotechnol* 1998; 9: 107-108.
- McAdow M, Missiakas DM, Schneewind O. *Staphylococcus aureus* secretes coagulase and von willebrand factor binding protein to modify the coagulation cascade and establish host infections. *J Innate Immun* 2012; 4: 141-148.
- McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: Establishing a national database. *J Clin Microbiol* 2003; 41(11): 5113–5120.
- Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 1999; 5 (5): 607-625.
- Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1 and methicillin resistance. *J Clin Microbiol* 2000; 38 (3): 1032-1035.
- Mernelius S, Löfgren S, Lindgren PE, Matussek A. The role of broth enrichment in *Staphylococcus aureus* cultivation and transmission from the throat to newborn infants: results from the Swedish hygiene intervention and transmission of *S. aureus* study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013; 32: 1593–1598.
- Moodley A, Stegger M, Bagcigil AF, Baptiste KE, Loeffler A, Lloyd DH, Williams NJ, Leonard N, Abbott Y, Skov R, Guardabassi L. *spa* typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from domestic animals and veterinary staff in the UK and Ireland. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58(6): 1118-1123.
- Mortimore S, Wallace C. An introduction to HACCP and its role in food safety control. In: Mortimore S, Wallace C, editors. *HACCP A Practical Approach*. 3rd Ed., London, Springer Science Business Media. 2013; 1-34.
- Muratoğlu K. Gıdalardan izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının toksijenik özellikleri ve antibiyotiklere duyarlılıkları üzerine bir araştırma. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Doktora Tezi, 2010; 59-65.
- Mustafa Ibrahim SH. *Staphylococcus aureus* can produce catalase enzyme when adding to human WBCs as a source of H₂O₂ productions in human plasma or serum in the laboratory. *J Med Microbiol* 2014; 4: 249-251. doi: 10.4236/ojmm.2014.44028.

- Mutluer B, Kaymaz Ş., Erol İ, Akgün S. Enterotoksijenik *Staphylococcus aureus* suşlarının beyaz peynirde üretim ve olgunlaşma sırasındaki üreme ve enterotoksin oluşturma yetenekleri. Vet Fak Derg 1993; 40: 413-426.
- Nashev D, Toshkova K, Bizeva L, Akineden Ö, Lammer C, Zschöck M. Distribution of enterotoxin genes among carriage and infection-associated isolates of *Staphylococcus aureus*, Let in Appl Microbiol 2007; 45: 681-685.
- Nassasra GIA. Sütlerde bulunan metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'un PCR yöntemi ile tespit edilmesi ve SCCmec tiplendirilmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Doktora Tezi, 2011; 81-82.
- Ogata K, Narimatsu H, Suzuki M, Higuchi W, Yamamoto T, Taniguchi H. Commercially distributed meat as a potential vehicle for community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Appl Environ Microbiol 2012; 78: 2797–2802.
- Oliveira DC, De Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 2155-2161.
- Olson ME, Nygaard TK, Ackermann L, Watkins RL, Zurek OW, Pallister KB, Griffith S. *Staphylococcus aureus* nuclease is an SaeRS-dependent virulence factor. Infect Immun 2013; 81(4): 1316–1324.
- Otto M. *Staphylococcus aureus* toxins. Curr Opin Microbiol 2014; 0: 32–37. doi:10.1016/j.mib.2013.11.004.
- Özdemir H, Keyvan E. Isolation and characterisation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from beef, sheep and chicken meat. Vet Fak Derg 2016; 63: 333-338.
- Pala K, Ozakın C, Akış N, Sınırtaş M, Gedikoğlu S, Aytekin H. Asymptomatic carriage of bacteria in food workers in Nilufer district. Turk J Med Sci 2010; 40(1): 133-139.
- Pamuk S, Yildirim Y, Seker E, Gurler Z, Kara R. A survey of the occurrence and properties of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* in water buffalo milk and dairy products in Turkey. Int J Dairy Tech 2012; 65(3): 416–422.
- Panisello PJ, Rooney R, Quantick PC, Stanwell-Smith R. Application of foodborne disease outbreak data in the development and maintenance of HACCP systems. Int J Food Microbiol 2000; 59: 221-234.
- Patel RK, Kumar R, Savalia CV, Patel NG. Isolation of *Staphylococcus aureus* from Raw Cattle Milk and their Drug Resistance Pattern. Int J Curr Microbiol App Sci 2018; 7(2): 836-840.
- Paterson GK, Harrison EM, Holmes MA. The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol 2014; 22(1): 42–47.
- Peacock SJ, Paterson GK. Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Annu Rev Biochem 2015; 84: 577–601.

