



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

**MANDA SÜTÜ VE ÜRÜNLERİNDEN
STAPHYLOCOCCUS AUREUS İZOLASYONU VE
ENTEROTOKSİN GENLERİNİN BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Erdem SAKA

**SAMSUN
Mayıs-2017**



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

**MANDA SÜTÜ VE ÜRÜNLERİNDEN
STAPHYLOCOCCUS AUREUS İZOLASYONU VE
ENTEROTOKSİN GENLERİNİN BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Erdem SAKA

Danışman

Prof. Dr. Göknur TERZİ GÜLEL

**SAMSUN
Mayıs-2017**

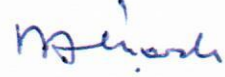
T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ERDEM SAKA tarafından Prof. Dr. GÖKNUR TERZİ GÜLEL Danışmanlığında hazırlanan “Manda Sütü ve Ürünlerinden *Staphylococcus aureus* İzolasyonu ve Enterotoksin Genlerinin Belirlenmesi” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 22/05/2017 tarihinde yapılan sınav ile Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalında DOKTORA Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ahmet GÜNER, Selçuk Üniversitesi




Üye: Prof. Dr. Mustafa ALIŞARLI, Ondokuz Mayıs Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Ahmet Hilmi ÇON, Ondokuz Mayıs Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. GöknuTerzi Gülelel (Danışman), Ondokuz Mayıs Üniversitesi



Üye: Yrd. Doç. Dr. Seyda ŞAHİN, Cumhuriyet Üniversitesi



ONAY:

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

.... /.... /2017

Prof. Dr. Ahmet UZUN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanmasında ve yürütülmesinde hiçbir zaman desteğini ve önerilerini esirgemeyen tez danışman hocam Sayın Prof. Dr. Göknur TERZİ GÜLEL'e ve tez izleme komitemde yer alan değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Mustafa ALIŞARLI'ya ve Sayın Prof. Dr. Ahmet Hilmi ÇON'a şükranlarımı sunarım.

Ayrıca laboratuvar çalışmalarım sırasında bana her daim destek olan değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Özgür ÇADIRCI, Yrd. Doç. Ali GÜCÜKOĞLU, Yrd. Doç. Dr. Gökhan İNAT ve Yrd. Doç. Dr. Habip MURUZ ile değerli dostum Arş. Gör. Tolga UYANIK'a, desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Son olarak manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili ailem, değerli eşim Ferhan SAKA, biricik kızım Beril Ela SAKA ve oğlum Ömer Asaf SAKA'ya, saha çalışmalarım sırasında her daim desteklerini esirgemeyen Gıda Tarım ve Hayvancılık İl Müdür Yardımcısı Sayın Bekir KARAOSMANOĞLU, Bafra İlçe Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürü Sayın Ahmet DURSUN, Samsun İli Manda Birliği Başkanı Sayın İsmail METİN ve tüm İlçe Gıda Tarım Hayvancılık Müdürlüğünde görevli meslektaşlarıma teşekkür ederim.

Bu çalışma PYO.VET-1904.12.004 kod numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

MANDA SÜTÜ VE ÜRÜNLERİNDEN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* İZOLASYONU VE ENTEROTOKSİN GENLERİNİN BELİRLENMESİ

Amaç: Bu çalışmada Samsun bölgesinden temin edilen çiğ manda sütü, manda kaymağı ve manda peynirlerinde *S. aureus* izolasyonu, elde edilen izolatların enterotoksijenik özelliklerinin belirlenmesi ve metisiline dirençlilik profillerinin fenotipik ve genotipik olarak tespiti amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Kasım 2012 - Mayıs 2013 tarihleri arasında Samsun ilinde çeşitli manda çiftliklerinden temin edilen 100 adet manda sütü, 50 adet manda kaymağı ve 50 adet manda peyniri olmak üzere toplam 200 adet örnek materyal olarak kullanıldı. *S. aureus*'un izolasyon ve identifikasyonu EN ISO 6888-1-2:1999'de belirtilen yöntemle yapıldı. İdentifiye edilen *S. aureus* izolatları 16S rRNA ve *nuc* genleri varlığı yönünden PCR ile doğrulandı. *S. aureus* izolatlarında enterotoksin genlerin varlığı (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* ve *see*) multipleks PCR ile incelendi. İzolatların metisilin dirençliliği fenotipik olarak disk difüzyon ve E-test ile, genotipik olarak ise *mecA* geni varlığı yönünden PCR ile belirlendi.

Bulgular: İncelenen 100 manda sütü örneğinin 30'unda (%30), 50 manda kaymağının 9'unda (%18), 50 manda peynirinin de 17'sinde (%34) *S. aureus* identifiye edildi. Elde edilen 99 izolatın tamamının 16S rRNA ve *nuc* genlerini içerdiği belirlendi. 99 izolatın 12'sinin (%12) en az bir enterotoksin ürettiği tespit edildi. Beş izolatın SEA (5/12; 41,6%), iki izolatın SEC (2/12; 16,6%), bir izolatın SED, (1/12; 8,3%), bir izolatın (1/12; 8,3%) SEE ve üç izolatın SEC+SED (3/12; 25%) ürettiği belirlenirken örneklerin hiçbirinde SEB tespit edilemedi. Antibiyotik dirençlilik testleri sonucunda izolatların %16'sının fenotipik olarak, %9'unun ise *mec A* geni içererek genotipik olarak metisiline dirençli olduğu belirlendi.

Sonuç: Manda sütü ve ürünlerinde enterotoksijenik ve metisiline dirençli *S. aureus*'ların tespit edilmesi halk sağlığı açısından önemli olarak değerlendirilmiştir. Bu nedenle üreticilerin iyi üretim teknikleri, sütün pastörize edilmesi ve bilinçsiz antibiyotik kullanımı konusunda eğitilmeleri önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: 16s rRNA; enterotoksin; metisilin; *nuc*; *S. aureus*

Erdem SAKA, Doktora Tezi

Ondokuzmayıs Üniversitesi – Samsun, Mayıs 2017

ABSTRACT

ISOLATION OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* FROM WATER BUFFALO MILK AND DAIRY PRODUCTS AND DETECTION OF ENTEROTOXIN GENES

Aim: The aim of this study was to detect *S. aureus* in water buffalo raw milk, cream and cheese obtained from Samsun region and to assess the presence of enterotoxigenic characteristic and detection of phenotypic and genotypic methicillin resistance profiles of isolates.

Material and Method: A total of 200 sample consisting of 100 water buffalo milk, 50 water buffalo cream, and 50 water buffalo cheese were obtained from several water buffalo farms in Samsun city between November 2012-May 2013, was used as a material. Isolation and identification of *S. aureus* were carried out according to EN ISO 6888-1-2: 1999. *S. aureus* isolates were confirmed for the presence of the of 16S rRNA and *nuc* genes by PCR. The presence of enterotoxins genes of *S. aureus* isolates (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* and *see*) was determined by multiplex PCR. The methicillin resistance was determined by disc diffusion and E-test as phenotypically. Genotypic methicillin resistance was evaluated using PCR for the *mecA* gene

Results: *S. aureus* was identified in 30 of 100 water buffalo milk (30%), 9 of 50 water buffalo cream (18%), and 17 of 50 water buffalo cheese (34%). A total of 99 isolates were confirmed as *S. aureus* included 16S rRNA and *nuc* genes by PCR. The enterotoxigenic *S. aureus* was identified in 12 out of 99 (12%) isolates. Five isolates produced staphylococcal enterotoxins SEA (5/12; 41.6%), two isolates produced SEC (2/12; 16.6%), one isolate produced (1/12; 8.3%) SED, one isolate produced (1/12; 8.3%) SEE and three isolates produced SEC+SED (3/12; 25%). None of the samples were positive for SEB. As a result of antibiotic resistance tests, it has been determined that %16 of isolates as phenotypic, %9 of isolates as genotypic by including *mecA* gene was found to be resistant to methicillin.

Conclusion: The presence of enterotoxigenic and methicillin-resistant *S. aureus* in milk and dairy products is significant for public health. It is recommended to apply good manufacturing techniques in production and proper pasteurization of milk and to avoid unconscious antibiotic use.

Key Words: 16s rRNA; enterotoxin; methicillin; *nuc*; *S. aureus*

Erdem SAKA, PhD Thesis

Ondokuz Mayıs University-Samsun, May 2017

SİMGELER VE KISALTMALAR

<i>Agr:</i>	Accessory Gene Regulator
aw :	Su Aktivitesi
AOAC:	Association of Official Analytical Chemists
ATCC:	American Type Culture Collection
CDC:	Center for Disease Control and Prevention
CFX:	Cefoxitin
CLSI:	Clinical and Laboratory Standards Institute
D-değeri:	Desimal İndirgenme Zamanı
FDA:	Food and Drug Administration
ISO:	International Organization for Standardization
kDA:	Kilo Dalton
Kob:	Koloni Oluşturan Birim
MİK:	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
µl:	Mikrolitre
ml:	Mililitre
MRSA:	Metisiline Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
Ng:	Nanogram
nuc:	Nükleaz
OX:	Oxacillin
PBP:	Penisilin Bağlayan Protein
PCR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PVL:	Panton-Valentin Lökosidin
SCC <i>mec</i>:	Staphylococcal Cassette Chromosome <i>mec</i>
SE:	Stafilokokal Enterotoksin
<i>Sel</i>:	Stafilokokal Enterotoksin Benzeri
TBE:	Tris/Borate/EDTA
TSST:	Toksik Şok Sendrom Toksin

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Tarihçe	6
2.2. <i>S. aureus</i> 'un Klasifikasyonu ve Genel Özellikleri.....	7
2.3. <i>S. aureus</i> 'un Üreme ve Toksin Oluşturma Koşulları.....	9
2.4. Patogenez	10
2.5. <i>S. aureus</i> 'un Virülans Faktörleri.....	11
2.5.1. Hücre Yüzey Bileşenleri	12
2.5.2. Enzimler	14
2.5.3. Toksinler.....	15
2.6. <i>S. aureus</i> 'un Epidemiyolojik Özellikleri.....	21
2.7. <i>S. aureus</i> 'un Gıdalarda Bulunuşu ve Kontaminasyon Kaynakları.....	24
2.7.1. Manda Sütü ve Ürünlerinin Özellikleri	26
2.7.2. Süt ve Süt Ürünlerinde <i>S. aureus</i>	31
2.7.3. Et ve Et Ürünlerinde <i>S. aureus</i>	35
2.8. <i>S. aureus</i> Enfeksiyonları	36
2.9. <i>S. aureus</i> Antibiyotik Direnci ve Mekanizması.....	37
2.9.1. Metisilin Dirençli <i>S. aureus</i> Suşlarının Moleküler Epidemiyolojisi.....	41
2.9.2. Gıdalarda Metisilin Dirençli <i>S. aureus</i> 'ların Varlığı.....	42
2.10. <i>S. aureus</i> 'un İzolasyon ve İdentifikasyonu.....	44
2.11. Metisilin Direncin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler.....	47
2.11.1. Difüzyon Metotları	48
2.11.2. Dilüsyon Metotları	49
2.11.3. Moleküler Yöntemler	50
2.12. Korunma ve Kontrol.....	51
3. MATERYAL VE METOT	53
3.1. MATERYAL	53
3.1.1. <i>S. aureus</i> 'un İzolasyon ve İdentifikasyonunda Kullanılan Malzemeler	54

3.1.2. PCR analizlerinde Kullanılan Malzemeler.....	56
3.1.3. Antibiyotik Direncin Belirlenmesinde Kullanılan Malzemeler	58
3.2. METOT.....	59
3.2.1. <i>S. aureus</i> 'un İzolasyon ve İdentifikasyonu	59
3.2.2. <i>S. aureus</i> 'un PCR ile Doğrulanması	67
3.2.3. <i>S. aureus</i> 'un Enterotoksin Genlerinin PCR ile Belirlenmesi	69
3.2.4. Antibiyotik Dirençliliğin Belirlenmesi.....	71
3.2.5. İstatistiksel Analiz.....	73
4. BULGULAR.....	74
4.1. Mikrobiyolojik Ekim Sonuçları	74
4.2. <i>S. aureus</i> 'un İzolasyon ve İdentifikasyonu.....	75
4.3. <i>S. aureus</i> İzolatlarının Enterotoksin Genlerinin Belirlenmesi	78
4.4. <i>S. aureus</i> İzolatlarının Antibiyotik Direnç Sonuçları	81
4.5. Metisilin Direncin Fenotipik ve Genotipik Olarak Karşılaştırılması	83
5. TARTIŞMA.....	86
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	100
KAYNAKLAR.....	101
EKLER	130
ÖZGEÇMİŞ	141

1.GİRİŞ

Süt tüm memeli hayvanların yavrulamadan sonra meme bezlerinde oluşturdukları biyolojik sıvı olarak tanımlanır (Tekinşen, 2000). Süt ve süt ürünleri içerdikleri kalsiyum ve fosfor başta olmak üzere vitamin (riboflavin gibi bazı B grubu), mineral ve protein bakımından insan beslenmesinde önemli besin maddesidir (Miller ve ark., 2000).

Manda sütü yağ, laktoz, protein, toplam kuru madde ve kalori miktarı bakımından yüksek bir besin maddesidir. Manda sütünde süt yağı miktarı fazla olduğundan beslenme fizyolojisi açısından değerli bir süt olarak kabul edilir. Manda sütü genellikle yoğurt, tereyağı, kaymak, peynir ve dondurma gibi pek çok ürün yapımında değerlendirilmektedir. Ülkemizde bölgelere göre manda sütünden yapılan yoğurt, kaymak ve peynir üretimi daha ön plana çıkmaktadır (Soysal, 2006).

Dünya ülkelerinde süt üretim miktarı 2010 yılında 721 milyon ton iken 2014 yılına gelindiğinde yaklaşık %11 artarak 801,6 milyon tona ulaşmıştır (Tablo 1). 2014 yılı Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) verilerine göre, dünyada süt üretiminde Amerika Birleşik Devletleri (ABD) 183 milyon ton ile birinci sırada, Avrupa Birliği (AB) ülkeleri 222 milyon ton ile ikinci sırada ve Hindistan ise 146 milyon ton ile üçüncü sırada yer almıştır (FAO, 2014).

Türkiye’de süt üretim miktarı Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre 2010 yılında 13,5 milyon ton, 2015 yılında 18,6 milyon ton, 2016 yılına gelindiğinde ise 18,4 milyon ton olmuştur. Türkiye’de süt üretim miktarı 2010 yılından 2015 yılına kadar %38’lik bir artış göstermiş, 2016 yılına gelindiğinde ise %1’lik azalma göstermiştir. Türkiye yıllık ortalama 18 milyon ton süt üretimi ile dünyada ilk 10 ülke arasında yer almaktadır (FAO, 2014; TÜİK, 2016).

Tablo 1. Türkiye, Avrupa Birliği (AB), Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve Dünya’da yıllara göre süt üretimi (ton) (FAO, 2014)

Ülkeler	2010	2011	2012	2013	2014
Türkiye	13.543.674	15.056.210	17.401.262	18.223.712	18.630.860
AB-28	213.215.423	214.927.762	215.799.792	215.937.052	222.942.70
ABD	171.394.109	176.163.500	178.794.252	180.289.845	183.686.413
Dünya	721.470.558	738.958.532	756.584.704	774.519.424	801.649.444

AB-28: Avrupa birliğine üye 28 ülke

Dünya’da toplam süt üretiminin yaklaşık %85’ini inek sütü, %2,4’ünü keçi sütü, %1,3’ünü koyun sütü oluştururken, manda sütü ise toplam süt üretiminin yaklaşık %11’ini oluşturmaktadır (Tablo 2). Dünya’da manda sütü üretimi 2010 yılında 92 milyon ton iken, 2014 yılına gelindiğinde %15’lik büyüme ile 114 milyon tona ulaşmıştır. Dünya genelinde üretilen toplam manda sütünün %90’ından fazlası Hindistan ve Pakistan’da üretilmektedir. Bu ülkelerden sonra sırasıyla Mısır, Çin, İran ve İtalya gelmektedir (FAO, 2014).

Tablo 2. Dünya’da sağılan hayvan türlerine göre süt üretim miktarları (milyon ton) (FAO, 2014)

Hayvan türü/Yıl	2010	2011	2012	2013	2014
İnek	598,9	612,6	627,2	635,3	655,9
Koyun	10,1	10,4	9,8	10,1	10,4
Keçi	17,1	17,5	17,8	17,7	18,3
Manda	92,1	95,8	98,9	108,4	114,0
Toplam	718,2	736,3	753,7	771,5	798,6

Türkiye’de toplam süt üretiminin %90,8’ini inek sütü, %6,3’ü koyun sütü, %2,6’sı keçi sütü ve %0,3’ü ise manda sütü oluşturmaktadır (TÜİK, 2016). Türkiye’de 2003 yılında toplam manda sayısı 86.360 baş, sağılan manda sayısı 53.378 baş ve manda sütü miktarı ise yaklaşık 49 bin ton iken, 2016 yılına gelindiğinde toplam manda sayısı 142.073 baş, sağılan manda sayısı 63.329 baş olarak bildirilmiştir (FAO, 2014; TÜİK, 2016). 2016 yılı TÜİK verilerine göre Türkiye’de toplam manda sütü üretiminin yıllık yaklaşık 63 bin ton olduğu ve Samsun ilinin 8.781 ton manda sütü üretimi ile Türkiye’de en çok manda sütü üretilen il olduğu bildirilmiştir (TÜİK, 2016).

Süt ve süt ürünleri içerdikleri zengin besin elementlerinden dolayı birçok patojen mikroorganizmanın üremesi için iyi bir ortam oluşturmaktadır. Süt kaynaklı hastalıkların çoğu çiğ süt ve süt ürünlerinin tüketilmesi sonucu oluşmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri’nde 1987-2010 yılları arasında çiğ süt tüketiminden kaynaklanan insan kaynaklı enfeksiyon sayısı 133, salgınlardan etkilenen kişi sayısı 2.659, hastanede tedavi edilen kişi sayısı 269 ve ölen kişi sayısı da 3 olarak bildirilmiştir (FDA, 2011).

Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi (CDC) verilerine göre ABD’de her yıl yaklaşık 48 milyon kişinin gıda kaynaklı hastalıklardan etkilendiği, 128 bin kişinin hastanelere başvurduğu ve ortalama 3000 kişinin gıda kaynaklı hastalıklar nedeniyle öldüğü belirtilmiştir. Gıda kaynaklı enfeksiyonlara neden olan etkenlerin başında %58 ile norovirüslerin geldiği, *S. aureus* kaynaklı enfeksiyonların ise %3 ile beşinci sırada yer aldığı bildirilmiştir (CDC, 2011).

S. aureus başta burun mukozası ve deri gibi insanların doğal florası olmak üzere giysiler ve cansız yüzeyler gibi birçok ortamda bulunarak hayatta kalabilme yeteneğine sahiptir. El, deri ve özellikle apseli yaralar *S. aureus* için önemli kontaminasyon kaynaklarını oluşturmaktadır. *S. aureus*, toksin oluşturması, invaziv karakterde olması ve bazı antibiyotiklere karşı direnç göstermesi nedeniyle hastane ve toplum kökenli hastalıklarda önemli bir etken olarak ortaya çıkmıştır (Chaibenjawong ve Foster, 2011).

S.aureus kaynaklı tipik bir gıda zehirlenme olgusu kontamine gıda alımını takiben yaklaşık 3-5 saat gibi kısa bir sürede şekillenir. Bu süre bakterinin gıdada ürettiği toksin miktarına bağlıdır. Kontamine gıdanın alınmasını takiben ishal veya ishal oluşmadan kusma, şiddetli karın ağrısı ve kramp gibi belirtiler şekillenir. Belirgin bir sıvı kaybının şekillendiği durumlarda kişide dehidrasyon ve hipotansiyon meydana gelebilmektedir. Hastalık genellikle bebekler, yaşlılar ve bağışıklık sistemi düşük olanlar kişiler dışında, 24-48 saat içerisinde kendini sınırlayan ve sonlanan bir seyir izlemektedir (Murray, 2005).

AB ülkelerinde 2013 yılında 12 üye ülkede stafilokokal enterotoksinlerin neden olduğu 386 adet gıda kaynaklı salgın şekillendiği, bu salgınlardan 3203 kişinin etkilendiği ve 210 kişinin hastanede tedavi gördüğü bildirilmiştir. Salgın tespit edilen üye ülkelerden Fransa 336 vaka ile (%87) ilk sırada yer almıştır (EFSA, 2012a). Dünya’da çeşitli ülkelerde *S. aureus*’un insidensi üzerine yapılan çalışmalarda Brezilya’da 548 çiğ manda sütü örneğinde *Staphylococcus* spp. düzeyi %10,8, koagulaz-negatif stafilokok düzeyi %83,3 ve koagulaz pozitif stafilokok düzeyi ise %11,1 olarak bildirilmiştir (Oliveira ve ark., 2011). Norveç’te çiğ inek ve keçi sütleri ile bu sütlerden yapılan ürünlerde (peynir vd.) enterotoksijenik *S. aureus* varlığı incelenmiş, inek sütü örneklerinin %75’inin, keçi sütü örneklerinin %96,2’sinin çiğ

sütten yapılan ürünlerin ise %37,8'inin *S. aureus* ile kontamine olduğu bildirilmiştir (Jorgensen ve ark., 2005).

Ülkemizde *S. aureus* insidensi üzerine yapılan çalışmalarda çiğ sütlerde insidensin %11-%96, çiğ ya da pastörize sütlerden elde edilen çeşitli peynir türlerinde ise insidensin %5-%84 arasında olduğu bildirilmiştir (Uraz ve Arslan, 1997; Gülmez ve ark., 2001; Demirel ve Karapınar, 2004; Keskin ve ark., 2006; Şengül, 2006; Can, 2011; Nassasra, 2011; Yücel ve Anıl, 2011). Samsun ilinde yapılan bir çalışmada 122 çiğ süt ve süt ürününden 64'ünün (%52) *S. aureus* yönünden pozitif bulunduğu bildirilmiştir (Gücükoğlu ve ark., 2012). Yine ülkemizde çiğ koyun sütü ve bu sütlerden elde edilen peynirler üzerinde yapılan çalışmada koagulaz pozitif stafilocok düzeyinin çiğ sütte %57,3, peynirlerde ise %60 oranında olduğu bildirilmiştir (Ertaş ve ark., 2010).

S. aureus'lar tarafından üretilen enterotoksinler dünyada gıda zehirlenmelerinin en yaygın sebepleri arasında yer almaktadır. *S. aureus*'lar, gıdalarda 10^6 kob/g veya daha yüksek sayıya ulaştığında enterotoksin sentezleme yeteneğine sahip olmaktadır (Adams ve Moss, 1993). Ülkemizde Ertaş ve ark. (2010), tarafından yapılan çalışmada çiğ sütlerden izole edilen koagulaz pozitif stafilocokların %3,8'inin, peynirlerden elde edilen izolatların ise %2,3'ünün enterotoksin oluşturduğu bildirilmiştir. Enterotoksin tipine bakıldığında süt ve süt ürünlerinde en çok SEA ve SEC tespit edildiği bildirilmektedir (Fueyo ve ark., 2005).

Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği "süt ve süt ürünleri üretim hijyenik kriterleri"ne göre koagulaz pozitif stafilocok sayısı için kabul edilebilir limit; çiğ süttten yapılan peynirler için 10^4 - 10^5 kob/g, pastörizasyondan daha düşük sıcaklıklarda ısıtılmış süt ürünleri için 10^2 - 10^4 kob/g, pastörizasyon veya daha yüksek sıcaklıklarda ısıtılmış uygulanmış süt ürünleri için 10^1 - 10^2 kob/g olarak bildirilmiştir. Aynı yönetmeliğin Ek-2 "gıda güvenilirliği kriterleri"ne göre koagulaz pozitif stafilocok sayısı için kabul edilebilir limit; kaymak ve peynir için 10^2 - 10^3 kob/g olarak bildirilmiştir. Stafilocokal enterotoksinlerin ise 25 gram gıdada hiç bulunmaması gerekmektedir (Anon, 2011).

Antimikrobiyal direnç tüm dünyada giderek artan önemli bir halk sağlığı problemidir. Antibiyotiklerin hayvanlarda tedavi ve büyümeyi hızlandırıcı amaçla bilinçsiz olarak kullanımı sonucu patojen bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç şekillenmektedir (Aestrup ve Wegener, 1999). Metisilin kullanımı ilk olarak 1959

yılında klinik uygulamalara girmiştir. İlk metisilin direnci de 1961 yılında İngiltere’de *S. aureus* (MRSA) suşuna karşı şekillenmiştir (Jevons, 1961). AB ülkeleri içerisinde İtalya’da metisilin dirençli stafilokokların (MRSA) oluşturduğu enfeksiyonların insidansı %30,3-34,4 olarak en yüksek oranda olduğu bildirilmiştir (Monno ve ark., 2003).

Bu çalışmada, Samsun İline bağlı Bafra, Ondokuzmayıs, Çarşamba ve Terme ilçelerinde bulunan bazı manda işletmelerinden elde edilen i) çiğ manda sütü, manda kaymağı ve peynirlerinde *S. aureus*’un insidansının belirlenmesi, ii) elde edilen izolatların enterotoksin oluşturma yeteneklerinin *sea*, *seb*, *sec*, *sed* ve *sed* genleri yönlerinden m-PCR ile belirlenmesi, iii) patojenitede önemli role sahip 16S rRNA ve *nuc* genlerinin PCR ile belirlenmesi, iv) elde edilen izolatların metisiline dirençlilik profillerinin fenotipik olarak disk difüzyon ve E-test ile genotipik olarak ise *mecA* geni yönünden PCR ile belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Bu çalışma sonucunda Samsun ilinde çiğ manda sütü, manda peyniri ve manda kaymağından izole edilen *S. aureus* suşları ile gıda kaynaklı infeksiyonların aydınlatılması hedeflenmektedir. Bu çalışmada hassas, hızlı ve güvenilir metotların kullanılması, elde edilen sonuçların moleküler teknikler ile desteklenmesi ile bu konuda çalışan ve rutin hizmet veren gıda laboratuvarlarına model oluşturması hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Stafilokoklar ilk olarak 1878 yılında Robert Koch tarafından apseler üzerinde yapılan incelemelerde tespit edilmiş ve ilk kez 1880 yılında Louis Pasteur tarafından sıvı besiyerinde üretilmiştir. 1881 yılında İskoçyalı cerrah Alexander Ogston tarafından yapılan mikroskopik incelemede bakterinin üzüm salkımı formunda olduğu tespit edilmiş ve Yunanca kökenli *staphyle* (üzüm salkımı) kelimesinden türetilerek ‘*Staphylococcus*’ olarak isimlendirilmiştir (Ogston, 1882; Bergdoll ve Wong, 2006).

1884 yılında Alman cerrah Anton J. Rosenbach ilk kez stafilokokların kültürünü yaparak, katı besiyerinde sarı renkli koloni oluşturan mikroorganizmalara Latince ‘aurum’ kelimesinden türettiği *Staphylococcus aureus*, beyaz renkli koloni oluşturan mikroorganizmalara ise Latince ‘albus’ kelimesinden türettiği *Staphylococcus albus* (günümüzdeki adı ile epidermidis) adını vermiştir (Rosenbach, 1884).

Stafilokoklar, 1957’li yıllara kadar mikrokok cinsi içine dahil edilmişlerdir. 1957 yılında bu iki cinsin glukozdan asit oluşturma ve anaerobik üreme özelliklerine bakılarak ayırt edilebileceğinin ortaya konulması ile ‘Bergey’s Manuel of Systematic Bacteriology’nin 7. baskısında stafilokoklar ayrı bir tür olarak değerlendirilmiştir. Mannitolü anerobik kullanma ve koagulaz oluşturma yeteneklerine göre *S. aureus* ve *S. epidermidis* olmak üzere iki tür tanımlanmıştır (Patrick, 1990).

1974 yılında *S. saprophyticus* stafilokoklara üçüncü tür olarak eklenmiştir. Baird ve Parker 1974 yılında stafilokokları, *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* olmak üzere üç türe ayırmıştır. 1980 yılında ise 13 olan tür sayısı, ilerleyen DNA homolojisi, immunokimyasal ve biyokimyasal çalışmalarla 25’e ulaşmıştır. Tanımlanan stafilokok türlerinden *S. aureus*, *S. intermedius* ve *S. hyicus* hariç tamamının koagulaz negatif olduğu bildirilmiştir (Bergdoll, 1989; Baird-Parker, 1990). Yapılan son araştırmalara göre günümüzde stafilokokus cinsinde tanımlanan 52 tür ve 28 alttür olduğu bildirilmiştir (Schleifer ve Bell, 2015).

Stafilokokal kaynaklı gıda infeksiyon ve intoksikasyonları ile ilgili ilk bulgular, 1884 yılında Vaughan ve Stenberg tarafından Amerika Birleşik Devletleri’nin Michigan eyaletinde kontamine peynirlerin tüketilmesi sonucu şekillenmiştir. Daha sonra 1894 yılında J. Denny tarafından *S. aureus* ile kontamine sütün tüketilmesi

sonucu semptomların gözlemlendiği bildirilmiştir (Jay ve ark., 2005; Hennekinne ve ark., 2012).

1928 yılında Alexander Fleming tarafından penisilinin bulunması; 1940 yılında ise Florey ve Chain tarafından penisilin üretiminin başlaması ile stafilokokların neden olduğu infeksiyonların tedavisinde önemli adımlar atılmıştır. 1959 yılında ise ilk semisentetik penisilinaza dirençli antibiyotik olan metisilin kullanıma girmiştir (Shopsin ve Kreiswirth, 2001). Metisilin klinik kullanıma girmesinden sonra ilk metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) izolasyonu 1960'lı yılların sonlarında Amerika Birleşik Devletleri'nde Boston Şehir Hastanesinde rapor edilmiştir (Barrett ve ark., 1968).

1960'lı yılların sonlarında stafilokokların tüm dünyada antimikrobilyallere karşı tedavi seçeneğinin sınırlı olmasından dolayı önemli bir nozokomiyal etken olduğu bildirilmiştir (Grüneberg, 1997). MRSA suşları 1990'lı yıllarda giderek artan oranlarda insanlardan ve hayvanlardan izole edilmeye başlamıştır. MRSA suşları zoonoz olmaları, çoklu direnç göstermeleri, tedavi seçeneklerinin sınırlı ve masraflı olması ve özellikle yoğun bakım ünitelerinde hastane enfeksiyonlarına neden olmalarından dolayı halk sağlığı açısından önemli bir problem haline gelmiştir (Klevens ve ark., 2006).

2.2. *S. aureus*'un Klasifikasyonu ve Genel Özellikleri

Stafilokoklar üremeleri sırasında üzüm salkımına benzeyen, birbirinden ayrılmayan düzensiz kümeler oluşturmaları nedeniyle üzüm salkımı anlamına gelen '*staphyle*' ve granül anlamına gelen '*cocci*' kelimelerinden türetilmiştir (Murray ve ark., 1998). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'nin 1986 yılındaki baskısında stafilokoklar, Micrococcaceae ailesi içinde Planococcus, Micrococcus, Stomatococci cinsleri ile birlikte sınıflandırılmıştır (Sneath ve ark., 1986). Stafilokoklar, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'nin 1923 yılında yapılan sınıflandırmasında Bacilli sınıfında Bacillales takımında Staphylococcaceae familyasında yer almıştır. 1940 yılında yapılan son klasifikasyona göre ise stafilokoklar Staphylococcaceae familyasında yer almakta ve bu familyada; Staphylococcus, Gemella, Jeotgalicoccus, Micrococcus, Salinicoccus ve Nasocomiicoccus olmak üzere 6 soy bulunmaktadır (Prévot, 1940; Garrity ve ark., 2004; Schneewind ve Missiakas, 2009).

Stafilokok türleri içinde insan ve hayvanlardan en sık izole edilen, gıda zehirlenmelerinde potansiyel risk oluşturan, en patojen ve en iyi bilinen tür *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (*S. aureus*)'tur. Çeşitli hayvan türlerinden izole

edilen diğerk önemli koagulaz pozitif türler arasında; *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus hyicus* (değişken), *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus schleiferi* subsp *coagulans* ve *Staphylococcus lutrae* yer almaktadır. Önemli koagulaz negatif türler ise; *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. saprophyticus*, *S. schleiferi*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. cohnii* ve *S. hominis*'tir (Koneman ve ark., 2006; Cunha, 2009).

İnsanlarda ve hayvanlarda normal deri ve mukoza zarlarında bulunan stafilokoklar gram pozitif, küre şeklinde, 0,5-1,5 µm çapında, hareketsiz, sporsuz, genellikle kapsülsüz ve fakültatif anaerop (*S. aureus* subsp. *anaerobius* dışında) bakterilerdir (Bremer ve ark., 2004). Stafilokok türleri biyokimyasal özelliklerine göre başlıca pigment oluşumu, koagulaz, termonükleaz, hemoliz, mannitol, asetoin, clumping faktör ve hyaluronidaz, aktivitelerine göre ayırt edilmektedir. Altın sarısı renkteki koloni pigmentasyonu *S. aureus* için önemli kültürel karakteristik bir özelliktir. Stafilokoklar novobiosin ve lizostafine duyarlı, lizozime ise dirençlidir (Bergdoll ve Wong, 2006).

S. aureus, aerobik ve anaerobik olarak; mannitol, maltoz, sükröz ve trehaloz gibi çeşitli şekerleri fermente ederek gaz oluşturmaksızın asit oluşturur (Koneman ve ark., 2006). Bazı stafilokok türlerinin biyokimyasal özellikleri Tablo 3'te belirtilmiştir.

Tablo 3. Bazı stafilokok türlerinin biyokimyasal özellikleri (Koneman ve ark., 2006)

Özellikler	<i>S. aureus</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. hyicus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. choromogenes</i>
Koagulaz	+	+	+/-	-	-
Clumping faktör	+	+/-	-	-	-
Termostabil nükleaz	+	+	+	-	-
Hemoliz	+	+	-	+/-	-
Mannitol (Anaerobik)	+	+/-	-	-	+/-
Pigmentasyon	+	-	-	-	+
Asetoin	+	-	-	+	-
Nitrat Redüksiyon	+	+	+	+	+
Lizostafin	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Az Duyarlı	Duyarlı
Novobiosin	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı

+/-; değişken

Stafilokoklar, sporsuz bakteriler içerisinde dış çevre şartlarına, kuruluğa, dezenfektanlara ve yüksek tuz konsantrasyonuna en dayanıklı mikroorganizmalardır (Le Loir ve ark., 2003). Stafilocoklar insan popülasyonunun yaklaşık %35'inde kommensal (ortakçı) olarak bulunurlar. Yenidoğanlarda ise stafilocokların çoğunlukla doğumu takip eden ilk haftalarda kolonize oldukları belirtilmektedir (Dancer ve Noble, 1991).

S. aureus, serbest ve bağıli koagulaz (clumping faktör) olmak üzere iki tip koagulaz enzimi sentezlemektedir. Serbest koagulaz termolabil ve ekstraselüler bir enzim iken bağıli koagulaz termostabil ve hücre duvarı yüzeyine lokalize bir enzimdir (Rao, 2006). Koagulaz enzimi patojen *S. aureus* izolatlarının ayırımında kullanılan önemli bir özellik olmakla birlikte, patojenitede kesin belirleyici bir faktör değildir. Koagulaz ve termonükleaz negatif bazı *S. aureus* izolatlarının da enterotoksin oluşturabildiği belirtilmektedir (Erol, 2007). Koagulaz, mannitol fermentasyonu, DNase testi ve termonükleaz (TNase) üretimi *S. aureus*'un tespit edilmesinde önemli parametrelerdir (Koneman ve ark., 2006).

2.3. *S. aureus*'un Üreme ve Toksin Oluşturma Koşulları

Stafilokoklar üreme ve gelişimleri için uygun sıcaklık, nem, besin maddesi ve zamana ihtiyaç duyarlar. Stafilocoklar geniş bir sıcaklık aralığında (7-48,5°C) üreyebilen bakterilerdir. Optimal üreme sıcaklıkları 30-37°C'dir. *S. aureus* genellikle pH 4,2-9,3; optimal olarak ise pH 7,0-7,5 arasında üremektedir. Toksin üretimi için optimal pH değeri 6,0-7,0 olmakla birlikte, SEA'nın toksin oluşturabilmesi için optimal pH değeri 5,3-6,8 arasında değişmektedir (Le Loir ve ark., 2003). SEB'nin anaerobik koşullarda %9,2 NaCl içeren kürlenmiş jambonda, 30°C ve pH 5,3'de oluşabildiği bildirilmiştir. *S. aureus* nitrojen kaynağı olarak valin, sistin, arjinin, fenilalanin gibi aminoasitleri bunun yanında tiamin ve nikotinik asit gibi B grubu vitaminlerini kullanmaktadır (Jay ve ark., 2005).

S. aureus 10-47,8°C'ler arasında (optimal 40-45°C'de) toksin oluşturmaktadır. Buna karşın 10°C'den düşük sıcaklıklarda SEA, SEB, SEC ve SED'nin oluştuğu bildirilmektedir. Stafilocoklar, uygulanan ısı işlemine enterotoksinlerden daha duyarlıdır. *S. aureus* için D60 (D-değeri, Desimal indirgenme zamanı) ve D70 değerleri sırasıyla 41,2 ve 3,5 saniyedir. Stafilocoklar kültürde -20°C'de 3-6 ay kadar canlı kalabilirler (Jay ve ark., 2005; Erol, 2007).

S. aureus %5 koyun kanlı agarda, yuvarlak, dış bükey, 1-4 mm çapında keskin kenarlı, S (Smooth-düz, pürüzsüz) tipi, altın sarısı renkte koloniler oluşturmaktadır. Kanlı agarda *S. aureus* kolonilerinin çoğu berrak beta hemoliz zonu ile çevrili iken bazı koagulaz negatif türler (*S. epidermidis* ve *S. saprophyticus*) ise turuncu ya da sarı renkte pigment ve hemoliz oluşturmaktadır (Murray ve ark., 2005; Forbes ve ark., 2007).

S. aureus ozmotolerant özellikte, sporsuz, düşük aw değerinde üreyebilen ve kuru çevresel koşullarda uzun süre canlı kalabilen bir bakteridir. Üremesi ve toksin oluşturabilmesi için ihtiyaç duyduğu en düşük aw değeri 0,83-0,86'dır. *S. aureus* %20 tuz konsantrasyonunda üreyebilmekte, %10'a kadar olan tuz konsantrasyonunda ise toksin oluşturabilmektedir (Erol, 2007). *S.aureus*'un üreme ve toksin oluşturma koşulları Tablo 4'te belirtilmiştir.

Tablo 4. *S.aureus*'un üreme ve toksin oluşturma koşulları (Tatini, 1973)

Faktör	Üreme		Enterotoksin Üretimi	
	Optimum	Min/Maks.	Optimum	Min/Maks.
Sıcaklık	35- 41°C	6- 48°C	34- 40°C	10- 46°C
pH değeri	6-7	4-10	7-8	5- 9,6
NaCl	0%	0-20%	0%	<12%
aw değeri	0,99	0,83≥0,99	0,99	0,86≥0,99
Redoks Potansiyeli (Eh)	>+200mV	≥ 200 >+200mV	>+200mV	≥100 >+200mV

2.4. Patogenez

S. aureus enfeksiyonlarının birçoğu etkenin açık yaralara bulaşması sonucu şekillenmektedir. Viral enfeksiyonlara bağlı olarak üst solunum yollarının mukozal yüzeylerinde oluşan zararlar, konağı influenza enfeksiyonundan sonra *S. aureus* pnömonisine yatkın hale getirmektedir (Novick, 2003).

S. aureus'un patogenezinde yüzeyinde bulunan mikrokapsül, protein A, clumping faktör (koagulaz) ve çok sayıda inhibe edici komplement sistem rol oynamaktadır (Tablo 5). Tüm bu faktörler konakçı savunmasını engelleyerek fagositozu

önlemektedir (Foster, 2005). *S. aureus*'un dokularda hasara yol açması; i) oluşturduğu ekzotoksinlerin dolaşım sistemine girerek intoksikasyona yol açması, ii) süperantijenlerin eksprese olmasıyla şekillenen T hücrelerinin aktivasyonu, iii) sitokinlerin salınımı şeklinde oluşan 3 temel mekanizma ile gerçekleşmektedir (Moreillon ve ark., 2005).

S. aureus, doku kolonizasyonu, doku hasarı ve farklı birçok hastalığı tetikleyen çok sayıda patojenik belirleyiciyi faktör taşımaktadır (Lowy, 1998). *S. aureus* konakçı hücrelerinin fibroblast, osteoblast, endotelyal ve epitelyal hücreleri gibi çeşitli profesyonel olmayan fagositlerini istila ederek hem hücre içinde hem de dışında hayatta kalabilmektedir. Nötrofiller *S. aureus*'a karşı daha zorlu bir savunma geliştirdiğinden nötrofil işlev bozukluğu olan hastalarda invaziv *S. aureus* enfeksiyonlarının insidansının daha yüksek olduğu bildirilmiştir (de Haas ve ark., 2004; Kubica ve ark., 2008).