- Prabhu NK, Wilfred SR, Hegde R, Kumar NGS. Methicillin resistance pattern of *Staphylococcus aureus* from mastitis milk in correlation to its possession of methicillin resistance gene. *Milchwissenschaft* 2012; 67: 151–154.
- Pu S, Han F, Ge B. Isolation and Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* strains from Louisiana retail meats. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75(1): 265–267.
- Queck SY, Khan BA, Wang R, Bach THL, Kretschmer D, Chen L, Kreiswirth BN, Peschel A, DeLeo FR, Otto M. Mobile genetic element-encoded cytolysin connects virulence to methicillin resistance in MRSA. *PLoS Pathog* 2009; 5 (7): 1366-1371.
- Rall VLM, Vieira FP, Rall R, Vieitis RL, Fernandes A Jr, Candeias JMG, Cardoso KGF, Araujo JP Jr. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. *Vet Microbiol* 2008; 132 (3–4): 408-413.
- Rhee CH, Woo GJ. Emergence and characterization of foodborne methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Korea. *J Food Prot* 2010; 73(12): 2285-90.
- Rozgony F, Seltman G. Pathogenicity and virulence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: slime layer production. *Acta Microbiol Hung* 1985; 32(2): 155- 165.
- Saide-Albornoz JJ, Knipe LC, Murano EA, Beran WG. Contamination of pork carcasses during slaughter, fabrication and chilled storage. *J Food Protect* 1995; 58(9): 993-997.
- Saka E, Terzi Gulel G. Detection of enterotoxin genes and methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from water buffalo milk and dairy products. *J Food Sci* 2018; 83(6): 1716-1722.
- Sasidharan S, Prema B, Yoga Latha L. Antimicrobial drug resistance of *Staphylococcus aureus* in dairy products. *Asian Pac J Trop Biomed* 2011; 1(2): 130-132.
- Saym M. Siirt İlinde hizmet veren değişik birimlerden (lokanta, kafeterya gibi) alınan örneklerden patojen mikroorganizmaların aranması. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın, Yüksek Lisans Tezi, 2007; 21-23.
- Schelin J, Wallin-Carlquist N, Cohn MT, Lindqvist R, Barker GC, Radström P. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence* 2011; 2 (6); 580-592.
- Schulz J. Estimation of airborne transmission distance for bioaerosols emitted from two types of broiler houses. Bielefeld University Faculty of Biology, Bielefeld, Doctoral Thesis, 2007; 104-105.
- Schwabe M, Notermans S, Boot R, Tatini SR, Krämer J. Inactivation of staphylococcal enterotoxins by heat and reactivation by high pH treatment. *Int J Food Microbiol* 1990; 10(1): 33-42.

- Schwartz DC, Cantor CF. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed-field gradient gel electrophoresis. *Cell* 1984; 37: 67-75.
- Segalove M. The Effect of penicillin on growth and toxin production by enterotoxic staphylococci. *J Infect Dis* 1947; 81(3): 228-243.
- Seguin JC, Walker RD, Caron JP, Kloos WE, George CG, Hollis RJ, Jones RN, Pfaller MA. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a veterinary teaching hospital: Potential human-to-animal transmission. *J Clin Microbiol* 1999; 37(5): 1459-1463.
- Sepin-Özen N, Tuğlu-Ataman Ş, Seyman D, Aldağ H, Emek M. Antalya ili gıda çalışanlarında nazal *Staphylococcus aureus* taşıyıcılığının ve MRSA oranlarının üç farklı yöntem kullanılarak incelenmesi. *Turk Hij Deney Biyol Derg* 2013; 70(2): 51–58.
- Shahraz F, Dadkhah H, Khaksar R, Mahmoudzadeh M, Hosseini H, Kamran M, Bourke P. Analysis of antibiotic resistance patterns and detection of *mecA* gene in *Staphylococcus aureus* isolated from packaged hamburger. *Meat Sci* 2012; 90(3): 759–763.
- Shanehbandi D, Baradaran B, Sadigh-Eteghad, S, Zarredar H. Occurrence of methicillin resistant and enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in traditional cheeses in the north west of Iran. *ISRN Microbiol* 2014; Article ID 129580: 1-5.
- Skinner D, Keefer CS. Significance of bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*: a study of one hundred and twenty-two cases and a review of the literature concerned with experimental infection in animals. *Arch Intern Med* 1941; 68: 851–875.
- Smith PB, Hancock GA, Rhoden DL. Improved medium for detecting deoxyribonuclease-producing bacteria. *Appl Microbiol* 1969; 18: 991-993.
- Smith TL, Jarvis WR. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. *Microbes Infect* 1999; 1 (10): 795-805.
- Smith TC. Livestock-Associated *Staphylococcus aureus*: The United States experience. *PLoS Pathog* 2015; 11(2): 1-8.
- Soriano JM, Font G, Molto JC, Manes J. Enterotoxigenic staphylococci and their toxins in restaurant foods. *Trends Food Sci Tech* 2002; 13: 60–67.
- Stegger M, Anderson PS, Kearns A, Pichon B, Holmes MA, Edwards G, Laurent F, Teale C, Skov R, Larsen AR. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecA(LGA251)*. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18(4): 395-400.
- Sudağidan M, Aydın A. Virulence properties of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* food isolates encoding panton-valentine leukocidin gene. *Int J Food Microbiol* 2010; 138: 287-291.
- Sudağidan M, Çavuşoğlu C, Bacakoğlu F. Biyomalzeme yüzeylerinden izole edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarında virulans genlerinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2008; 42: 29-39.