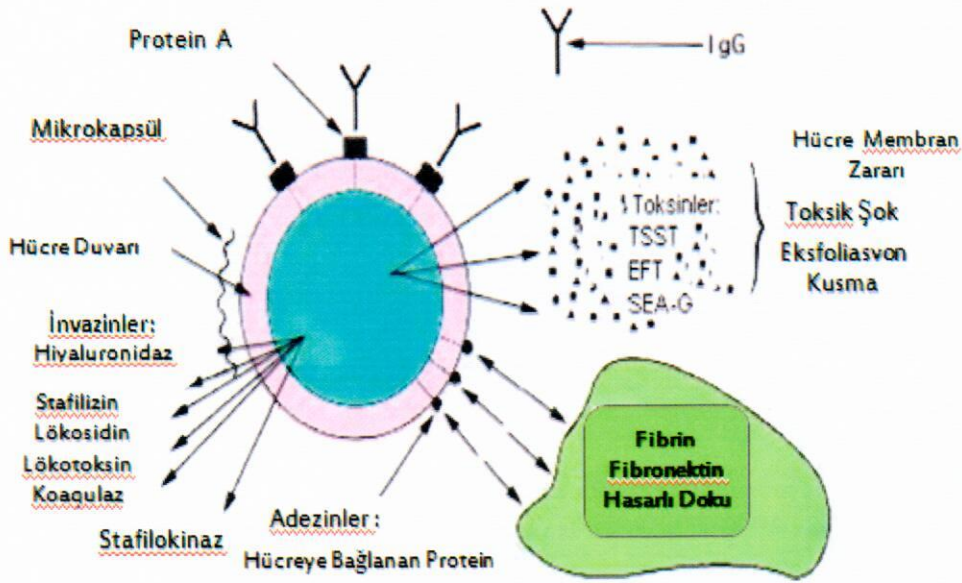
Tablo 5. *S. aureus*'un patogeneğinde rol oynayan faktörler (Archer, 1998)

Konakçı savunmasının engellenmesi	Mikrokapsül Protein A Koagülaz Yağ Asidi Metabolize Edici Enzim Lökosidin ve/veya γ Toksin
Dokuya yerleşme	Proteazlar Nükleazlar Lipazlar Hyalorinidaz Stafilokinaz
Sepsis sendromunun oluşması	Toksik Şok Sendrom Toksini Enterotoksinler Sitolitik toksinler (α, β, γ ve δ)
Spesifik toksinosis'in indüklenmesi	Toksik Şok Sendrom Toksini Enterotoksinler Eksfoliatif Toksin
Endotelyal hücrelere ve bazal membranlara tutunma	Bağlanma Proteinleri Fibronektin Laminin Kollajen Trombospondin

2.5. *S. aureus*'un Virülans Faktörleri

S. aureus izolatlarının büyük çoğunluğu, bağışıklık sistemini baskılayan, konak için toksik şok sendromu gibi zararlı toksik etkilere ve enfeksiyonlara neden olan çok

sayıda virülans faktör üretmektedir (Lowy, 1998). *S. aureus*'un başlıca virülans faktörleri arasında hücre yüzey bileşenleri (mikrokapsül, peptidoglikan, protein A, teiokoik asit), enzimler (katalaz, koagulaz, hyalüronidaz, fibrinolizin, lipaz, deoksiribonükleaz, beta-laktamaz) ve toksinler (sitotoksin, eksfoliyatif toksin, toksik şok sendromu toksin-1, stafilokokal enterotoksinler) yer almaktadır (Şekil 1) (Anon, 2008).



Şekil 1. *S. aureus*'un virülans faktörleri (Anon, 2008)

2.5.1. Hücre Yüzey Bileşenleri

Kapsül ve Slime Tabakası

S. aureus klinik izolatlarının %90'ından fazlasında bakteriyi fagositozdan koruyan, polisakkarit yapıda, mikrokapsül veya kapsül yapısı bulunmaktadır. *S. aureus* izolatlarında 11 farklı kapsül serotip tanımlanmıştır. Klinik enfeksiyonların çoğunda serotip 5(%25) ve serotip 8(%50) kapsül çeşitleri sorumlu tutulmaktadır (Sompolinsky ve ark., 1985). Stafilokok enfeksiyonlarına karşı saflaştırılmış polisakkarit yapıdaki serotip 5 ve 8 türü kapsülün aşı çalışmaları için hedef antijen olarak kullanılabilceği, ancak etkili bir *S. aureus* aşısının geliştirilmesi için diğer antijenlerin de dahil edilmesinin büyük önem taşıdığı belirtilmektedir (O'Riordan ve Lee, 2004).

Stafilokokların çoğu, monosakkarit, protein ve peptit formda, gevşek yapılı hücrel immün yanıtı baskılayan ince bir tabaka (slime tabakası) üretirler (Muray ve ark., 2005). Slime tabakası adı verilen bu ekstrasellüler yapı bakterinin konak hücreleri ve yabancı cisimlere yapışması ve kolonize olmasında önemli bir rol oynar. Mastitise neden olan *S. aureus* suşlarında slime faktör üretimi patogeneizde önemli bir virülans faktörüdür. Slime faktör oluşumu antibiyotik direncinde önemli rol oynar. Slime oluşturan suşların antibiyotiklere karşı direncinin daha yüksek olduğu belirtilmektedir (Vasudevan ve ark., 2003).

Murein (Peptidoglikan), Teikoik Asit ve Protein A

Stafilokokların hücre duvarında bulunan üç ana bileşen murein (peptidoglikan), teikoik asit ve yüzey proteinleri (protein A) patojenitede önemli rol oynar. Peptidoglikan tabaka (murein, mukopeptid, glikopeptid) bakteri kuru ağırlığının yaklaşık %50'sini oluşturur (Muray ve ark., 2005). Murein, bakteri hücre duvarının yapısal bütünlüğünü sağlayan peptit köprüleriyle çapraz bağlanmış glikan ipliklerinden oluşur (Gally ve Archibald, 1993). Stafilokokal mureinde glikan tabaka N-asetilglukozamin (GlcNac) ve N-asetilmuramik asit (MurpNac) şeker moleküllerinden oluşur. Murein tabaka ozmotik dengeyi sağlayarak bakterinin şeklinin oluşmasını sağlar (Strominger ve Ghuysen, 1967; Bannerman, 2003).

Teikoik asit, fosfodiester bağları ile bağlı, uzun zincirli, suda eriyebilen, şeker-alkol-fosfat polimerlerinden oluşur ve yüzey proteinlerinin tamamı ile birlikte murein tabakasına kovalent olarak bağlanır (Lodise ve McKinnon, 2005). *S. aureus* faj reseptörünün bir parçası olan teikoik asit, hücre yüzeyindeki negatif yüke katkıda bulunarak iyonların kazanılmasına katkıda bulunur (Chatterjee, 1969).

S. aureus hücre duvarının son bileşeni, yapışkan matrix moleküllerini tanıyan mikrobiyal yüzey bileşenleri (MSCRAMMs) de dahil olan yüzey proteinleridir (Foster ve Höök, 1998). Yüzey proteinlerinin en önemli görevi stafilokokların konak dokulara kolonizasyonunu sağlamaktır (Levinson ve Jawetz, 2000). Protein A (SpA) bu proteinlerin prototipi olarak kabul edilmektedir. Protein A hücre duvarının yaklaşık %7'sini oluşturur ve molekül ağırlığı 42 kDa'dır. Protein A, *S. aureus* suşlarının çoğunda peptidoglikan tabakasının en dışında yer alan diğer stafilokoklarda veya mikrokoklarda bulunmayan küçük bir proteindir (Alen ve ark., 2006).

2.5.2. Enzimler

Katalaz

Katalaz hücresel metabolizma sırasında oluşan bir enzim olup hidrojen peroksiti (H_2O_2), su ve moleküler oksijene dönüştürür. Oksidatif stresle ilişkili birçok ayırıştırıcı bakteriyel patojenin potansiyel virülans faktörlerinden biridir (Kanafani ve Martin, 1985). Katalaz enzimi, bakterileri fagositlerin içinde bulunan savunma mekanizmalarına karşı korumaktadır (Bannerman, 2003).

Koagulaz

Patojenitede önemli role sahip koagulaz enzimi protrombine bağlanarak fibrinolitik etkinliği aktive eden, *S. aureus* tarafından oluşturulan ekstrasellüler bir proenzimdir (Moreillon ve ark., 1995). Bağlı ve serbest olmak üzere iki çeşit koagulaz enzimi bulunmaktadır. Bağlı koagulaz hücre duvarında bulunur ve doğrudan fibrinojene bağlanarak fibrinojeni fibrine dönüştürerek kümeleşmeye neden olur. Serbest koagulaz ise plazmada “coagulase-reacting factor (CRF)” ile reaksiyona girerek, protrombine bağlandıktan sonra fibrin pıhtılarının oluşumuna katkıda bulunan staphylothrombin adı verilen bir kompleks oluşturur (Vanassche ve ark., 2013).

Hyalüronidaz

Hyalüronidaz, yüksek molekül ağırlıklı bir polimer olan hiyalüronik asidin (HA) β -1,4 glikozidik bağını parçalayan N-asetilglukozamin ve D-glukuronik asit disakkarid birimlerinden oluşan bakteriyel bir enzimdir. Hyalüronik asidin hücre proliferasyonu, dokulardaki su dengesinin sağlanması ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesi gibi çok sayıda görevleri bulunmaktadır (Jiang ve ark., 2011).

Fibrinolizin (Stafilokinaz)

Stafilokinaz lizojenik stafilokok suşları tarafından geç üreme fazında üretilen 15,5 kDa ağırlığında ve 136 aminoasitten oluşan hücre dışı bir proteindir (Parry ve ark., 1998). Stafilokinaz fibrin pıhtılarını parçalayarak plazminojeni plazmine aktive eder. Stafilokinazın virülans faktörü olarak rolü plazminojen ve defensinlere olan etkileşiminden kaynaklanmaktadır. Stafilokinaz enzimi bakterisidal etkili bir protein olan α -defensinler ile plazminojenlere bağlanarak konakçı dokuda bakteri istilasını arttırmaktadır (Bokarewa ve ark., 2006).

Lipaz

Lipaz *S. aureus* suşlarının tümü ve koagulaz negatif stafilocokların üçte biri tarafından üretilen bir enzimdir. Bu enzim lipitleri hidrolize eder. Lipaz vücutta yağdan zengin bölgelerde (deri, yağ bezi, kıl folikülü) bulunan stafilocokların canlılığının devam ettirilmesi ve dokulara yayılmalarını kolaylaştırır (Murray ve ark., 2005).

Deoksiribonükleaz (DNase)

Deoksiribonükleaz nükleik asitleri parçalayan ekstraselüler olarak sentezlenen termostabil özelliğe sahip bir enzimdir. DNA'yı hidrolize eden DNase enzimi *S. aureus* izolatlarının %90-96'sında bulunur. *S. aureus*, *S. schleiferi*, *S. intermedius* ve *S. hyicus* suşları yüksek düzeyde, *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. carnosus* suşları ise çok zayıf düzeyde DNase aktivitesine sahiptirler (Alen ve ark., 2006).

Isıya Dayanıklı Nükleaz (TNase)

TNase, DNA ve RNA'yı parçalayan ısıya dayanıklı bir enzimdir. Koagulaz pozitif stafilocokların %98'i TNase üretmektedir. TNase nükleaz (*nuc*) geni tarafından kodlanır ve DNA'yı nükleotidlere parçalar. TNase enzimi 30 dakika kaynatmaya dirençlidir. TNase aktivitesi *S. aureus*, *S. schleiferi*, *S. intermedius* ve *S. hyicus* suşlarında yüksek, *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. carnosus* suşlarında ise düşük düzeydedir. *S. aureus* suşlarının TNase aktivitesini diğerlerinden ayırt etmek için PCR ile *nuc* geni varlığı ve seroinhibitör testleri kullanılır (Murray ve ark., 2005; Erol, 2007).

Beta-Laktamaz (Penisilinaz)

Stafilocoklarda penisilinin beta laktam halkasını parçalayarak penisiline dirençliliği sağlayan bir enzimdir. Penisilinaz enzimi, penisilin grubu antibiyotiklerin yapısını bozarak bakterilerin hücre duvarı sentezini inhibe eden beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı dirençli hale gelmesine neden olan bir enzimdir. Beta-laktamaz enzimini kodlayan direnç genleri plazmidler ve transpozonlar aracılığıyla diğer suşlara aktarılır (Murray ve ark., 2005).

2.5.3. Toksinler

İnsan ve hayvanlarda önemli bir patojen olan *S. aureus* suşları hafif lokalize cilt enfeksiyonlarından hayatı tehdit eden sistemik enfeksiyonlara kadar değişen çeşitli hastalıklara neden olan çeşitli toksinler üretirler. Bu toksinler arasında sitolitik toksin

(sitotoksin), Panton-Valentin Lökosidin (PVL), toksik şok sendromu toksini-1 (TSST-1), eksfoliyatif toksin (ETs) ve enterotoksinler yer almaktadır (Murray ve ark., 2005).

Sitotoksinler

Alfa Hemolizin (Alfa Toksin)

Alfa hemolizin (α -toksin) eritrosit, polimorfonükleer lökosit, trombosit ve fibroblast gibi birçok hücre üzerinde sitolitik etkiye sahip 33 kDa molekül ağırlığında bir ekzotoksindir (Joklik ve ark., 1992). En güçlü membran hasar proteini ve en önemli hemolizindir. Alfa hemolizin bakteriyel kromozomlar veya plazmidler tarafından kodlanır. Hücre membranına bağlanarak membran üzerinde litik etki oluşturur. Alfa hemolizin hemolitik, dermonekrotik ve letal etkilere sahiptir. Alfa toksin Panton-Valentin Lökosidin (PVL)'den farklı olarak nötrofilleri lize etmeden özellikle makrofaj ve lenfosit gibi diğer bağışıklık hücrelerini parçalar. (Murray ve ark., 2002; Moreillon ve ark., 2005).

Beta-Hemolizin (Beta Toksin)

Beta-hemolizin (β -hemolizin veya sfingomiyelinaz C) 35 kDa molekül ağırlığında, ısıya duyarlı bir proteindir. Beta hemolizin en iyi koyun eritrositlerine etki etmekle beraber insan eritrositlerinde orta dereceli toksisiteye sahiptir. Beta hemolizinin en önemli özelliği sıcak-soğuk lizis yapabilmesi, dermonekrotik etkisinin olmaması ve düşük ısılarda lizis özelliğinin daha da artmasıdır. Alfa hemolizinle birlikte stafilokok enfeksiyonlarında abse oluşumu ve doku hasarından sorumludur (Joklik ve ark., 1992; Bannerman, 2003).

Gama (γ) Hemolizin ve Panton-Valentin Lökosidin (PVL)

Stafilokokal lökosidinler konakçı hücre plazma membranına zarar veren iki bileşenli gözenek oluşturan toksinlerdir (Alonzo ve Torres, 2014). *S. aureus* klinik izolatlarının tamamına yakın tarafından Gama (γ) hemolizin AB ve CB (HlgAB ve HlgCB) salgılanır (Spaan ve ark., 2014). Gama (γ) hemolizinin molekül ağırlığı 32 ile 35 kDa arasında değişmektedir. Gama (γ) hemolizin lökotoksik özelliğe sahip olup tavşan, koyun ve insan eritrositlerini lize eder (Murray ve ark., 2002).

Panton-Valentine Lökosidin (PVL) *S. aureus* tarafından üretilen deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarından sorumlu iki komponentli bir ekzotoksindir. Bu toksin *LukF-PV* ve *LukS-PV* genleri tarafından kodlanır (Bannerman, 2003). PVL nötrofillerin

yüzeyinde bulunan C5aR ve C5L2 kompleman reseptörlerine bağlanarak büyük çaplı gözenekler oluşturur (Spaan ve ark., 2013). İnsan ve tavşan polimorfonükleer hücreleri ve makrofajlar üzerinde lökotosik etkiye sahiptir (Murray ve ark., 2002).

Delta Hemolizin (Delta Toksin)

Delta (δ) hemolizin *hld* geni tarafından kodlanan 26 aminoasitlik bir peptittir (Wiseman, 1975). Delta (δ) toksininin bölünebilir bir sinyal sekansı yoktur ve salgı mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Delta (δ) toksin için yapısal gen, alfa (α) toksin, enterotoksinler ve toksik şok sendromu toksini gibi birçok virülans faktörünün transkripsiyonunu aktive eden RNA molekülü (RNAIII) içinde kodlanır (Dinges ve ark., 2000). Delta hemolizin *S. aureus* suşlarının % 97'si tarafından çeşitli memeli hücreleri ile sferoplastlar ve protoplastlar gibi bazı alt yapı hücreler tarafından üretilmektedir. *S. aureus*'un önemli bir virülans faktörü olan delta toksin kırmızı ve beyaz kan hücrelerinde sitolizise neden olmaktadır (Bhakoo ve ark., 1982).

Eksfoliyatif Toksin (ETs)

Eksfoliyatif toksin veziküler ve eksfoliyatif deri lezyonlarından sorumlu epidermolitik özellikte 30 kDa ağırlığında bir proteindir (Melish ve Glasgow, 1970). İnsan ve hayvanlardan izole edilen *S. aureus* izolatlarında farklı özellikte 4 tip eksfoliyatif toksin tespit edilmiştir. İnsanlardan izole edilen *S. aureus* suşları ağırlıklı olarak Eksfoliyatif toksin A (ETA) (% 1,5) ve Eksfoliyatif toksin B (ETB) (% 0,5) olmak üzere iki tip toksin üretirler. Her iki toksinin de virülans faktörleri yardımcı gen düzenleyici *agr* (accessory gene regulatory system) sistem tarafından kodlanır. Diğer bir toksin olan Eksfoliyatif toksin D (ETD) virülans faktörleri kodlayan kromozomal bölgede (patogenity island) bulunan 9.0 kb'lık bir gen tarafından kodlanır. ETA ve ETB'ye göre daha az tespit edilmektedir (Becker ve ark., 2003). Eksfoliyatif toksin C (ETC) ise atlarda flegmon (bağ doku iltihabı) olgularında izole edilen *S. aureus* izolatlarında tespit edilmiştir (Sato ve ark., 1994).

Eksfoliyatif toksinler (epidermolitik toksinler) insanlarda Stafilokokal Haşlanmış Deri Sendromu (SSSS) adı ile bilinen hastalık tablosuna neden olmaktadır. Ritter Hastalığı olarak da bilinen bu hastalık öncelikle cilt soyulması ile karakterizedir (Cribier ve ark., 1994). Hastalık erken dönemde ateş, halsizlik, uyuşukluk ve yetersiz beslenme ile kendini gösterir. İlerleyen vakalarda geniş, ince, içi sıvı dolu kabarcıklar

oluşturur. Oluşan bu kabarcıklar hafif mekanik bir etki ile patlar ve vücuttan epiderminin koruyucu katmanları olmadan atılır. SSSS vücudun birçok bölgesini etkiler ve lezyonlar genelde sterildir (Ladhani ve ark., 1999).

Toksik Şok Sendromu Toksin-1 (TSST-1)

Toksik Şok Sendromu Toksin-1 (TSST-1), molekül ağırlığı 22 kDa olan tek zincirli bir protein olan, proteolitik enzimlere ve sıcaklığa dirençli bir süperantijendir. TSST-1 tipi toksin IL-1, IL-2, TNF- α ve diğer sitokinlerin salınımını stimüle ederek toksik şok sendromuna neden olmaktadır (Wilson ve ark., 2011). TSST-1 düşük konsantrasyonlarda endotelial hücrelerde sızıntıya neden olurken, yüksek konsantrasyonlarda hücrelere sitotoksik etki göstermektedir (Dinges ve ark., 2000). Toksik şok sendromu bireylerde ateş, deride yaygın kırmızı döküntüler ciddi hipotansiyon, diyare, mental konfüzyon ve böbrek yetmezliği ile karakterize semptomlara neden olmaktadır (Alen ve ark., 2006). Koagülaz negatif stafilokokların da TSST-1 üretebildikleri ve toksik şok sendromuna neden oldukları bildirilmiştir (Crass ve Bergdoll, 1986).

Stafilokokal Enterotoksinler

Stafilokokal enterotoksinler (SE), 20'den fazla farklı stafilokok ve streptokok ekzotoksin ailesine ait yaklaşık 220-240 amino asitten oluşan ve 25-30 kDa' molekül ağırlığına sahip bazik proteinlerdir (Schlievert ve Case, 2007).

Enterotoksin (SE) ve enterotoksin benzeri proteinler (SE/s), küresel yapıda tek polipeptitten oluşurlar. SE'ler profaj, plazmid veya kromozomal patojenite adalarında kodlanırlar (Betley ve Mekalanos, 1985). SE'lerin özellikleri arasında (i) primatlarda kusma ve mide-bağırsak iltihabına neden olma, (ii) sitokin salınımı ve sistemik şoku takiben spesifik olmayan T lenfosit aktivasyonu ile süperantijenite özelliği, (iii) pepsin tarafından sindirilmeye ve ısıya karşı direnç yer almaktadır (Dinges ve ark., 2000; Papageorgiou ve Acharya, 2000).