- Suleiman AB, J. K. P. KwagaJKP, Umoh VJ, Okolocha EC, Muhammed M, Lammler C, Shaibu SJ, Akineden O, Weiss R. Macro-restriction analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in Nigeria. *African J Microbiol Res* 2012; 6(33): 6270-6274.
- Sürücüoğlu S, Sakarya M, Gazi H, Ecemiş T, Kurutepe S. Riskli hastalarda metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* taşıyıcılığının belirlenmesinde hızlı tanı testlerinin değerlendirilmesi. *Türk Hij Deney Biyol Derg* 2011; 68 (3): 115-121.
- Syne SM, Ramsubhag A, Adesiyun AA. Microbiological hazard analysis of read-to-eat meats processed at a food plant in Trinidad, West Indies. *Infect Ecol Epidemiol* 2013; 3: 1-12.
- Şen E, Özdemir H. *Staphylococcus aureus* 'un antibiyotik dirençliliği ve halk sağlığı açısından önemi. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi* 2016; 14(1): 20-35.
- Şimşek Z, Koruk İ, Cicek AC, Gurses G. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and intestinal parasites among food handlers in Sanliurfa southeastern Anatolia. *J Public Health Manag Pract* 2009; 15(6): 518-523.
- Tamime YA. Microbial toxins in dairy products. Tamime YA Editor, *Staphylococcus aureus* enterotoxin. 1st ed., West Sussex, John Wiley&Sons Ltd 2017; 80-84.
- Ten Broeke-Smits NJ, Kummer JA, Bleys RL, Fluit AC, Boel CH. Hair follicles as a niche of *Staphylococcus aureus* in the nose; is a more effective decolonisation strategy needed? *J Hosp Infect* 2010; 76(3): 211-214.
- Tenover FC, McAllister S, Fosheim G, McDougal LK, Carey RB, Limbago B, Lonsway D, Patel JB, Kuehnert MJ, Gorwitz R. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from nasal cultures collected from individuals in the United States in 2001 to 2004. *J Clin Microbiol* 2008; 46(9): 2837-2841.
- Tibana A, Rayman K, Akhtar M, Szabo R. Termal stability of staphylococcal enterotxin A, B and C in a buffered system. *J Food Protec* 1987; 50(3): 239-242.
- Tiwari HK, Sapkota D, Sen MR. Evaluation of different tests for detection of *Staphylococcus aureus* using coagulase (*coa*) gene PCR as the gold standard. *Nepal Med Coll J* 2008; 10(2): 129-131.
- Türe M, Altınok İ. Pulsed-field jel elektroforez (PFGE) metodu ve akuatik organizmalarda kullanımı. *Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi* 2013; 9(1): 44-54.
- Todar K. *Staphylococcus*. <http://www.textbookofbacteriology.net/staph.html>, 2018.
- Urhan G. Ankara'da çeşitli kaynaklardan satın alınan beyaz peynirlerin mikrobiyolojik kalite kontrolü üzerinde araştırmalar. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Yüksek Lisans Tezi, 2012; 32-51.