Enterotoksinler, kimyasal ve antijenik özelliklerine göre alfabetik olarak adlandırılırlar. Stafilokokal enterotoksinler klasik olarak tanımlanmış toksinler (SEs) ve stafilokokal enterotoksin benzeri toksinler (SE/s) olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar. Stafilokokal gıda zehirlenmelerinden sorumlu ve klasik olarak serotiplendirilen toksinler arasında SEA, SEB, SEC (SEC₁, SEC₂, SEC₃, SEC koyun ve SEC sığır

varyantları) SED ve SEE tipleri yer almaktadır (Bergdoll ve ark., 1959; Casman ve ark., 1967). Gıda zehirlenme vakalarında en sık izole edilen enterotoksinlere ait bazı özellikler Tablo 6’da belirtilmiştir.

Tablo 6. Klasik olarak tanımlanmış stafilokokal enterotoksinlerin genel özellikleri

Toksin	Moleküler Kütle (kDa)	Emetik Aktivite	Gen	Kaynak
SEA	27,100	+	<i>sea</i>	Betley ve Mekalanos (1985), Borst ve Betley (1994),
SEB	28,336	+	<i>seb</i>	Altboum ve ark. (1985), Shalita ve ark. (1977),
SEC ₁₋₃	~27,500	+	<i>sec</i>	Altboum ve ark. (1985), Bergdoll ve ark. (1965), Hovde ve ark. (1990),
SED	26,360	+	<i>sed</i>	Bayles ve Iandolo (1989), Casman ve ark. (1967),
SEE	26,424	+	<i>see</i>	Bergdoll ve ark. (1971), Couch ve ark. (1988),

Stafilokokal gıda intoksikasyonlarının %95’i klasik enterotoksinler, geri kalan kısmı ise sonradan tanımlanan SE’ler tarafından meydana gelmektedir. Yeni tip SE’lerin gıda zehirlenmelerindeki rolü henüz kesinlik kazanmamıştır. Bazı enterotoksinler emetik aktivite göstermezken, bazıları ise halen test edilmektedir. Enterotoksinlerin isimleri bazı kaynaklarda stafilokokal benzeri enterotoksin Staphylococcal enterotoxin-like (SEIs) olarak da geçmektedir (Lina ve ark., 2004; Vernozy-Rosand ve ark., 2004). Son yıllarda yapılan çalışmalar ile klasik olarak tanımlanan toksinler dışında SEs (SEG, SEH, SEI, SER, SES, SET) gibi enterotoksinler ile SEIs (SE/J, SE/K, SE/L, SE/M, SE/N, SE/O, SE/P, SE/Q, SE/U, SE/U2, SE/V ve SE/X) gibi enterotoksin benzeri toksinlerin serotiplendirilmesi sonucu 23 farklı enterotoksinin identifiye edildiği bildirilmiştir (Jarraud ve ark., 2001; Thomas ve ark., 2006; Schelin ve ark., 2011).

Bazı *S. aureus* izolatları, enterotoksin türlerinin bir veya birkaçını aynı anda üretebilmektedir. *S. aureus*’ların dışında bazı stafilok türlerinin de (*S. haemolyticus*, *S. conhii*, *S. xylosus*, *S. equorum*, *S. lentus*, *S. capitis*, *S. intermedius*) enterotoksin oluşturduğu bildirilmiştir. Gıda kaynaklı intoksikasyonlara SEA ve SED’nin sıklıkla, SEC’nin kısmen, SEB ve SEE’nin ise nadiren neden olduğu bildirilmektedir. SEA ve

SED tipi toksinlere sıklıkla rastlanmasının nedeninin bu toksinlerin insan kaynaklı olması ve SEA'nın olumsuz koşullar altında (pH, aw, Eh) oluşturulabilmesinden kaynaklanmaktadır (Erol, 2007).

Stafilokokal Enterotoksin A (SEA)

Stafilokokal enterotoksinler içerisinde en sık rastlanan SEA tipi toksindir. Bu toksin ilk olarak 1966 yılında Bergdoll ve arkadaşları tarafından gıda zehirlenmesi vakasından izole edilmiştir (Chu ve ark., 1966). SEA yaklaşık 27 kDa molekül ağırlığa sahiptir. 771 baz çifti ve 257 aminoasit zincirinden oluşur. SEA bakteriyofaj tarafından taşınan *entA* geni tarafından kodlanır (Huang ve Bergdoll, 1970). SED ve SEE tipi toksinler ile %70-90 , SEB, SEC ve TSST-1 tipi toksinler ile %40-60 oranında sekans benzerliği gösterir (Schlievert ve ark., 1995).

Stafilokokal Enterotoksin B (SEB)

Stafilokokal Enterotoksin B (SEB) 239 aminoasitten oluşur ve 28 kDa'lık bir molekül ağırlığa sahiptir. SEB çok karmaşık üçüncül yapıya sahip iki farklı kompakt alana (geniş ve dar) sahiptir (Swaminathan ve ark., 1992). Bu kompakt yapı SEB'nin, bağırsak lümeninde bulunan tripsin, kimotripsin ve papain gibi proteazlara karşı oldukça dirençli olmasını sağlar. SEB suda kolaylıkla çözünür, sıcaklık değişimlerine karşı dayanıklıdır. Kaynama derecesinde (100°C) birkaç dakika dayanabilir (Bergdoll, 1983). SEB, gıda zehirlenmelerinin yanı sıra savaş ve terörizm için potansiyel bir biyolojik silah olarak da kabul edilmektedir (Greenfield ve ark., 2002).

Stafilokokal Enterotoksin C (SEC)

C tipi stafilokok enterotoksinleri (SEC'ler), antijenik özelliklere sahip oldukça korunmuş protein gruplarıdır (Bergdoll ve ark., 1965). SEC antijenik olarak SEC1, SEC2 ve SEC3 (SEC koyun ve SEC sığır varyantları) olmak üzere üç alt tipe ayrılır. SEC3, SEC2 tipi toksinden dört, SEC1 tipi toksinden ise dokuz aminoasitlik fark ile ayrılır. *entC3* geni 801 baz çifti içerir ve 267 aminoasitten oluşan prekürsor (öncü) protein tarafından kodlanmaktadır. *entC3* geni *entC1* geni ile %98 oranında nükleotid sekans benzerliği gösterir (Hovde ve ark., 1990). SEC koyun, keçi ve sığırlarda, mastitisli sütlerden izole edilen *S. aureus*'larda baskın toksin türü olarak bildirilmiştir (Scherrer ve ark., 2004).

Stafilokokal Enterotoksin D (SED)

Stafilokokal Enterotoksin D (SED) gıda kaynaklı intoksikasyonlarda sıklıkla izole edilen ikinci enterotoksin tipidir. SED'yi kodlayan gen 27,6 kb'lık penisilinaz plazmidi üzerinde lokalize olan *entD* genidir. SED'nin nükleotid dizisi prototip plazmid pIB485 tarafından belirlenmektedir. Bu enterotoksinin sentezi *S. aureus*'un yardımcı gen düzenleyici sistemi (*agr*) tarafından düzenlenir (Bayles ve Iandolo, 1989). SED süperantijeni, Zn^{+2} varlığında MHC sınıf II molekülüne yüksek affinite göstererek bağlanır ve SED ile Zn^{+2} ile kristalize olur (Sundström ve ark., 1996).

Stafilokokal Enterotoksin E (SEE)

Stafilokokal Enterotoksin E (SEE) 29 kDa molekül ağırlığında, 771 baz çifti ve 257 aminoasitden oluşan *entE* geni tarafından kodlananan bir enterotoksindir. DNA dizi kimliği, SEE'nin SED ve SEA ile yakın ilişkili olduğunu göstermektedir. *entE* ve *entA* geni birbirleri ile yüksek düzeyde (%84) sekans homolojisi göstermektedir (Lee ve ark., 1978). SEE stafilokokal gıda intoksikasyonlarında nadiren izole edilmektedir (Balaban ve Rasooly, 2000).

2.6. *S. aureus*'un Epidemiyolojik Özellikleri

Stafilokoklar tüm dünyada hastane ve toplum kaynaklı infeksiyonların en önemli etkenlerinden biridir (Schneewind ve Missiakas, 2009). Nazal *S. aureus* taşıyıcılığı toplumsal ve hastane kökenli sporadik enfeksiyonların ve epidemilerin gelişmesinde önemli rol oynamaktadır (Eriksen ve ark., 1994). Sağlıklı bireylerde mevsimsel ve epidemiyolojik faktörlere bağlı olarak nazal *S. aureus* taşıyıcılığı prevalansının ortalama %37 olarak bildirilmiştir (Kluytmans ve ark., 1997). Hastane çalışanlarında ise nazal taşıyıcılık oranı %40-50'ye kadar çıkabilmektedir (Wertheim ve ark., 2005). 2013 yılında AB ülkeleri içinde nazal taşıyıcılık oranı en düşük %12 ile Macaristan'da, en yüksek %29 ile İsveç'te olduğu bildirilmiştir (den Heijer ve ark., 2013).

Nazal taşıyıcılar gıdaların *S. aureus* ile kontaminasyonunda önemli bir risk faktörü olup özellikle yetersiz ve uygun olmayan personel hijyenine bağlı olarak şekillenen stafilokokal intoksikasyonlara sıklıkla rastlanılmaktadır. Bursa ilinde gıda sanayinde çalışan işçilerde nazal *S.aureus* taşıyıcılığını belirlemek için yapılan çalışmada, incelenen 1115 kişinin 169'unda burun mukozasında *S. aureus*'un pozitif olduğu saptanmıştır. Bulunan izolatların 29'unun (%17,2) MRSA pozitif, 21'inin

(%12,4) ise enterotoksijenik olduğu bildirilmiştir. Çalışma sonunda gıda sanayinde çalışan işçilerde nazal *S. aureus* taşıyıcılığının %15,2 ve nazal MRSA taşıyıcılığının ise %2,6 olduğu bildirilmiştir (Pala ve ark., 2010).

Stafilokokal gıda zehirlenmeleri, dünya genelinde en yaygın gıda kaynaklı hastalıklardan biridir. Stafilokokal intoksikasyon ve infeksiyonlar genellikle hafif seyirli ve kısa inkübasyon süresine sahiptir (Normanno ve ark., 2005; Seo ve Bohach, 2007). Amerika Birleşik Devletleri'nde 1983-1987 yılları arasında meydana gelen bakteriyel gıda zehirlenmesi olgularının %7,8'ine stafilokok türlerinin neden olduğu bildirilmiştir (Adams ve Moss, 2008). Amerika Birleşik Devletleri'nde 2008-2015 yılları arasında CDC (Hastalık Kontrol Merkezi) tarafından bildirilen verilere göre 122 adet stafilokokal gıda zehirlenmesi salgını olduğu, bu salgınlardan 2.693 kişinin etkilendiği, 146 kişinin hastaneye kaldırıldığı ve 1 kişinin öldüğü bildirilmiştir Stafilokokal gıda zehirlenme salgınlarına ilk sırada et ve et ürünlerinin (%41,3) neden olduğu, daha sonra süt ürünleri (%4,13) ve deniz ürünlerinin (%4,13) geldiği bildirilmiştir (Tablo 7) (CDC, 2016)

Tablo 7. CDC tarafından 2008-2015 yılları arasında bildirilen stafilokokal kaynaklı gıda zehirlenme salgınları (CDC, 2016)

Gıda Kaynağı	Salgın Sayısı (%)
Et (Toplam)	50 (%41,3)
Kırmızı et (Jambon, Pirzola, Biftek)	18 (%14,8)
Tavuk	14 (%11,5)
Hindi	7 (%5,7)
Domuz	11 (%9,1)
Süt ürünleri	5 (%4,13)
Deniz ürünleri	5 (%4,13)
Pirinç	7 (%5,73)
Salata	4 (%3,3)
Yumurta	3(%2,4)

Kanada'da 2007-2010 yılları arasında gıda kaynaklı salgınlardan toplanan gıda örneklerinin %10,5'inin *S. aureus* içerdiği belirlenmiştir. Pozitif örneklerin %65'inin et ve et içeren hazır gıdalar, %15'inin et içermeyen hazır gıdalar ve %14'ünün ise süt ürünleri olduğu bildirilmiştir (Crago ve ark., 2012).

2014 yılında EFSA tarafından yayınlanan rapora göre AB ülkelerinde tespit edilen gıda kaynaklı zehirlenme ve salgınlar içinde en yaygın zehirlenme olgularının %20 ile bakteriyel toksinler (*Bacillus* spp., *Clostridium* spp. ve *Staphylococcus* spp.) ile kontamine peynirin sorumlu olduğu, bunu %31,4 ile diğer gıdaların izlediği bildirilmiştir. Bu salgınların gıdaların depolanma koşulları, sıcaklık ihlalleri, yetersiz soğutma, yetersiz ısıtma uygulaması, gıda işleme görevli kontamine personel gibi sebeplerle şekillenmiş olabileceği belirtilmiştir (EFSA, 2014).

2015 yılında EFSA tarafından yayınlanan rapora göre AB ülkeleri gıda zehirlenme salgınları Tablo 8'de gösterilmiştir. Buna göre gıda zehirlenmeleri içinde 953 vaka ile *Salmonella* spp. kaynaklı salgınların birinci sırada yer aldığı, bunu 849 vaka ile bakteriyel toksinlerin (*Bacillus* spp., *Clostridium* spp. ve *Staphylococcus* spp.) izlediği bildirilmiştir (EFSA, 2015).

Tablo 8. AB ülkelerinde 2015 yılında bildirilen gıda zehirlenme salgınları (EFSA, 2015)

Etken Ajanlar	Salgın Sayısı		Kesin Kanıtlı Salgınlar		Zayıf Kanıtlı Salgınlar	
	n	%	n	%	n	%
<i>Salmonella</i> spp.	953	21,8	184	43,6	769	19,5
Bakteriyel toksinler	849	19,4	102	24,1	747	18,9
Virüsler	401	9,1	45	10,6	356	9,0
<i>Campylobacter</i> spp.	387	8,8	25	5,9	362	9,1
Shiga toksin- <i>E. coli</i> (STEC)	69	1,5	6	1,4	63	1,5
Parazitler	52	1,1	12	2,8	40	1,0
Diğer bakteriyel etkenler	61	1,3	9	2,1	52	1,3
Diğer etkenler	127	2,9	25	5,9	102	2,5
Bilinmeyen	1,463	33,5	14	3,3	1,449	36,7
AB toplam	4,362	100	422	100	3,940	100

Bakteriyel toksinler: *Bacillus* spp., *Clostridium* spp. ve *Staphylococcus* spp., Virüsler: *Calicivirüs*, *Flavivirüs*, *Rotavirüs*, *Adenovirüs* ve diğer tespit edilemeyen virüsler, Diğer etkenler: Mantar toksinleri, biotoksin, histamin vb., Parazitler: *Trichinella*, *Cryptosporidium*, *Giardia* ve diğer tespit edilemeyen parazitler, Diğer bakteriyel ajanlar: *Listeria*, *Brucella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Francisella* ve *Yersinia* spp., AB:Avrupa Birliği; n: salgın sayısı

AB ülkelerinde 2015 yılında gıda kaynaklı zehirlenme olgularında toplam 4,362 vaka tespit edildiği bu oranın 2014 yılına göre %17 oranında azaldığı bildirilmiştir. 2015 yılında gıda ve su kaynaklı salgınlarda ilk sırayı bakteriyel ajanların

aldığı (tüm salgınların %33,7'si), bunu bakteriyel toksinlerin (tüm salgınların %19,5) izlediği bildirilmiştir. 2015 yılında AB ülkelerinde stafilocokal enterotoksin (SE) kaynaklı 412 adet gıda zehirlenme vakasının meydana geldiği ve enterotoksin kaynaklı gıda zehirlenmelerinde ilk sırayı %22 ile et ve et ürünlerinin aldığı bildirilmiştir (Tablo 9) (EFSA, 2015).

Tablo 9. 2015 yılında AB ülkelerinde bildirilen stafilocokal enterotoksin kaynaklı gıda zehirlenme salgınları (EFSA, 2015)

Gıda Kaynağı	Salgın Sayısı (%)
Et (Toplam)	91 (%22)
Kırmızı et	68 (%16,5)
Tavuk eti	23 (%5,5)
Süt	3 (%0,7)
Peynir	15 (% 3,6)
Süt ürünleri (peynir hariç)	4(%0,9)
Deniz ürünleri	31 (%7,5)
Sebze ve meyve suları	18 (%4,3)

Amerika Birleşik Devletleri'nde 1998-2015 yılları arasında CDC verilerine göre, 373.531 insanın etkilendiği, 343 kişinin öldüğü toplam 19.119 besin zehirlenmesinin meydana geldiği bildirilmiştir. Bu zehirlenmelerin 649'unun (%3) *Staphylococcus* spp. bakterisi ve toksinleri tarafından oluştuğu bildirilmiştir (CDC, 2016). ABD'nde *S. aureus* kaynaklı gıda zehirlenme vakalarının yılda yaklaşık 241.000 hastalık oluşturduğu, ancak *S. aureus*'un neden olduğu sporadik gıda kaynaklı hastalığın rapor edilememesi nedeniyle, gıda zehirlenme olgularının gerçek insidansının çok daha üstünde olabileceği belirtilmektedir (Bennett ve ark., 2013).

2.7. *S. aureus*'un Gıdalarda Bulunuşu ve Kontaminasyon Kaynakları

S. aureus havada, toprakta ve suda bulunabilen (ubiquiter özellikte) bir mikroorganizmadır. İnsanlar, hayvanlar, gıdalar ve gıda işletmeleri başlıca bulaşma kaynaklarını oluşturmaktadır (Eriksen ve ark., 1994). *S. aureus* doğal olarak insanların deri florası, burun ve üst solunum yolları, bazen de vajen, rektum ve perineal bölgede kolonize olmaktadır. *S. aureus* cilt yüzeyinde ve nazofarinkste taşındığından bakterinin

yayılımı kolay olmakta ve bu nedenle de birçok hastane enfeksiyona neden olmaktadır (Wertheim ve ark., 2005).

S. aureus sığır mastitislerinin en önemli etkenlerinden birisidir. Başlıca meme, meme lobları ve meme başı derisine yerleşip meme hijyeninin yetersizliğine bağlı olarak çiğ sütte başlıca kontaminasyon kaynağını oluşturmaktadır. Bununla birlikte diğer kontaminasyon kaynakları arasında sağım sırasında kullanılan araç ve gereçler, barınak malzemeleri, yemler, hava, ahırda bulunan diğer hayvan türleri ve bakıcılar yer almaktadır (Larsen ve ark., 2000; Zadoks ve ark., 2002).

Çiftlik, mezbaha, mandıra ve perakende üretim yapılan yerler *S. aureus*'un potansiyel kontaminasyon kaynaklarını oluşturmaktadır. Gıda işletmelerinde dezenfeksiyonun yetersiz yapılmasına bağlı alet ve ekipmandan kaynaklanan sekonder kontaminasyonlar oldukça önemli yer tutmaktadır. Bunların başında iyi temizlenmemiş ve dezenfekte edilmemiş sağım ekipmanları gelmektedir. Sağım malzemelerinde kalan süt kalıntı ve artıkları mikroorganizmalar için mükemmel bir besiyeridir. Sağımlar arası periyotlarda mikroorganizmaların sayısı hızla artarak sütü enfekte etmektedir (Karakuş, 1995). Kontamine süt ve süt ürünleri stafilokokal intoksikasyonlarda ilk sırada yer almaktadır. Özellikle mastitisli veya subklinik mastitisli hayvanlardan sağlanan sütlerin normal sütlere karıştırılması, sütün pastörizasyon öncesi ve sonrası kontaminasyonu ve uygun olmayan koşullarda muhafaza edilmesi, gıda zehirlenme olgularına neden olmaktadır (Erol, 2007).

Gıda işleyicileri *S. aureus* suşlarını burun veya ellerinde taşıyarak veya solunum salgıları ile gıdalara bulaştırarak kontaminasyona neden olmaktadır (Kluytmans ve Wertheim, 2005). *S. aureus* çiğ gıdalardaki mikrobiyal flora ile yeteri kadar rekabet gücüne sahip değildir. Pişmiş gıdaların çapraz kontaminasyonu ve uygun olmayan koşullarda depolanmasına bağlı olarak enfeksiyon şekillenmektedir. Stafilokokal gıda zehirlenmelerinde sorumlu gıdalar arasında et ve et ürünleri, kümes hayvanları ve yumurta ürünleri, süt ve süt ürünleri, salatalar, fırıncılık ürünleri özellikle krema içeren hamur işleri ve sandviçler yer almaktadır (Wieneke ve ark., 1993; Tamarapu ve ark., 2001). Tuzlu gıdaların *S. aureus* ile kontamine olması bakterinin düşük su aktivitesi (aw 0.86) değerlerinde gelişebilmesi ile açıklanmaktadır (Qi ve Miller, 2000).

Stafilokokların neden olduğu intoksikasyonlar tüketilen gıda çeşitliliğine ve ülkelerin tüketim alışkanlıklarına bağlı olarak göre farklılık göstermektedir. 2010-2014 yılları arasında stafilokokal gıda zehirlenmelerinde salgın sayısı 274'den 393'e yükselmiş ve en sık izole edilen gıdalar arasında karışık gıda (%29,7), et ve et ürünleri (%20,8), peynir ve süt ürünleri (%14,4), ekmek ürünleri (%8,4), balık ve balık ürünlerinin (%6,5) yer aldığı bildirilmiştir (EFSA 2010; EFSA 2011; EFSA 2012; EFSA 2013; EFSA 2014).

2.7.1. Manda Sütü ve Ürünlerinin Özellikleri

Mandalar sazlık ve bataklık gibi ağır çevre koşullarına uyumlu, hastalıklara karşı dayanıklı, et, süt, deri ve iş gücünden faydalanılan hayvanlardır. Mandalar selülozca zengin, düşük kaliteli ve ucuz kaba yemleri tüketerek bunları ürüne dönüştürdüklerinden ekstansif yetiştiricilik için oldukça uygun hayvanlardır (Şekerden, 2001; Soysal, 2009). Türkiye'de manda yetiştiriciliği başta Karadeniz Bölgesi (örn. Samsun, Çorum, Amasya, Tokat, ve Sinop) olmak üzere Ege (örn. Afyon) ve Marmara Bölgesinde (örn. İstanbul) küçük, orta ve büyük ölçekli işletmelerde yaygın olarak yapılmaktadır (Şahin ve ark., 2012).

Dünya'da toplam manda varlığı 2010 yılında 188 milyon baş iken 2014 yılına gelindiğinde %4 artış göstererek yaklaşık 195 milyon başa ulaşmıştır (FAO, 2014). Dünya manda popülasyonunun %83,5'i güneydoğu Asya ülkelerinde (Hindistan, Pakistan ve Çin) bulunmaktadır. İtalya dünya manda popülasyonunun %0,2'si ile Avrupa'da en çok manda bulunan ülkedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde en çok manda dünya manda popülasyonunun %1,9'u ile Brezilya'da bulunmaktadır (Borghese ve Mazzi, 2005).

Türkiye'de manda varlığı 1990 yılında 371 bin baş iken, 2010 yılına gelindiğinde %77 oranında azalarak 84,7 bin başa düşmüştür (Tablo 10). Son yıllarda özellikle Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından yapılan anaç manda desteklemeleri ve "Halk elinde manda islahı projesi" gibi müdahaleler ile manda sayısında artış şekillenmiştir. Bu düzenlemeler sonunda Türkiye'de manda varlığı 2012 yılında 107,4 bin iken, 2016 yılında 142 bin başa yükselerek dünya manda popülasyonunun %0,04'ünü oluşturmuştur (TÜİK, 2016).

Samsun ilindeki manda varlığı 2000 yılında 19 bin baş iken manda sayısındaki azalmaya paralel olarak 2007 yılında yaklaşık %53 azalarak 9 bin başa düşmüştür. Samsun ili 2016 yılı itibarı ile 8.871 bini sağılır anaç manda olmak üzere toplamda 17.944 baş manda varlığı ile Türkiye’de en çok manda popülasyonuna sahip il konumuna gelmiştir (TÜİK, 2016). Samsun ilinde küçük, orta ve büyük ölçekli manda işletme sayısı 1.512 olarak tespit edilmiştir (Anon, 2015).

Tablo 10. Türkiye ve dünyada toplam ve sağılan manda sayısı (FAO, 2014)

Yıllar	Türkiye Toplam (bin baş)	Türkiye Sağılan (bin baş)	Dünya Toplam (milyon baş)	Dünya Sağılan (milyon baş)
2010	84,7	35,3	188,1	58,5
2011	97,6	40,2	190,3	58,9
2012	107,4	47,5	192,2	60,4
2013	117,5	51,9	193,0	61,2
2014	121,8	53,7	194,4	61,6

Dünya manda sütü üretimi 2010 yılında 92 milyon ton iken 2014 yılına gelindiğinde yaklaşık %12’lik artışla 114 milyon tona ulaşmıştır. Dünyada manda sütünün %90’ı Hindistan ve Pakistan’da üretilmekte, daha sonra Mısır, Çin, İran ve İtalya gelmektedir (FAO, 2014). AB ülkelerinde 2010 yılında 185 bin ton olan toplam manda sütü üretimi, 2014 yılında 203 bin tona ulaşmıştır (Tablo 11) (FAO, 2014). Türkiye’de manda sütü üretimi son yıllarda hayvan varlığındaki artışa paralel olarak yükselmiştir. 2010 yılında 35 bin ton olan manda sütü üretimi, 2012 yılında yaklaşık %50 oranında artarak 47 bin tona, 2015 yılında ise yaklaşık 63 bin tona ulaşmıştır. Samsun ili 2016 yılında toplam 8.871 sağılır mandadan elde edilen 8.781 ton süt ile Türkiye’de manda sütü üretiminde ilk sırada yer almaktadır (TÜİK, 2016).

Tablo 11. Türkiye, Avrupa Birliği (AB) ve dünyada yıllara göre manda sütü üretimi (ton) (FAO, 2014)

Ülkeler	2010	2011	2012	2013	2014
Türkiye	35.487	40.372	46.989	51.947	54.803
AB-28	185.562	201.582	200.720	203.812	203.579
Dünya	92.184.199	95.834.155	98.959.348	108.402.663	114.015.334

AB-28: Avrupa birliğine üye 28 ülke

Manda sütü protein içeriği ve süt yağı miktarı yüksek olduğu için beslenme fizyolojisi açısından değerli bir süt olarak kabul edilmektedir. Mandalar yeşil yemle aldıkları karotenin tamamını vitamin A'ya çevirme özelliğine sahiptirler. Bu nedenle sütlerinin rengi inek sütüne oranla daha beyazdır (İnal, 1990; Metin, 1996).

Manda sütü içerdiği yağ, laktoz, protein ve toplam kuru madde bakımından inek sütünden daha zengindir (Ahmad ve ark., 2008). Manda sütünün yaklaşık ortalama %17'sini kuru madde, %7-8'sini yağ, %4-4,2'sini protein, %4,7-5'ini laktoz ve %0,8'ini kl oluşturmaktadır (Tablo 12). Manda sütünün yoğunluğu 1.027-1.040 g/ml, asitliği 6.7-10 SH arasında değişmektedir (İnal, 1990; Metin, 1996). Manda sütünde kuru madde ve yağ miktarının yüksek olması ve yüksek oranda kalori içermesi nedeniyle üstün ve ayırıcı bir besin olarak değerlendirilmektedir (Soysal, 2009).

Tablo 12. Hayvan türlerine göre sütün bileşimi (%) (Oysun, 1987)

Tr	Su	KM	Protein	Yağ	Kazein	Laktoz
Manda	82,7	17,50	4,2	7,7	3,5	4,7
İnek	87,6	12,40	3,5	3,4	3,0	4,6
Koyun	83,9	18,50	5,7	7,2	4,5	4,6
Keçi	86,9	13,40	3,6	4,3	3,0	4,5

KM: Kuru madde

Manda sütünde yağsız kuru madde miktarı, albumin ve globulin, azot, kl, Ca, P, Cl ve sitrik asit inek sütüne nazaran daha yüksek, fosfolipitler ve kolesterol düzeyi ise daha düşüktür (Tablo 13) (İnal, 1990).

Tablo 13. Manda ve inek stlerinin bileşimleri (İnal, 1990)

Süt Komponentleri	Manda sütü (100ml'de g)	İnek sütü (100ml'de g)
Fosfolipidler	0.21	0.32
Kolesterol	0.04	0.15
Yağsız kurumadde	9.8	8.9
Albumin ve globülin	0.6	0.5
Azot (non protein)	0.3	0.2
Kül	0.8	0.7
Kalsiyum	0.22	0.13
Fosfor	0.1	0.09
Sitrik asit	0.22	0.17
Klor	0.07	0.1

Manda sütü düşük ısı kapasitesi ve yüksek termal iletkenlik özellikleri nedeniyle inek sütüne kıyasla arzulanan ısı etkilerini elde etmek için daha düşük miktarda ısı enerjisine ihtiyaç duymaktadır. Bu nedenle manda sütünden elde edilecek ürünlerde ısıl işlem için zaman-sıcaklık kombinasyonlarının uygun Şekilde deęiŐtirilerek standartlaŐtırılması gerekmektedir (Sindhu ve Arora, 2011).

Ülkemizde manda sütünden üretilen süt ürünleri bölgelere ve tüketim alışkanlıklarına göre değişmektedir. Genellikle manda sütünden kaymak ve peynir üretimi ön plana çıkmaktadır. Bununla birlikte manda sütü tereyağı, dondurma ve yoğurt gibi pek çok ürüne iŐlenmektedir. Ülkemizde Afyonkarahisar ilinde rulo halinde sarılarak satılan kaymak yaygın olarak üretilmektedir. Lor peyniri üretiminde manda sütünden yapılan peynir altı suyu da kullanılmaktadır. Ayrıca lkemizde Tulum (İzmir) ve örgü peynirlerinin yapımında manda sütü kullanılmaktadır (Soysal, 2009).

Dünya geneline bakıldığında manda sütü birçok ülkede farklı peynir eŐitleri üretiminde kullanılmaktadır. Manda sütünden üretilen peynirler pek çok ülkede organik ürün olarak sınıflandırılmakta ve son yıllarda üretiminde büyük artış göstermektedir. Özellikle İtalya'da manda sütünden üretilen ve pizza yapımında kullanılan Mozzarella peyniri üretimi manda sütü ürünleri içerisinde en çok üretilen ürünlerdendir (Bilal ve ark., 2006).

Manda sütü çiğ ya da pastörize edilmiş olarak; İtalya'da Mozzarella, Ricotta, Scamorza ve diğer peynirler, Mısır'da Domiati Rumi, Romanya'da Vladaesa ve Braile Peynirleri, Beyaz salamura peyniri, Hindistan'da Paneer, Channa, Yugoslavya'da Sır ız bivoljeg, Filipinler'de Kesong puti üretiminde kullanılmaktadır (nc, 2004; Moioli ve Borghese, 2005).

Çalışmada Kullanılan Geleneksel Manda Sütü rnleri

Manda Kaymağı

Kaymak süt yağının yoęunlaŐtırılmasıyla elde edilen sütten veya kremadan yapılan bir süt ürünüdür. Türk Gıda Kodeksi Krema ve Kaymak Tebliğine göre kaymak; "içerisinde en az %60 oranında süt yağı bulunan ve dıŐarıdan herhangi bir madde katılmadan özel yöntemle yapılıp Şekil verilen krema" olarak tanımlanır (Anon, 2003).

Geleneksel tarzda yapılan kaymak üretimi sırasında manda sütü sağıldıktan sonra çift katlı tülbentle süzülür. Daha sonra 3 litrelik alüminyum tavalara yarısı dolacak şekilde aktarılır. Bu tavalar 90-95°C'ye kadar sürekli dip ve kenarları tutmayacak şekilde karıştırılır. Bazı bölgelerde kabın dış bölümüne yakın kısmına aralıklı olarak su dökülerek yapışma önlenir. 3-4 saat süren bu işlemin ardından süt 10 cm derinliğinde tavalara belirli bir yükseklikten köpüklü ve gözenekli kaymak oluşumu sağlayacak şekilde dökülür. Tavalar 40°C'ye gelinceye kadar soğutulmaya bırakılır. Tavalar tekrar kısa süreli bir ısıtma ile 70°C'ye kadar tekrar ısıtılır. Daha sonra soğuk muhafazada 24 saat bekletilir. Kaymak tabakasının sertleşmesi için küçük buz parçaları serpilir ve elde edilen kaymak tabakası 4 eşit parçaya ayrılarak rulo halinde ya da her parça elle ters çevrilerek düz bir tabağa daire oluşturacak şekilde yerleştirilir ve sonra paketlenerek tüketime sunulur. Bu haliyle kaymak buzdolabında 3-5 gün niteliğini kaybetmeden saklanabilir. Kaymak altı süt ise yoğurt yapımında kullanılabilir. Genel olarak manda sütünden 1/8 oranında kaymak elde edilmektedir (Şekil 2) (Anon, 2007).

Manda Peyniri

Manda sütü çeşitli tipte peynirlerin üretiminde kullanılmaktadır. Peynirler genellikle inek sütü peynirlerine göre daha uzun süre olgunlaşma süresine gereksinim duymaktadır. Geleneksel tarzda manda peyniri yapımında süt sağılıp süzülükten sonra, oda sıcaklığında ılıması için bırakılır ve sıcaklığın 40°C'ye düşmesi sağlanır. Daha sonra peynir mayasından 10 kg süte bir çay kaşığı ölçüsünde eklenir ve karıştırılır. Yazın üzeri açık bırakılarak, kışın ise kabın üzeri sarılarak sütün sıcaklığı muhafaza edilmeye çalışılır. Bu koşullarda süt 2 saat mayalanmaya bırakılır. Mayalanma sonrası oluşan pıhtılar özel sızdırmaz torbalara konur. 10 kg manda sütünden 3 kg peynir üretilmektedir (Şekil 2) (Anon, 2007).



Şekil 2. Geleneksel yöntemle üretilmiş manda peyniri ve manda kaymağı

2.7.2. Süt ve süt ürünlerinde *S.aureus*

Çiğ süt *S. aureus* kontaminasyonunda başlıca kaynağı oluşturmaktadır. *S.aureus* sığır mastitislerinde özellikle meme lobları ve meme başı derisine yerleşip meme hijyeninin yetersizliğine bağlı olarak süt kaynaklı enfeksiyon ve intoksikasyonlara neden olmaktadır (Larsen ve ark., 2000; Zadoks ve ark., 2002).

Ülkemizde yapılan çalışmalarda süt ve süt ürünlerinde *S. aureus*'un insidensi farklılık göstermektedir. Ertaş ve ark. (2010), Kayseri yöresinden temin ettikleri 50 sütlü tatlı ve 100 koyun sütü olmak üzere toplam 150 adet süt ve süt ürünüde koagülaz pozitif stafilokok oranını %57,3 olarak bulmuşlardır. Aynı araştırmacılar *S. aureus* varlığını sütlü tatlılarda %60, koyun sütünde ise %52 olarak tespit etmişlerdir. Kav ve ark. (2011), inceledikleri 127 adet Urfa peynirinde *S. aureus* varlığını %41,7 olarak belirtmiştir. Aydın ve ark. (2011), Marmara bölgesindeki çeşitli illerde bulunan yerel marketler, perakende pazarlar ve süt çiftliklerinden temin ettikleri 1070 gıda örneği (çiğ süt, et ve et ürünleri, kaymak, tereyağı, peynir ve çeşitli unlu mamüller) üzerinde yaptıkları çalışmada, *S. aureus* insidensinin %13,8 olduğunu ve elde edilen izolatların 92'sinin (%62,6) enterotoksijenik karakterde olduğunu bildirmişlerdir. Gücükoğlu ve ark. (2012), Samsun ilinden temin ettikleri 122 adet süt ve süt ürününün 64'ünün (çiğ sütte %75, beyaz peynirde %37,5, kaşar peynirinde %30, tereyağında %30, dondurmada %10 oranında) *S. aureus* yönünden pozitif olduğunu bildirmişlerdir.

Gülmez ve ark. (2001), Kars ilindeki perakende satış yerlerinden alınan 50 adet taze ve 50 adet salamura beyaz peynir örneğini incelemişler, taze beyaz peynir örneklerinin %78, salamura beyaz peynir örneklerinin ise %30 oranında *S. aureus* ile kontamine olduğunu bildirmişlerdir. Keskin ve ark. (2006), İstanbul Üsküdar Belediyesi'ne bağlı 20 semt pazarından temin ettikleri 50 adet beyaz peynir örneğinde *S. aureus* düzeyini %66 oranıyla bulduklarını bildirmişlerdir. Yücel ve Anıl (2011), Ankara'da yaptıkları çalışmada, 190 adet çiğ süt örneğinde %35, 90 adet peynir örneğinde (kaşar, tulum ve lor peyniri) %20,2 oranlarında *S. aureus* izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Diğer ülkelerde yapılan çalışmalara bakıldığında; Andre ve ark. (2008), Brezilya'da bir süt işletmesinde yaptıkları çalışmada 24 çiğ süt, 24 Minas Frescal peynirini (Brezilya'ya özgü bir çeşit beyaz peynir) inceledikleri çalışmada peynir örneklerinin 17'sinden (%70,8) *S. aureus* izole etmişlerdir.

Fagundes ve ark. (2010), Brezilya'nın Sao Paulo bölgesinde 37 çiftlikte 37 süt tankı ve 208 çiğ sığır sütünü incelemişlerdir. Süt örneklerinden 14'ünün (%6,7), süt tanklarının ise 4'ünün (%10,8) *S. aureus* ile kontamine olduğunu, elde edilen izolatların ise %14,3'ünün enterotoksijenik karakterde olduğu tespit etmişlerdir.

Di Giannatale ve ark. (2011), İtalya'da koyun ve inek sütü kullanarak yaptıkları taze peynirlerde *S. aureus* varlığını %13,3 olarak bildirmişlerdir. Kamal ve ark. (2013), Mısır'da yerel pazar ve marketlerden topladıkları 35 adet çiğ süt örneğinin %94,3'ünde, 30 adet peynir örneğinin %93,3'ünde ve 30 adet dondurma örneğinin %56,7'sinde *S. aureus* tespit etmişlerdir.

Bianchi ve ark. (2014), İtalya'da çeşitli mandıralardan elde ettikleri 1245 örnekten (848 çiğ süt, 397 süt ürünü) 481'inin (%39) *S. aureus* ile kontamine olduğunu tespit etmişlerdir. Merz ve ark. (2016), İsviçre'de 104 adet çiftlikten elde ettikleri 162 süt örneğinde (131 adet koyun sütü, 31 adet keçi sütü) *S. aureus* prevalansını araştırmışlar, keçi sütü örneklerinin %60, koyun sütü örneklerinin ise %30 oranında *S. aureus* ile kontamine olduğunu bildirmişlerdir.

Dehkordi ve ark. (2015), İran'da 320 çiğ süt (200 sığır , 60 koyun ve 60 keçi sütü) ile 350 süt ürününde (geleneksel metodla üretilen kaymak, hamur, yoğurt, peynir, krema ve peynir altı suyu) *S. aureus* varlığını araştırmışlar; çiğ süt ve süt ürünlerinde kontaminasyon düzeyini sırasıyla %27,8 ve %24,85 olarak belirtmişlerdir. Akindolire ve ark. (2015), Güney Afrika'da 200 adet çiğ süt, pastörize süt ve süt dökme tankı örneğini inceledikleri çalışmada *S. aureus* prevalansını sırasıyla %75, %13 ve %29 olarak tespit etmişlerdir.

Ülkemizde manda sütü ve ürünlerinde yapılan çalışmalarda, Pamuk ve ark. (2012), Afyonkarahisar ilinde inceledikleri 360 örneği süt ve süt ürününde (120 manda sütü, 120 manda peyniri, 120 manda kaymağı) *S. aureus* oranını manda sütü örneklerinde %33,3, manda kaymağı ve manda peyniri örneklerinde ise sırasıyla %21,6 ve %25,8 olarak tespit etmişlerdir. Manda sütü ve ürünlerinin incelendiği bu çalışmada total *S. aureus* insidensini %26,9 olarak bildirmişlerdir. Kurt ve Özdemir (1988), Erzurum yöresinden temin ettikleri kaymak örneklerinin %50'sinin $3.10-1,6 \times 10^3$ kob/g düzeyinde *S. aureus* ile kontamine olduğunu bildirmişlerdir. Çon ve ark. (2000), Afyon ilinde üretilen kaymaklar üzerine yaptıkları çalışmada kaymaklarda *S. aureus* düzeyinin 0.60-4.20 log kob/g arasında olduğunu bildirmişlerdir. Yılsay ve Bayizit (2002), Bursa

ilinde tüketime sunulan 30 adet kaymak örneğinde yaptıkları çalışmada stafilokok sayısının 0.00-5.44 log kob/g arasında olduğunu bildirmişlerdir. Akalın ve ark. (2006), İzmir ilinde inek sütlerinden yapılan kaymaklarda *Staphylococcus* spp. düzeyinin 0-6,86 log kob/g arasında olduğunu bildirmişlerdir.