- Ünal S. Toplumda kazanılmış metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*: Genetik özellikleri. Antibiyotik ve Kemoterapi Derneği Dergisi 2006; 20 (Ek 2): 100–101.
- Ünal N, İstanbulluoğlu E. İnsan ve sığır kökenli *Staphylococcus aureus* izolatlarının fenotipik ve genotipik özelliklerinin araştırılması. Vet Fak Derg 2009; 56: 119-126.
- Van Belkum A, Kluytamans J, Van Leeuwen W, Bax R, Wim Q, Edith P, Fluit AD, Vandenbroucke-graals C, Van Den Brule A, Koeleman H, Melchers W, Meis J, Elaichouni A, Vaneechoutte M, Moonens F, Maes N. Multicenter evaluation of arbitrarily primed PCR for typing of *Staphylococcus aureus* strains. J Clin Microbiol 1995; 33: 1537–1547.
- Vandenesch F, Lina G, Henry T. *Staphylococcus aureus* Hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolitic peptides: A redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? Front Cell Infect Microbiol 2012; 2:(12), doi: 10.3389/fcimb.2012.00012.
- Vanderhaeghen W, Cerpentier T, Adriaensen C, Vicca J, Hermans K, Butaye P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. Vet Microbiol 2010; 144(1-2): 166–171.
- Ventura CL, Malachowa N, Hammer CH, Nardone GA, Robinson MA, Kobayashi SD, Deleo FR. Identification of a novel *Staphylococcus aureus* two-component leukotoxin using cell surface proteomics. PLoS One 2010; 5(7): doi: 10.1371/journal.pone.0011634.
- Yıldız Ö, Çaban AY, Şener AG, Coşkuner SA, Bayramoğlu G, Güdücüoğlu H, Özyurt M, Tatman-Otkun M, Karabiber N, Özkütük N, Aktepe O, Öncü S, Arslan U, Bozdoğan B. Antimicrobial susceptibility and resistance mechanisms of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from 12 Hospitals in Turkey. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2014; 13: 44.
- Youssef D, Molony K. *Staphylococcus aureus* bacteremia in adults. Enany S, Alexander LEC editors. Immunology and Microbiology, Frontiers in *Staphylococcus aureus*, First edition, ISBN 978-953-51-2982-0, Print ISBN 978-953-51-2981-3, Published: CC BY 3.0 license, 2017; DOI: 10.5772/66225.
- Yücel N, Anıl Y. Çiğ süt ve peynir örneklerinden *Staphylococcus aureus* ve koagülaz negatif stafilokokların identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılığı. Türk Hij Deneş Biyol Derg 2011; 68 (2): 73-78.
- Wang X, Tao X, Xia X, Yang B, Xi M, Meng J, Zhang J and Xu B. *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in retail raw chicken in China. Food Cont 2013; 29: 103–106.
- Wang W, Lin X, Jiang T, Peng Z, Xu J, Yi L, Li F, Fanning S, Baloch Z. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* cultured from raw milk taken from dairy cows with mastitis in Beijing, China. Front Microbiol 2018; 9: 1123-1126.

- Weese JS, Avery BP, Reid-Smith RJ. Detection and quantification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones in retail meat products. *Let Appl Microbiol* 2010; 51(3): 338-342.
- Weigelt JA, Stevens DL, Parimon T, Bryant AE. Weigel JA Editor. MRSA: Genetics, virulence factors, and toxin expression, in: MRSA. Second Edition, New York, Informa Healthcare USA, Inc. 2010, 31-46.
- Weller TMA. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* typing methods: which should be the international standart. *J Hospt Infect* 2000; 44: 160-172.
- Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, Belkum AV, Verbrugh HA, Nouwen JL. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* 2005; 5(12): 751-762.
- Zadoks RN, Leeuwen W, Kreft D, Barkema H, Sampion O, Verbrugh H, Schukken YH, Belkum A. Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary tying as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human *Staphylococcus aureus* isolated. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1931-1939.
- Zamani A, Sadeghian S, Ghaderkhanı J, Alikhani MY, Najafimosleh M, Goodarzi MT, Farahani HS, Mashouf RY. Detection of methicillin-resistance (*mec-A*) gene in *Staphylococcus aureus* strains by PCR and determination of antibiotic susceptibility. *Ann Microbiol* 2007; 57 (2): 273-276.
- Zhang S, Iandolo JJ, Stewart GC. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). *FEMS Microbiol Lett* 1998; 168: 227-233.

ÖZGEÇMİŞ

- Adı Soyadı** : Yunus KILIÇOĞLU
- Doğum Yeri** : Zile / TOKAT
- Doğum Tarihi** : 21.08.1979
- Medeni Hali** : Evli
- Bildiği Yabancı Diller** : İngilizce
- Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)** : Zile Yavuz Selim İlkokulu 1985-1990
Zile İmam Hatip Ortaokulu 1990-1993
Samsun Veteriner Sağlık Meslek Lisesi 1993-1996
Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fak. 1997-2003
Ondokuzmayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Ens.
2009-2018
- Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl** : Bingöl/Genç Tarım İlçe Müdürlüğü 1998-2000
Kars Tarım İl Müdürlüğü 2000-2002
Kars/Diğor İlçe Tarım Müdürlüğü 2002-2004
Amasya/G.Hacıköy İlçe Tarım Müdürlüğü 2004-2007
Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü 2007-.....
- E-posta** : yunus.kilicoglu@tarimorman.gov.tr