Çeşitli ülkelerde manda sütleri üzerinde yapılan çalışmalarda; Singh ve Prakash (2010), Hindistan'da inceledikleri 52 manda sütü örneğinde *S. aureus* insidensini %28,84 olarak tespit etmişlerdir. Rahimi ve Alian (2013), İran'da 40 manda sütü örneğinde *S. aureus* insidensini %17,5, Abo-Shama (2014), ise Mısır'da 140 adet manda sütü örneğinde *S. aureus* insidensini %30 olarak tespit etmişlerdir. Sangeetha ve ark. (2014), Hindistan'da 50 adet süt örneğinde *S. aureus* prevalansını belirlemek için yaptığı çalışmada 25 çiğ manda sütü örneğinin 16'sının (%64) *S. aureus* yönünden pozitif olduğunu bildirmiştir.

Süt ve süt ürünlerinde enterotoksin varlığının tespiti amacıyla yapılan çeşitli çalışmalarda farklı izolasyon oranları bildirilmiştir. Neder ve ark. (2011), Arjantin'de süt toplama tanklarından izole ettikleri 94 *S. aureus* suşunun 11'inin (%11,7) enterotoksijenik karakterde olduğunu ve izolatların 7'sinin (%7,4) SEC, 2'sinin (%2,1) SED tipi toksin ürettiğini ve en sık izole edilen toksin tipinin SEC tipi toksin olduğunu bildirmişlerdir. Ertaş ve Gönülalan (2010), Kayseri ilinde çiğ sütlerden elde ettikleri 31 enterotoksijenik *S. aureus* izolatının 12'sinin (%38,7) *sea*, 2'sinin (%6,5) *seb*, 5'inin (%16,1) *sec*, 10'unun (%32,3) *sed* ve 2'sinin (%6,5) hem *sea* hem de *sed* gen dağılımına sahip olduğunu belirtmiştir. Alişarlı ve Solmaz (2003), Van ilinde 100 adet sağmal inek meme başı derisi ve çiğ sütte yaptıkları çalışmada izole ettikleri 38 *S. aureus* izolatından 16'sının (%42) enterotoksin oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Muratoğlu (2010), İstanbul ilinde çiğ sütlerden temin edilen 42 *S. aureus* izolatının 12'sinin (%28,5), peynirlerden izole edilen 10 *S. aureus* izolatının 5'inin (%50) en az bir enterotoksin geni taşıdığını belirtmiştir. Aynı çalışmada çiğ sütlerden elde edilen izolatların 8'inin *sec* (%19,4) ve 5'inin *sea* (%14,9), peynirlerden elde edilen izolatların ise 3'ünün *sea* (%60) gen dağılımına sahip olduğunu bildirmiştir. Can (2011), Ankara ilinde farklı marketlerde satışa sunulan 100 adet tulum peyniri örneğinden elde ettiği 7 izolattan 3'ünün (%42,8) (2 adet SEC, 1 adet SEC-SED birlikte) enterotoksijenik karakterde olduğunu belirtmiştir. Alişarlı ve ark. (2003), Van ilinde 175 adet sütlü tatlı (sütlaç, puding, kazandibi ve kremalı pasta) örneğinde yaptıkları

çalışmada 30 örnekten izole ettikleri *S. aureus*'ların 11'inin (%37) enterotoksin oluşturma yeteneğine sahip olduğunu ve bunlardan 7'sinin (%23) SEA, 2'sinin (%6) SEA+SEB ve 1'inin de (%3) SEB ve SEC tipi toksin oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Jorgensen ve ark. (2005), Norveç'te çiğ inek ve keçi sütleri ile çeşitli süt ürünlerinden (kaymak, peynir, tereyağı) izole ettikleri 398 *S. aureus* izolatının 167'sinin (%42) en az bir enterotoksin geni taşıdığını ve elde edilen izolatların 147'sinin (%37,4) *sec* geni taşıdığını bildirmişlerdir. Normanno ve ark. (2005), İtalya'da marketlerde satışa sunulan çiğ sütlerden elde ettikleri 168 *S. aureus* izolatının 94'ünün (%55,9), çeşitli peynir türlerinden elde ettikleri 161 *S. aureus* izolatının 99'unun (%61,5) bir veya daha çok tipte enterotoksin ürettiğini bildirmişlerdir. Çiğ sütlerden elde edilen izolatlardan 40'ının (%42) SEC, 17'sinin (%18) SEA ve 6'sının (%6,3) SED tipi, beyaz peynir örneklerinden izole edilen izolatlardan ise 32'sinin (%32) SEA, 21'inin (%21) SEC ve 22'sinin (%22) SED tipi toksin ürettiklerini belirtmişlerdir.

Morandi ve ark. (2007), İtalya'da çeşitli hayvan türlerinden (inek, manda, koyun, keçi) elde edilen 86 çiğ süt ve 26 süt ürününden (peynir, tereyağı, kaymak) izole ettikleri 112 *S. aureus* izolatından 75'inin (%67) en az bir veya daha fazla toksin geni taşıdığını ve tespit edilen toksinlerin sıklığı bakımından izolatların 36'sının (%48) SEA, 37'sinin (%49,3) SED ve 15'inin (%20) SEC tipi toksin ürettiklerini belirtmişlerdir. Rall ve ark. (2008), Brezilya'da çiğ ve pastörize sütlerden izole ettikleri 57 *S. aureus* izolatının 39'unun (%68,4) en az bir toksin geni taşıdığını ve izolatların 16'sının (%41) *sea*, 8'inin (%20,5) *sec* ve 5'inin (%12,8) *sed* gen dağılımına sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Rahimi ve Alian (2013), İran'da 200 adet süt dökme tankından (inek, manda, koyun ve deve) elde ettikleri 22 *S. aureus* izolatının 15'inin (%62,8) enterotoksijenik karakterde olduğunu ve izolatların 6'sının (%27,3) SEA, 4'ünün (%18,2) SEC ve 3'ünün (%13,6) SED tipi toksin ürettiklerini belirtmişlerdir. Bianchi ve ark. (2014), İtalya'da 1245 süt ve süt ürününden (848 çiğ süt, 397 süt ürünü) elde ettikleri 481 *S. aureus* izolatının 255'inin (%53) bir yada daha fazla enterotoksini ürettiğini belirtmişlerdir. Nazari ve ark. (2014), İran'da 8 farklı çiftlikten elde ettikleri 246 süt örneğinden elde ettikleri 52 *S. aureus* izolatının 42'sinin (%80,7) en az bir enterotoksin geni taşıdığını bildirmişlerdir. Carfora ve ark. (2015), İtalya'da 565 adet süt ve süt ürününden (428 adet çiğ süt, 9 adet ısıtılmış süt, 8 adet lor peyniri, 7 adet

Ricotta peyniri, 8 adet yoğurt ve 105 yumuşak, sert, yarı sert peynirler ve mozarella peyniri) elde edilen 227 *S. aureus* izolatından 93'ünün (%40) enterotoksijenik karakterde olduğu bildirilmiştir. Klasik toksinlerden en çok izolatların 38'inin (%40) SED ve 32'sinin (%34,3) SEC tipi toksin ürettiği, ayrıca %31,4 oranında SELJ ve %28,6 SER gibi farklı tip toksinlerin de tespit edildiği bildirilmiştir. Ayrıca bu çalışmada incelenen manda sütü ve peynirlerinden SEA, SED, SER ve SEIJ tipi toksini birlikte üreten 3 adet izolat elde edildiği belirtilmiştir.

2.7.3. Et ve et ürünlerinde *S. aureus*

Kasaplık hayvanların normal florasında bulunabilen *S. aureus* kesim hijyeninin yetersiz olmasına bağlı olarak tüketime sunulan et ve et ürünlerini kontamine ederek gıda intoksikasyonlarına neden olmaktadır (Sentandreu ve ark., 2002).

Et ve et ürünlerinde *S. aureus*'un varlığına yönelik yapılan çalışmalarda; Güven ve ark. (2009), Eskişehir ve Kütahya bölgesinde çeşitli et ve et ürünlerinde (sığır eti, kanatlı eti, salam, köfte) yaptıkları çalışmada *S. aureus* prevalansını %48,7 olarak tespit etmişlerdir. Gündoğan ve Ataoğlu (2012), Ankara ilindeki çeşitli marketlerden temin ettikleri 15'er adet dana kıyma ve tavuk but örneklerinde *S. aureus* kontaminasyon düzeyini araştırmışlar, kıyma örneklerinin %10,7 oranında *S. aureus* ile kontamine olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada tavuk but örneklerinde *S. aureus* izole edememişlerdir. Keyvan (2014), Ankara'da bulunan 2 farklı mezbahada kesilen 120 sığır karkasının %12,5 oranında *S. aureus* ile kontamine olduğunu tespit etmiştir.

Kitai ve ark. (2005), Japonya'da 145 farklı markette satışa sunulan 444 piliç parça etinin 292'sinde (%65,7) *S. aureus* izole etmişlerdir. İzolatların %57,1'inin kanatlı, %22,1'inin ise insan orijinli olduğunu bildirmişlerdir. Elde edilen 360 izolatın 78'inin ise enterotoksijenik özellikte olduğunu bildirmişlerdir.

Di Giannatale ve ark. (2011), taze etlerde (kıyma ve piliç eti) *S. aureus*'un varlığını %19,3 olarak bildirmişlerdir. Kelman ve ark. (2011), inceledikleri toplam 694 adet çiğ kıyma örneğinin %29'unun *S. aureus* ile kontamine olduğunu bildirmişlerdir. Feßler ve ark. (2011), inceledikleri 86 adet taze tavuk ve hindi eti örneğinin 32'sinin (%37,2) *S. aureus* ile kontamine olduğunu tespit etmişlerdir. Hanson ve ark. (2011), Amerika Birleşik Devletleri'nde yaptıkları bir çalışmada domuz, sığır, hindi ve tavuk etlerinden oluşan 165 örneği incelemiş ve *S. aureus* prevalansınının sırasıyla %18,2, %6,9, %19,4 ve %17,8 olduğunu bildirmişlerdir.

Çeşitli gıdalarda *S. aureus* varlığı üzerine yapılan çalışmalarda; Normanno ve ark. (2005), farklı gıdaların bulunduğu toplam 11.384 örneğin %17,3'ünde koagulaz pozitif stafilokok tespit etmiştir. Di Giannatale ve ark. (2011), pastacılık ürünlerinde *S. aureus* varlığını %3,6, mezelerde %7,7, midyede ise %6 olarak bulmuşlardır. Shahraz ve ark. (2012), inceledikleri toplam 256 adet paketlenmiş hamburgerin %25'inin *S.aureus* ile kontamine olduğunu bildirmiştir.

2.8. *S. aureus* Enfeksiyonları

S. aureus nozokomiyal enfeksiyonlarda sıklıkla izole edilen önemli bir patojendir. Etken basit yara enfeksiyonları, yüzeysel lezyonlar ve gıda zehirlenmelerinden hayatı tehdit eden ciddi enfeksiyonlara kadar çok çeşitli hastalıklara sebep olmaktadır (Chambers ve DeLeo, 2009). *S. aureus*'lar insanlarda çeşitli doku ve organlarda hastalıklara neden olabilmektedir. Deri ve yumuşak dokuda; haşlanmış deri sendromu, impetigo, follikülit, fronkül, karbonkül, dolaşım sisteminde; bakteriyemi ve endokardit, solunum sisteminde; pnömoni ve ampiyem, kas ve iskelet sisteminde; osteomyelit ve septik artrit, santral sinir sisteminde; toksik şok sendromu gibi çeşitli enfeksiyonlara neden olmaktadır (Moreillon ve ark., 2005; Peacock 2005; Murray ve ark., 2005).

Enterotoksijenik stafilokoklar tarafından gıdada oluşturulan bir veya birden fazla toksinin sindirim yolu ile alınması sonucu stafilokokal gıda zehirlenmeleri şekillenmektedir. Gıdalar genellikle hazırlanma aşamalarında enterotoksijenik *S. aureus* ile kontamine olmaktadır. Gıdaların uygun olmayan sıcaklık ve sürede muhafaza edilmeleri sonucu gıdada *S. aureus* sayısı 10^5 kob/g ve daha yüksek düzeylere ulaştığı zaman etken enterotoksin oluşturma yeteneğine sahip olmaktadır. Toksin içeren gıdaların tüketilmesi sonucunda ise gıda kaynaklı zehirlenme vakaları meydana gelmektedir (Erol, 2007). Stafilokokal intoksikasyonlara en sık A ve D tipi toksinler neden olmaktadır (Sutherland ve Varnam, 2002; Jorgensen ve ark., 2005).

Stafilokokal gıda zehirlenmelerinde semptomlar oldukça kısa sürede (30 dakika-8 saate kadar) oluşmaktadır (Le Loir ve ark., 2003). *S. aureus* ile kontamine gıdanın alınması sonucu sıklıkla görülen semptom bulantı ve kusmadır. Alınan gıdada 200 nanogramdan az toksin bulunması semptomların ortaya çıkması için yeterlidir (Evenson ve ark., 1988). Semptomların şiddeti bireysel duyarlılık (kronik hastalar, yaşlılar ve gençler) ve alınan toksinin miktarına bağlı olarak değişmektedir. Mide

bulantısı ve kusma dışında en sık rastlanan semptomlar; abdominal kramp, bazen ishal, şiddetli olgularda baş ağrısı, kas krampları ve bitkinliktir. Çoğu olguda iyileşme hızlı (24 ile 48 saat içinde) şekillenmektedir. Ciddi komplikasyonlar, hastaneye yatış ve ölüm olayları ise nadirdir (Bergdoll ve Lee Wong, 2006; Seo ve Bohach, 2007). Stafilokokal intoksikasyonda mortalite oranı genel olarak %0,03 düzeyinde olup, duyarlı bireylerde bu oran %4,4'e çıkabilmektedir (Jay, 1996).

2.9. *S. aureus*'un Antibiyotik Direnci ve Mekanizması

Antibiyotikler insan ve hayvanlarda başta enfeksiyöz hastalıkların tedavisi ve hastalıklardan korunma olmak üzere, hayvanlarda büyümeyi artırmak ve nadir olarak da tarımda bazı bitkileri korumak amacıyla kullanılmaktadır. Antibiyotiklerin bilinçsiz ve aşırı miktarlarda kullanımı yan etki risklerine ve antibiyotik direnç sorunlarına neden olmaktadır (Cizman, 2003). İnsanlar ve hayvanlarda *S. aureus* enfeksiyonları genellikle antimikrobiyal ajanlarla tedavi edilmektedir. *S. aureus* izolatlarının son 60 yılda direnç geni edinme kabiliyeti nedeniyle önemli miktarda direnç geni geliştirdiği bildirilmektedir (Wendlandt ve ark., 2013).

Hastaneye yatırılan hastalarda stafilokok enfeksiyonları yüzyılı aşkın süredir büyük bir endişe kaynağı olmaktadır. "Aseptik teknik" bileşenlerinin kademeli olarak devreye sokulması postoperatif enfeksiyonların sıklığını azaltmaya yardımcı olmuş ve özellikle sülfonamid ve penisilinlerin ortaya çıkması ile bu enfeksiyonların sıklığında büyük bir azalma şekillenmiştir. Bununla birlikte 1950'lerde, semisentetik penisilinlerin (örn. metisilin veya oxacillin) kullanımından önce, penisiline dirençli stafilokokların, Amerika Birleşik Devletleri hastanelerinde büyük bir sorun haline geldiği bildirilmiştir (Crossley ve ark., 1979). 1959 yılında metisilin klinikte kullanımının başlamasıyla beta-laktamaz enziminin yol açtığı direnç sorununun aşıldığı, ancak 1960 yılında *S. aureus* enfeksiyonlarının tedavisinde metisilin kullanımının başlaması ile ilk MRSA izolatının Amerika Birleşik Devletleri'nde Boston Şehir Hastanesi'nde izole edildiği rapor edilmiştir (Barrett ve ark., 1968).

1970'li yıllarda MRSA oranı özellikle hastane enfeksiyonlarında artış göstermekle birlikte beta-laktam grubu dışında kalan antibiyotiklere de direnç gelişimi saptanmaya başlanmıştır (Enright ve ark., 2002). 1990'ların sonlarından itibaren, MRSA dünyanın birçok ülkesinde hastane ve toplumsal kökenli invaziv deri enfeksiyonlarının en önemli nedeni haline gelmiştir (Salgado ve ark., 2003).

Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) tarafından 2011 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nin dokuz eyaletinde yapılan bir araştırmada MRSA kaynaklı 80.000 "invaziv" enfeksiyonun şekillendiği ve bunun yaklaşık 11.000'inin ölümle sonuçlandığı bildirilmiştir (Dantes, 2013). Sağlık Araştırma ve Kalite Ajansı (AHRQ) verilerine göre, 2011 yılında ABD'deki çeşitli hastanelerde MRSA tanısı ile hastaneye yatış yapan yaklaşık 460.000 vakanın bulunduğu ve bunun 23.000'inin ölümle sonuçlandığı bildirilmiştir (Eisler, 2013).

Stafilokokların beta-laktam antibiyotiklerine karşı iki temel direnç mekanizması bulunmaktadır. Bunlardan ilki beta-laktamları hidrolitik olarak yok eden beta-laktamaz enzimlerinin *S. aureus* için PC1 beta-laktamaz ekspresyonu, diğeri ise beta-laktam antibiyotikleri tarafından inhibisyona duyarlı olmayan penisilin bağlayıcı protein 2a'nın (PBP-2a) sentezlenmesidir. Hidroliz ile beta-laktamları yok eden beta-laktamaz enzimleri, *blaZ* geninin aktivasyonu ile eksprese edilmektedir. Yüksek seviyede beta-laktam direnci (MRSA), penisilin bağlayıcı protein 2a (PBP-2a)'yı kodlayan *mecA* geninden kaynaklanmaktadır (Rosato ve ark., 2003). Beta-laktamaza bağlı direncin stafilokok izolatlarının > %95'inde bulunduğu ve MRSA'nın özellikle Kuzey Amerika, Avrupa ve Asya'da klinik izolatların %25-50'sinden izole edildiği bildirilmiştir (Lowy, 1998; Diekema ve ark., 2003).

Stafilokoklarda metisilin direnci; intrinsik (kromozomal) metisilin direnci (homojen direnç ve heterojen direnç), sınırda (borderline) metisilin direnci (BORSA) ve orta düzeyde (moderately) metisilin direnci (MODSA) olmak üzere üç ana başlık altında toplanmaktadır.

i) İntrensik (Kromozomal) Metisilin Direnci: *S. aureus* suşlarında en sık görülen direnç mekanizmalarından birisidir. PBP-2 veya PBP-2a olarak gösterilen ve sadece MRSA'larda bulunan penisilin bağlayan proteinin (PBP) sentezlenmesi ile ortaya çıkmaktadır (Waldvogel, 1995). Metisilin dirençli stafilokoklarda PBP-2a, beta-laktam antibiyotiklerinin çoğuna düşük affinite göstermektedir. Bu nedenle beta-laktam antibiyotikler hücre duvarına bağlanamadığından bakteri hayatta kalmayı başarmaktadır. PBP2a sentezi bakteri kromozomunda ilave olarak bulunan 2kb'lık *mecA* geni sayesinde gerçekleşmektedir (Ünal, 1996). Son yıllarda yapılan çalışmalarda *mecA* gen homologu olan *mecA_{LGA251}*'in de metisilin direncinden sorumlu olduğu bildirilmiştir. Nükleotid dizilerine göre *mecA* ve *mecA_{LGA251}*'nin %70 oranında

benzerlik gösterdiği bildirilmiştir. *mecA*_{LGA251} ilk olarak sığırlardan elde edilen *S. aureus* izolatlarında saptanmış ve yalnızca hayvanlarda bulunduğu belirtilmiştir. Ancak yapılan son çalışmalarda *mecA*_{LGA251}'in insanlarda da metisilin direncinden sorumlu olduğu bildirilmiştir (Pichon ve ark., 2012). Kromozomal metisilin direnci fenotipik olarak homojen ve heterojen direnç olmak üzere iki şekilde ortaya çıkmaktadır;

a-Homojen Direnç: Popülasyonu oluşturan tüm bakterilerde *mecA* geni eksprese olmakta ve hepsinde yüksek düzeyde metisilin direnci görülmektedir. Direncin tespitinde ortamdaki sıcaklık, pH, tuz konsantrasyonu ve inkübasyon süresi gibi çevresel faktörlerin etkisi olmadığı belirtilmektedir (Faller ve Schleifer, 1981).

b- Heterojen Direnç: Genotipik olarak *mecA* geni taşıyan ve metisiline dirençli olduğu halde fenotipik olarak metisiline duyarlı görünen bakterilerin neden olduğu direnç türüdür. Stafilokoklarda heterojen metisilin direnci, homojen dirençten daha sık görülmektedir (Salmenlinna, 2002). Heterojen dirençte popülasyonu oluşturan tüm hücreler *mecA* genini taşımalarına rağmen direnç ancak 10^4 ya da 10^8 bakteriden birinde tespit edilebilmektedir (Chambers, 1988). Heterojen dirençli *S. aureus* izolatlarında *mecA* geni eksprese olmamakta ve dirençli olması gereken bakteri, rutin duyarlılık testlerinde duyarlı olarak saptanmaktadır (Stapleton ve Taylor, 2002). Heterojen direncin ekspresyonundan *mecA* geni dışında farklı bölgelerde bulunan *fem* ve *aux* gibi gen bölgelerinin de sorumlu olabileceği belirtilmiştir (Chambers, 1997).

Metisiline heterojen direnç gösteren stafilokok suşlarının beta laktam dışındaki antibiyotiklere de çoklu direnç gösterdikleri bildirilmiştir. Heterojen dirençte oxacillin MİK (Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu) değerinin 1-100 mg/l arasında değiştiği belirtilmiştir (Cauwelier ve ark., 2004; Harstein ve ark., 2004). Heterojen direnç oluşumunda sıcaklık, ozmolarite, inkübasyon süresi, pH, ışık, iyon tutucu maddeler, metal iyonları ve beta-laktam antibiyotiklere önceden maruz kalma durumu gibi çevresel faktörlerin etkili olduğu bildirilmektedir (Matthews ve Stewart, 1984).

ii) Sınırdaki Metisilin Direnci (Borderline-Resistant *S. aureus* -BORSA)

S. aureus'larda borderline (sınırdaki) metisilin direnci bakterinin aşırı beta-laktamaz salgılamasıyla ortaya çıkmaktadır. Bu direnç oxacillin düşük seviyede direnç gösteren suşlarda, metisilin MİK değerinin duyarlılık noktasında olması ile tanımlanmaktadır (McDougal ve Thornsberry, 1986; Chambers, 1997). Metisilin MİK

değeri genellikle 2-4 µg/ml arasında, oxacillin MİK değeri ise 1-2 µg/ml arasında olan borderline-resistant *S. aureus* (BORSA) suşları sınırda duyarlılık göstermektedir (Jorgensen, 1991).

iii) Orta Düzeyde Metisilin Direnci (Moderately-Resistant *S. aureus*-MODSA)

Beta-laktamaz üretmediği ve *mecA* geni taşımadığı halde metisiline direnç geliştiren *S. aureus* izolatlarının geliştirdiği direnç mekanizması olarak tanımlanmaktadır. Bu mekanizma çok az sayıda stafilokok izolatında şekillenmektedir. Bu direnç beta-laktam antibiyotiklerin baskısına bağlı olarak protein bağlayıcı proteinleri (PBP2, PBP3, PBP4) kodlayan genlerde oluşan mutasyonlar sonucu oluşmaktadır (Ruben ve Norden, 1991). Oluşan mutasyonlar sonucu protein bağlayıcı proteinlerin beta laktam antibiyotiklere orta düzeyde affinite göstermesi ile oxacillin direnci şekillenmektedir. Oxacillin direnci oluşturan bu suşlar orta düzeyde metisilin direnci (Moderately-Resistant) gösteren *S. aureus* (MODSA)'lar olarak tanımlanmıştır (Gerberding, 1991; Chambers, 1997).

MRSA agar besiyerine 6 µg/ml oxacillin eklenmesi ile MRSA'lar etkili bir şekilde tanımlanabilmektedir. Ancak *mecA* geni taşıyan fakat düşük oxacillin MİK değerine sahip MRSA'ların bazen tespit edilemediği bildirilmektedir. *mecA* geni taşımaya rağmen oxacillin MİK değeri <2 olan MRSA suşları (OS-MRSA) düşük düzeyli beta-laktam direnci göstermelerinden dolayı uygun dozda beta-laktam antibiyotikler ile tedavi edilebilmektedir. Düşük dozda beta-laktam antibiyotik kullanılması yüksek beta-laktam dirençli yeni MRSA suşlarının ortaya çıkmasına sebep olabilmektedir (Hososaka ve ark., 2007) (Tablo 14).

Tablo 14. BORSA, MODSA VE OS-MRSA'nın özellikleri (Medougal ve Thornsbery, 1986; Tomasz ve ark., 1989; Chambers, 1997; Hososaka ve ark., 2007)

	<i>mecA</i>	Oxacillin	Cefoxitin	Oxacillin MİK
BORSA	-	Dirençli	Dirençli	1-2 mg/ml
MODSA	-	Dirençli	Dirençli	1-2 mg/ml
OS-MRSA	+	Duyarlı	Duyarlı	< 2

BORSA: Borderline Resistant *S. aureus* (Sınırdan dirençli *S. aureus*), MODSA: Moderately-Resistant *S. aureus* (Orta düzeyde dirençli *S. aureus*); OS-MRSA: Oxacillin duyarlı MRSA

2.9.1. Metisilin Dirençli *S. aureus* (MRSA) Suşlarının Moleküler Epidemiyolojisi

S. aureus'daki metisilin direnci, *mec* stafilokokal kaset kromozomu (SCC*mec*) olarak adlandırılan mobil bir element üzerine yerleşmiş durumdaki *mecA* geninin kazanılması sonucu elde edilmiştir (Chambers, 1997; Okuma ve ark., 2002). SCC*mec*'in (stafilokokal kaset kromozomu) virulans ve metisilin direnci stafilokok türleri arasındaki genomik aktarımından sorumludur. SCC*mec* kasetinin kökeni henüz kesin olarak bilinmemektedir. Beta-laktam antibiyotiklere karşı duyarlı olan *Staphylococcus sciuri* suşundaki protein bağlayıcı proteinler (PBP) ile MRSA'lardaki PBP2a arasında %87,8 oranında benzerlik bulunmasından dolayı SCC*mec* kasetinin kökeninin bu bakteri olduğu ileri sürülmektedir (Wu ve ark., 1996).

MecI ve *mecRI* olarak adlandırılan ve birbirine yapışık olarak bulunan iki düzenleyici gen, SCC*mec* üzerinde *mecA* kompleksini oluşturmaktadır (Hiramatsu ve ark., 1992). Stafilokokal beta-laktamaz düzenleyici elementlerden olan *blaI* ve *blaRI*, moleküler organizasyon, yapı ve fonksiyon özellikleri bakımından benzerlik gösterirler. *BlaI*, beta-laktamaz gen transkripsiyonunu baskılayan DNA bağlayıcı bir proteindir. Bu protein beta-laktam antibiyotik varlığında beta-laktamaz gen transkripsiyonuna yol açan sinyalleri yollamaktadır. *BlaRI*'in mekanizması tam olarak bilinmemektedir. *mecI* ve *mecRI* ise *mecA* için benzer düzenleyici rolleri yerine getirmektedir (Dyke ve Gregory, 1997).

Beta-laktam antibiyotiklerin yokluğunda *mecI* geni; *mecA*, *mecRI*- *mecI*'nin transkripsiyonunu baskılamaktadır. Beta-laktam antibiyotiklerin varlığında ise *mecRI* otokatalitik olarak ayrılmaktadır. Bakteri penisiline maruz kaldığında *mecA* geninin beta-laktam antibiyotiklere yanıt vermesi *mecI* ve *mecRI* genlerinin kontrolünde gerçekleşmektedir (Lowy, 1998; Lee, 2006).

Metisilin direncinin oluşmasında *mecA* geni dışında *femA* geninin de etkili olduğu belirtilmektedir (Mehrotra ve ark., 2000). *S. aureus* izolatları, *mecA* geni taşımadıkları halde oxacillin ve cefoxitin gibi antibiyotiklere karşı yapılan testler de pozitif sonuç verebilmektedir. *mecA* geninin homoloğu olan *mecC* geni varlığı ve beta-laktam direnci sağlayan diğer faktörlerin bunun nedeni olabileceği belirtilmektedir (García-Álvarez ve ark., 2011; Petersen ve ark., 2013).

2.9.2. Gıdalarda Metisiline Dirençli *S. aureus*'ların Varlığı

Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA)'lar, dünya çapında sağlıkla ilişkili enfeksiyonların ana nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir. MRSA hastanelerde olduğu kadar toplumda ve hayvancılıkta da önemli bir patojendir. MRSA'lar insanların besin zincirine girerek gıda kaynaklı hastalıklara neden edebileceğinden önemli bir halk sağlığı problemi olarak kabul edilmektedir (Basanisi ve ark., 2017).

Avrupa, Kuzey Amerika ve Asya'da et ve et ürünlerinde yapılan çalışmalarda MRSA prevalansının %0,99-28 arasında, süt ve süt ürünlerinde yapılan çalışmalarda ise %0-20 arasında olduğu bildirilmiştir (Tablo 15) (Bhargava ve ark., 2011; Haran ve ark., 2012; Zinke ve ark., 2012; Boost ve ark., 2013; Tenhagen ve ark., 2014; Riva ve ark., 2015; İgbinosa ve ark., 2016; Basanisi ve ark., 2017).

Tablo 15. Gıda orjinli metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) olguları

Gıda	Ülke	Olgu Sayısı	Pozitif Oran (%)	Kaynak
Süt ve süt ürünleri	ABD, Almanya, İtalya,	5	0-20	Haran ve ark., 2012; Zinke ve ark., 2012; Tenhagen ve ark., 2014; Riva ve ark., 2015; Bassanisi ve ark., 2017
Manda sütü ve ürünleri	Türkiye	1	9,2	Pamuk ve ark., 2012
Sığır eti	Hollanda, Kore, ABD, Japonya, Hong Kong, Almanya, Nijerya	7	0,99-28	De Boer ve ark., 2009; Rhee ve Woo, 2010; Bhargava ve ark., 2011; Hiroi ve ark., 2012; Boost ve ark., 2013; Tenhagen ve ark., 2014; İgbinosa ve ark., 2016
Tavuk eti	Hollanda, Almanya, ABD, Hong Kong, İngiltere, Nijerya	6	3,9-20	De Boer ve ark., 2009; Feßler ve ark., 2011; Bhargava ve ark., 2011; Boost ve ark., 2013; Fox ve ark., 2017; İgbinosa ve ark., 2016
Hindi eti	Hollanda, Almanya, ABD, Hong Kong, İngiltere, Nijerya	6	2,2-35,3	De Boer ve ark., 2009; Feßler ve ark., 2011; Bhargava ve ark., 2011; Boost ve ark., 2013; Fox ve ark., 2017; İgbinosa ve ark., 2016
Sebze, meyve	Çek Cumhuriyeti	1	0,3	Vojkovska ve ark., 2017
Deniz ürünleri	Japonya, İran	2	2,5-23,8	Hammad ve ark., 2012; Arfatahery ve ark., 2016

MRSA suşları son yıllarda çiğ et (domuz, piliç, sığır), çiğ süt ve süt ürünleri gibi birçok gıdadan izole edilmekte ve bazı olaylarda gıda hazırlayan kişilerin ve et işleyicilerinin de MRSA olgularında kaynak olduğu belirtilmektedir (De Boer ve ark., 2009; Haran ve ark., 2012; Boost ve ark., 2013; Tenhagen ve ark., 2014; Igbinsa ve ark., 2016; Basanisi ve ark., 2017).

MRSA'ların çiftlik hayvanlarının yanı sıra, tavşan, ördek, yaban domuzu eti, minimal işlenmiş sebze ve taze balık içeren diğer gıdalarda da tespit edildiği bildirilmiştir (Lozano ve ark., 2009; De Boer ve ark., 2009; Hammad ve ark., 2012; O'Brien ve ark., 2012; Vojkovská ve ark., 2017). *S. aureus*'un balıkların normal flora parçası olmamakla birlikte, MRSA ve diğer bazı metisiline dirençli stafilkokların Japonya'da çiğ balıklarda tespit edildiği ve kontaminasyonun balıklarla temas eden ve yetersiz hijyene sahip personelden kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Hammad ve ark., 2012).

İtalya'da 2003-2005 yılları arasında incelenen hayvansal kökenli 1.634 adet gıdadan (süt ve süt ürünleri, et ve et ürünleri) izole edilen 160 *S. aureus* izolatının 6'sının (%3,75) *mecA* geni taşıdığı tespit edilmiştir (Normanno ve ark., 2007). De Boer ve ark., (2009) Hollanda'da hayvansal kökenli 2.217 farklı et ürününün (hindi, tavuk, domuz, sığır ve dana eti) incelendiği bir çalışmada MRSA varlığını %11,9 olarak tespit etmişlerdir. MRSA prevalansının hayvan türlerine göre farklılık gösterdiği, en yaygın MRSA varlığının %35,3 ile hindi etlerinde bulunduğu belirtilmiştir. MRSA prevalansının tavuk etlerinde %16, dana etlerinde %15,2, domuz etlerinde %10,7, sığır etlerinde ise %10,6 olarak tespit edildiği bildirilmiştir.

Nassasra (2011), İstanbul ilinde 406 süt örneğinden elde ettiği 119 *S. aureus* izolatından hem fenotipik (disk difüzyon ve ORSAB tarama agar testleri) hem de genotipik (*mecA* geni tespiti) olarak sadece 1 (%0,84) suşun MRSA olarak tespit edildiğini bildirmiştir. Pereria ve ark., (2009), Portekiz'de çeşitli gıda maddelerinden (çiğ inek sütü, peynir, çiğ et, fermente et ürünleri) elde edilen 148 koagulaz pozitif stafilkok izolatının fenotipik olarak (agar dilüsyon yöntemi) 56'sının (%38) oxacilline karşı dirençli olduğunu belirtmişlerdir.

Mashouf ve ark. (2015), İran'da 271 çiğ süt, 170 peynir ve 66 kaymak örneğinden izole ettikleri toplam 48 *S. aureus* izolatından 5'inde (%5,1) *mecA* geni tespit edildiğini belirtmişlerdir. *mecA* pozitif izolatların süt ve peynir örneklerinden

izole edildiği, kaymak örneklerinde ise MRSA izolatına rastlanmadığı bildirilmiştir. Riva ve ark. (2015), İtalya'da 383 çiğ süt ve süt ürününden, elde ettikleri 35 *S. aureus* izolatının genotipik olarak (*mecA* geni pozitif) 7'sinin (%20), Song ve ark. (2016), Kore'de temin ettikleri 1.222 çiğ süttten elde ettikleri 165 *S. aureus* izolatının 23'ünün (%13,9) MRSA pozitif olduğunu tespit etmişlerdir.

Bhargava ve ark. (2011), ABD'de yaptıkları çalışmada; inceledikleri 289 çiğ et örneğinden (156 sığır, 76 piliç, 57 hindi) toplam 65 (%22,5) *S. aureus* izolatı elde etmişlerdir. 2'si sığır eti (%1,3), 3'ü piliç eti (%3,9) ve 1'i hindi eti (%1,7) orjinli olmak üzere elde ettikleri toplam 6 izolatın (%9,2) MRSA pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Zinke ve ark. (2012), Almanya'da 36 adet çiğ süt ve 36 adet de pastörize süttten elde edilen toplam 72 adet peynir örneğinde yaptıkları çalışmada *S. aureus* prevalansının %5,5 olduğunu ve MRSA pozitif izolat elde edilemediğini bildirmişlerdir.

Kamal ve ark. (2013), Mısırdan 95 adet süt ve süt ürünü (35 adet çiğ süt, 30 adet Kariesh peyniri ve 30 adet dondurma) üzerine yaptıkları çalışmada total MRSA prevalansının %5,2 olduğunu bildirmişlerdir. Arfatahery ve ark. (2016), İran'da inceledikleri 600 adet deniz ürünüde (marine edilmiş, taze ve dondurulmuş balık ve karides) MRSA prevalansını %23,8 olarak bildirmişlerdir.

Gıdalar antibiyotik direnç transferi için önemli bir araç olarak kabul edilmektedir. Antibiyotik dirençliliğinin insanlara taşınmasında, gıdalarda antibiyotik kalıntılarının bulunması, antibiyotiklere dirençli patojenlerin varlığı ve mikroorganizmalar arasında dirençlilik aktarımları önemli rol oynamaktadır (Khan ve ark., 2000).

2.10. *S. aureus*'un İzolasyon ve İdentifikasyonu

S. aureus kolonilerinin tanısında mikrobiyolojik fenotipik yöntemler, serolojik yöntemler ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır. *S. aureus*'un identifikasyonunda koloni morfolojisi kesin tanı için yeterli değildir. Stafilokoklarda hem cins hem de tür ayrımı yapılabilmesi için diğer özelliklerinin de değerlendirilmesi gereklidir.

Gıda örneklerinden stafilokok türlerinin sayımında genellikle Baird-Parker agar (BP) kullanılmaktadır. Baird-Parker agarda üreyen stafilokoklar siyah, dış bükey, parlak, 1-1,5 mm çapında ve oluşan proteoliz ve lipolize bağlı olarak etrafı hale ile çevrelenmiş tipik zonlu koloniler oluşturmaktadır Enterotoksijenik suşların ortaya konulması amacıyla besiyerinde üreyen tipik ve atipik koloniler biyokimyasal açıdan

çeşitli testler ile identifiye edilmektedir. (ISO, 1999; Lancette ve ark., 2001). Seçilen kültürler morfolojik olarak Gram boyama ile karakterize edilir ve daha sonra katalaz, koagulaz veya termonükleaz üretimi açısından değerlendirilir. Koagulaz veya termonükleaz varlığı genellikle enterotoksin üretme yeteneğiyle ilişkilidir (Lancette ve ark., 2001).

Baird-Parker Agar ilk olarak 1962 yılında formüle edilmiştir. Bu agar koagulaz pozitif stafilocok türlerinin gıda, cilt, toprak, hava ve diğer materyallerden seçici izolasyonu için kullanılan bir besiyeridir. Zebovitz, Evan ve Niven tarafından geliştirilen bir önceki formülün modifikasyonu sonucu Baird-Parker tarafından mevcut formülasyonu geliştirilmiştir. Besiyerine lesitinaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla yumurta sarısı emülsiyonu, Gram negatif mikroorganizmaları inhibe etmek için potasyum tellürit ve stafilocokların gelişimini artırmak için de sodium piruvat ilave edilmiştir (Baird-Parker, 1962).

S. aureus'un izolasyon ve identifikasyonunda Uluslararası Standartlar Organizasyonu (ISO), Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Uluslararası Resmi Tarım Kimyagerleri Birliği (AOAC International) gibi uluslararası kuruluşlar Baird-Parker agar besiyeri kullanılmasını önermektedir. *S. aureus*, Baird-Parker Agar besiyeri dışında, Rabbit Plazma Fibrinojen Medium (RPF), Modified Giolitti & Cantoni Broth, BBL CHROMagar Staph aureus, mannitol salt phenol red agar gibi birçok besiyerinde kültüre edilebilmektedir (Cunniff, 1995; ISO, 1999; ISO, 1999a).

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) *S. aureus* izolasyonu için Baird-Parker agarın kullanıldığı direkt plak sayma yöntemi ve bu yöntemle paralel olarak %10 NaCl ve %1 sodyum piruvat ilave edilmiş Trypticase (tryptic) soy broth (TSB)'un kullanıldığı en olası sayı metodunu (MPN) önermektedir (Bennett ve Lancette, 2001).

Baird-Parker agarın yaygın kullanım alanına sahip olmasına karşın, düşük seçicilik, yanlış sonuç sayısı ve uzun analiz süresi gibi dezavantajlarının olduğu bildirilmiştir (Ingham ve Schoeller, 2001). BP agarın sınırlamaları göz önüne alındığında gıdalarda stafilocokların sayımı amacıyla alternatif kültür ortamları ve metodolojilerin kullanılması önerilmektedir (Beckers ve ark., 1984; Sawhney, 1986). Uluslararası Standartlar Organizasyonu (ISO) tarafından resmi olarak önerilen tavşan plazması fibrinojen agarın (RPFA) bileşiminde, potasyum tellürit, sığır fibrinojen solüsyonu, tavşan plazması ve tripsin inhibitor solüsyonu bulunmaktadır. İnkübasyon

periyodundan sonra stafilokoklar koagulaz aktivitesini belirleyen, etrafı berrak zonla çevrili, siyah veya gri hatta bazen beyaz küçük koloniler oluşturmaktadır. Bu teknik koagulaz pozitif ve koagulaz negatif kolonilerin farklılaşmasına izin vermekte ve Baird-Parker agar kullanıldığında uygulanması gereken doğrulayıcı bazı adımları (koagulaz testi gibi) ortadan kaldırmaktadır (ISO, 1999a).

Peynir, et ve yumurta örneklerindeki koagulaz pozitif stafilokokların tespiti amacıyla ISO 6888-1 ve ISO 6888-2 yöntemleri kullanılmaktadır. Baird-Parker (BP) ve Rabbit Plazması Fibrinojen agar (RPFA) arasında hassasiyet bakımından hiçbir farkın bulunmadığı bununla birlikte, duyarlılığın RPFA'da daha iyi sonuçlar verdiği bildirilmiştir (De Buyser ve ark., 2003).

Viçosa ve ark. (2010), çiğ süt ve taze yumuşak peynir örneklerinde koagulaz ve termonükleaz pozitif stafilokokları belirlemek amacıyla BP ve RPFA besiyerlerini kullanmışlardır. Araştırmacılar RPFA agarda gelişen tipik koloni morfolojisinin koagulaz ve termonükleaz üretimi açısından uyumlu sonuçlar verdiğini ve BP agar ile karşılaştırıldığında daha doğru ve güvenilir sonuçlar ortaya çıktığını bildirmişlerdir.

BBL™ CHROMagar™ Staph aureus, çeşitli gıda örneklerinden (kabuklu yumurta, somon füme ve pişmiş biftek) *S. aureus*'un izolasyonu, sayımı ve tanımlanması için kullanılan AOAC Araştırma Enstitüsü tarafından onaylanmış seçici bir besiyeridir (Bennett ve Lancette, 2001). BBL™ CHROMagar™ Staph aureus agarın bileşiminde kromo-pepton, inhibitör ajanlar, kromojen karışımı ve NaCl bulunmaktadır. Besiyerinde bulunan inhibitör ajanlar çeşitli Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler ile bazı mayaların üremesini engeller. Kromojen karışımı ise çeşitli enzimler tarafından hidrolize edilerek çözünmeyen renkli bir substrat oluşumunu sağlar. *S. aureus* renkli koloniler üreten kromojenik substratlardan birini kullanarak kahverengi koloniler oluşturur ve bu durum diğer organizmalardan ayrımını kolaylaştırır. BBL™ CHROMagar™ *Staph aureus* yönteminin avantajı; Baird-Parker agarda 48 saat olan inkübasyon süresinin bu besiyerine daha kısa (24 saat) olmasıdır (Anon, 2015a). *S. aureus* izolasyonunda kullanılan bir diğer besiyeri ise Modified Giolitti & Cantoni Broth'dur. Bu besiyeri ISO 6888-3'e göre insan tüketimi ve hayvanların beslenmesi için tasarlanmış ürünler ve gıda işleme alanındaki çevresel örneklerde düşük sayıdaki *S. aureus* izolatlarının tespiti amacıyla kullanılmaktadır (ISO, 2003).

Günümüzde daha pratik ve hızlı sonuçlar veren ve uluslararası kuruluşlar tarafından onaylanmış çeşitli kitler geliştirilmiştir. Petrifilm Staph Express Sayım Sistemi (STX) DNaz üretebilen stafilokok suşlarının seçici ve farklı sayımına imkan vermektedir. Bu sistemin avantajı klasik yöntemlerde kullanılan kültür ortamı ve reaktiflerin hazırlanması gerekmediğinden analiz süresinin en aza indirgenebilmesidir (Fedio ve ark., 2008).

Günümüzde klasik kültür tekniklerinin yanı sıra serolojik ve genetik materyal temelli moleküler yöntemler ile gıdalarda *S. aureus* varlığı tespit edilmektedir. Lateks aglütinasyon testleri *S. aureus*'un serolojik tanımlamasında sıklıkla kullanılan ayırıcı testler arasındadır. Ancak *S. lugdunensis* ve *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*'nin bazı suşları kümeleşme faktörü ürettiğinden lateks aglütinasyon testi ile pozitif sonuç verebilmektedir. Bu nedenle lateks test sonuçlarının ön tanı olarak kabul edilmesi ve doğrulanması gerektiği bildirilmiştir (Winn ve ark., 2006).

Moleküler yöntemler *S. aureus* tespitinde kalitatif ve kantitatif sonuçlar veren hassas, güvenilir ve hızlı tekniklerdir. Moleküler yöntemlerle *S. aureus*'un tanımlanmasında nükleaz (*nuc*), koagulaz (*coa*) ve protein A (*spa*) gibi hedef genler saptanmaktadır. Ayrıca *S. aureus* tarafından üretilen enterotoksinlerin tayininde *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* genleri, metisiline dirençli *S. aureus* izolatlarının tespiti için *mecA* geni tespitine yönelik multipleks PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ve multipleks Real-Time PCR yöntemleri kullanılmaktadır (Grisold ve ark., 2002; Winn ve ark., 2006).

Stafilokok türlerinin tayininde PCR dışında multilokus enzim elektroforez (MLEE), pulsed-field jel elektroforez (PGFE), field inversion jel elektroforez (FIGE), immunoblot, ribotiplendirme, IS prop tiplendirme (IS type) ve bakteriofaj tiplendirme (Phage type) gibi diğer moleküler yöntemler de kullanılmaktadır (Tenover, 1994).

2.11. Metisilin Direncinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

S. aureus ve diğer stafilokok türlerindeki antimikrobiyel direnci tespit etmek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Fenotipik yöntemler arasında, agar disk difüzyon ve broth mikrodilüsyon testleri veteriner hekimliği ve gıda alanında rutin teşhiste en yaygın kullanılan yöntemlerdir. Bunun dışında spesifik direnç genlerinin PCR veya DNA mikroarray ile tespitine yönelik genotipik testler de yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.11.1. Difüzyon Metotları

Agar disk difüzyon yöntemi

Katı besiyerinde oluşan inhibisyon çaplarının belirlenmesi prensibine dayalı klinik laboratuvarlarda en sık kullanılan bir yöntemdir. Bu test için test edilecek tanımlanmış bakteri miktarı (inokülüm), 0,5 McFarland (2×10^8 kob/ml bakteri)'a ayarlanarak Mueller-Hinton agara (MHA) eşit olarak yayılır. Agarın yüzeyine disklerin yerleştirilmesini takiben 35°C de 16-18 saat inkübe edilir. Bu süre zarfında antimikrobiyal ajan diskten agara yayılır ve inkübasyon sonunda antibiyotik disklerinin etrafındaki inhibisyon zonlarının çapları ölçülerek sonuç değerlendirilir. Metisilin direncin belirlenmesi amacıyla en çok oxacillin (1 μg) ve cefoxitin (30 μg) disk difüzyon yöntemleri kullanılmaktadır (Brown ve ark., 2005). CLSI (Clinical and Laboratory Standarts Institute) tarafından; oxacillin disk difüzyon yöntemi için inhibisyon zon çapı ≤ 10 mm olan izolatlar dirençli, 11-12 mm olan izolatlar orta düzeyde duyarlı, ≥ 13 mm olan izolatlar ise duyarlı olarak kabul edilmektedir. Cefoxitin disk difüzyon yöntemi için inhibisyon zon çapı ≥ 22 olanlar duyarlı, zon çapı ≤ 21 olanlar ise dirençli duyarlı olarak kabul edilmektedir (CLSI, 2011). Agar disk difüzyon testinin avantajları; uygulaması ve değerlendirmesi kolay, maliyeti uygun, aynı anda ve aynı plakta birden fazla mikrobiyal ajanın test edilebilir olmasıdır. Dezavantajları ise yalnızca kalitatif test sonuçlarının (hassas-orta-dirençli) elde edilebilmesi, MİK değerlerinin belirlenmesinin mümkün olmaması ve laboratuvarlar arası standartlaşmanın zor olmasıdır (Kadlec ve ark., 2015).

E-Test Yöntemi

E-test stripleri ile antimikrobiyal ajanların MİK değerlerinin belirlenmesini sağlayan bir agar difüzyon metodudur. Standartlaştırılmış bakteri miktarı 0,5 McFarland (2×10^8 kob/ml bakteri)'a ayarlanarak Mueller-Hinton agara (MHA) eşit olarak yayılır. Ardından test edilecek antimikrobiyal maddenin konsantrasyon gradyanını içeren strip agara yerleştirilir. Stripin arka yüzünde ilaç konsantrasyonu diğer yüzünde ise antimikrobiyal ajanın konsantrasyonlarına karşılık gelen değerler yer almaktadır. Antimikrobiyal ajan, stripten agara dağılırken, strip etrafında eliptik bir büyüme inhibisyon bölgesi oluşur. MİK değeri inhibisyon alanının E-test şeridiyle kesiştiği yerde skaladan okunur. Bu testin avantajları kantitatif bir test olması ve bir difüzyon

metodu ile MİK değerinin elde edilebilmesidir. Testin dezavantajları ise maliyetinin yüksek olması, bakterilerin gelişiminin mukoid tarzda ya da hemolitik yapıda olmasından dolayı MİK değerini okumada zorluk oluşturması ve veteriner hekimlik alanında birçok antibiyotik için E-test striplerinin henüz mevcut olmamasıdır (Kadlec ve ark., 2015).

2.11.2. Dilüsyon Metotları

Sıvı mikrodilüsyon testi

Antimikrobiyal ajanların MİK değerlerinin belirlenmesinde en sık kullanılan antimikrobiyal duyarlılık test metotlarından biridir. Bu test için genellikle antimikrobiyal ajanların iki kat sulandırılarak kurutulup dondurulduğu mikropalaklar kullanılır. ISO standardı 20776-1, 2006'ya göre, kolay üreyen organizmaların sıvı mikrodilüsyon testi için katkı içermeyen katyonu ayarlanmış Mueller-Hinton sıvı besiyeri kullanılmaktadır (EUCAST, 2014). Testin avantajları; test edilen antimikrobiyal ajanın duyarlı ya da dirençli olduğunun belirlenmesi, mikropalakların piyasada kolayca bulunabilmesi, testin hızlı ve kolay uygulanması ve kantitatif verilerin elde edilmesidir. Testin başlıca dezavantajları, antimikrobiyel ajanların varlığı numuneden numuneye göre değişebildiğinden bu testin tüm gıdalarda uygulanabilirliğinin mümkün olmamasıdır. Bu test ya mikropaleytlere kullanımı ya da E-test ve broth makrodilüsyon gibi ilave testler ile konfirme edilerek yapılmalıdır (Kadlec ve ark., 2015).

Sıvı makrodilüsyon testi

Antimikrobiyal ajanların MİK değerlerinin tespit edilmesinde kullanılan dilüsyon yöntemlerinden birisidir. Mikrodilüsyon testi ile benzer test koşulları gerektirir. Ancak makrodilüsyon testinde test tüpleri büyük hacimde (CLSI'ye göre 2-5 ml) kullanılmaktadır (CLSI, 2011). İkili seyreltme serisi taze hazırlanır ve ticari olarak bulunmaz. Makrodilüsyon testi her laboratuvarında uygulanabilen çok düşük maliyetli ancak çok zaman alıcı bir testtir. Antimikrobiyal ajanların saf madde olarak bulunması gerekmektedir. Stok konsantrasyonlar hazırlanırken bireysel hataların oluşması bir dezavantajdır (Kadlec ve ark., 2015).

Agar dilüsyon testi

Tipik olarak tek bir agar plakasında çok sayıda bakteri süşunun incelendiği makro ve mikro dilüsyon yöntemlerinden farklı olarak katı ortamın (oxacillin ve metisilin testleri için MHA+%2 NaCl) kullanıldığı test yöntemidir. Agar dilüsyon çok sayıda bakteri izolatının sınırlı sayıda konsantrasyonda ve sınırlı sayıdaki antimikrobiyal ajanla test edilmesinde uygun bir yöntemdir (Kadlec ve ark., 2015).

Lateks Aglutinasyon Testi

Lateks aglutinasyon testi, kolay uygulanabilmesi ve düşük maliyetli olması nedeniyle oldukça sık kullanılan bir metottur. Protein bağlayıcı proteinin (PBP2a) saptanmasını temel alan hızlı bir aglutinasyon testidir. *S. aureus* için testin duyarlılık ve özgülüğü oldukça yüksektir (Ünal, 1996; Velasco ve ark. 2005).

2.11.3. Moleküler Yöntemler

Metisilin direncinin heterojen ekspresyonundan dolayı MRSA süşları fenotipik metodlarla her zaman doğru olarak tanımlanamamaktadır.MRSA'ların tanımlanmasında polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve DNA mikroarray teknikleri ile *mecA* geninin varlığının belirlenmesi altın standart olarak kabul edilmektedir (Brown ve ark., 2005; Chongtrakool ve ark., 2006).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Testleri

Antimikrobiyal direncin belirlenmesi amacıyla yapılan genotipik testler bakterilerde direnç genlerinin tespitinde kullanılmaktadır (Wendlandt ve ark., 2013a). Stafilokoklarda metisilin direncinin belirlenmesinde genotipik olarak *mecA* geninin saptanmasının fenotipik yöntemlere kıyasla daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle günümüzde konvansiyonel PCR yönteminin yanısıra, *mecA* geni ve *S. aureus*'u (16S rRNA, *nuc* genleri) eşzamanlı olarak tespit etme yeteneğine sahip olan gerçek zamanlı PCR (Real-Time PCR) testi de kullanılmaktadır (Wang ve ark., 2014).

PCR testinin avantajları; çok spesifik, hızlı ve gerçekleştirilmesi kolay olması ve PCR ürünlerinin ihtiyaç duyulduğunda kullanılmak üzere saklanabilmesidir. Dezavantajları ise pozitif kontrollere ihtiyaç duyulması ve zaman alıcı olmasıdır (Kadlec ve ark., 2015).

DNA Mikroarray Testi

Yaygın olarak kullanılan bu tanı yönteminde *S. aureus*'a özgü DNA mikroarray kitleri (StaphyType, Alere Technologies, Jena, Almanya) kullanılmaktadır. Bu DNA mikrodizisi antimikrobiyal direnç genleri de dahil olmak üzere toplam 330 farklı gen ve alleli tanımaktadır. Diziler tüplere veya striplere monte edilir ve ilke olarak tüm hedefler bir primer uzama reaksiyonunda çoğaltılır ve etiketlenir. Hedef başına tek bir primer kullanıldığından reaksiyon doğrusaldır ve tek bir multipleks reaksiyonda tüm hedefleri aynı anda tespit etmeyi sağlamaktadır (Kadlec ve ark., 2009; Monecke ve ark., 2011). DNA mikroarray testi ile çok sayıda direnç geni ve diğer genlerin aynı anda tespit edilebilmesi büyük bir avantajdır (Kadlec ve ark., 2015).

2.12. Korunma ve Kontrol

Stafilokokal gıda zehirlenmeleri; başta enterotoksijenik stafilokok suşları, nadiren de koagulaz negatif stafilokokların gıdalar ile alınması sonucu şekillenen en yaygın gıda kaynaklı hastalıklardan birisidir. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi tarafından 2006-2008 yılları yapılan değerlendirmede stafilokokal gıda zehirlenme olgularının tüm gıda zehirlenmeleri içerisindeki oranının %5 düzeyinde olduğu bildirilmiştir (Hennekinne ve ark., 2012). Stafilokokal intoksikasyonların asıl nedenleri arasında gıdaların yetersiz pişirilmesi ve soğutulması ile yetersiz personel hijyeni bulunmaktadır. Gıda kaynaklı stafilokokal zehirlenme olgularının önlenmesi için özellikle ısıtma işlem görmüş gıdaların insanlar tarafından kontamine edilmesinin önlenmesi, gıdaların uzun süre ortam sıcaklığında tutulmaması, soğuk zincirin sağlanması, çiftlikten çatala kadar alet ve ekipmanların dezenfeksiyonunun sağlanması gerekmektedir (Bhatia ve Zahoor, 2007; Erol, 2007; Hennekinne ve ark., 2012).

Stafilokokal intoksikasyonlardan korunma ve kontrolde aşağıda belirtilen hususlara dikkat edilmelidir (Erol, 2007).

-Personel hijyeni: Stafilokokların insanlardan gıdalara bulaşmasının önlenmesi için personel hijyenine yönelik etkin ve titiz uygulamalar yapılmalı, ellerin temizlik ve dezenfeksiyonuna dikkat edilmeli, gerektiği yerde eldiven, bone ve ağız maskesi kullanımına özen gösterilmeli, çalışanların çıplak elle gıdalara temas etmesi ve yaralı eller ile çalışmaları önlenmelidir.

-Isı işlemleri görmüş ürünlerin rekontaminasyonu önlenmeli ve soğuk muhafazası (<6,7°C) sağlanmalıdır.

-Gıdalarla temas edecek yüzeyler ile alet ve ekipmanın temizlik ve dezenfeksiyonu etkin bir şekilde yapılmalıdır.

-Süt veren hayvanlarda meme sağlığına ve sağım hijyenine özen gösterilmeli, süt ürünleri üretiminde pastörize süt kullanımı ve pastörizasyon sonrası kontaminasyonun önlenmesine edilmelidir.

-Gıda teknolojisindeki uygulanan fermentasyon, ısı işlemleri, soğutma, uygun koşullarda muhafaza gibi işlemlerle stafilkokların gıdalarda çoğalması ve toksin oluşturması önlenmelidir.

-Gıda işletmelerinde tehlike analizleri, iyi üretim ve hijyen uygulamalarına yönelik gıda güvenliği sistemlerinin (HACCP) etkin ve kontrollü kullanımı sağlanmalıdır.

Bu tez çalışmasında küçük orta ve büyük ölçekli aile işletmelerinden elde edilen manda sütü ve ürünlerindeki a) *S. aureus* varlığının klasik yöntemle izolasyon ve identifikasyonu, b) İzolatların PCR tekniği ile doğrulanması, c) *S. aureus* izolatları içinde enterotoksin genleri varlığının PCR yöntemi ile saptanması, d) İzolatların metisilin dirençliliklerinin fenotipik ve genotipik (*mecA*) olarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu çalışmada Kasım 2012 - Mayıs 2013 tarihleri arasında Samsun iline bağlı 4 ilçede (Çarşamba, Bafra, Terme ve 19 Mayıs) manda yetiştiriciliği yapan 30 işletmeden elde edilen 100 adet manda sütü, 50 adet manda kaymağı ve 50 adet manda peyniri olmak üzere toplam 200 adet örnek materyal olarak kullanıldı (Tablo 16). İşletmeler içerdikleri manda sayılarına göre küçük (5-10 baş), orta (10-50 baş) ve büyük (50 ve üstü) ölçekli olmak üzere sınıflandırıldı (Tablo 17).

Tablo16. Çalışmada temin edilen numunelerin ilçe ve işletme bazlı dağılımı

İlçeler	İşletme sayısı	Manda sütü	Manda kaymağı	Manda peyniri
Bafra	15	50	37	32
19 Mayıs	6	25	13	18
Terme	5	15	-	-
Çarşamba	4	10	-	-
Toplam	30	100	50	50

Tablo 17. Çalışmada seçilen işletmelerin manda sayısına göre dağılımı

İlçeler	Manda sayısı (baş)				Toplam
	5-10 arası	10-20 arası	20-50 arası	50 ve üstü	
Bafra	5	4	3	3	15
19 Mayıs	2	1	2	1	6
Terme	2	2	1	-	5
Çarşamba	3	1	-	-	4
Toplam	12	8	6	4	30

Temin edilen 100 manda sütü belirlenen işletmelerden sağım esnasında bizzat toplanarak, sütlerin temini esnasında genel işletme şartları, meme hijyeni, sağım yapan personelin hijyeni gibi hususlar takip edildi. Çalışmada kullanılan süt örnekleri mandaların ahırda oldukları Kasım-Mayıs ayları arasındaki altı aylık dönemde temin

edildi. Toplanan örnekler soğuk zincir altında mümkün olan en kısa sürede laboratuvara getirildi.

3.1.1. *S.aureus*'un İzolasyon ve İdentifikasyonunda Kullanılan Malzemeler

Peptone Water (Maximum Recovery Diluent) (Merck 1.12535, Almanya)

Bileşimi: 1 gr pepton, 8,5g NaCl

Hazırlanışı: Besiyerinden 9,5 g tartıldı ve 1000 ml distile suda çözündürüldü. pH değeri $7,0 \pm 0,2$ olarak ayarlandı. Cam tüplere 9'ar ml konularak otoklavda 121°C 'de 15 dakika steril edildi. Tamamen soğutulduktan sonra 4°C 'de muhafaza edildi.

Tween 80 (Merck 8.22187)

0,1 ml/L şeklinde hazırlandı.

Baird-Parker Agar Base (BPA) (Merck 1.05406)

Hazırlanışı: Besiyerinden 58 g tartıldı ve 950 ml distile suda çözündürüldü. pH değeri $6,8 \pm 0,2$ olarak ayarlandı. Su banyosunda 95°C 'de eritildi. Daha sonra besiyeri otoklavda 121°C 'de 15 dakika steril edildi. Otoklavdan çıkan besiyeri 45°C 'ye kadar soğutuldu. Üzerine önceden oda sıcaklığına getirilmiş 50 ml Egg-Yolk Tellurite Emulsion (Merck 1.03785) ilave edilip karıştırıldı. Besiyeri steril plastik petrilere döküldü. Analize kadar $+4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi.

Egg-Yolk Tellurite Emulsion %20 (Merck 1.03785)

Bileşimi: 200 ml steril Egg-Yolk (yumurta sarısı), 4,25 g NaCl ve 2,1 g Potassium tellurite 1 litre steril distile su içerir.

Hazırlanışı: 50 ml şişe içeriği; 950 ml olarak hazırlanıp sterilize edilen ve otoklav sonrası 45°C 'e soğutulan Baird-Parker Agar besiyerine ilave edildi. Hazırlanan besiyeri analize kadar $+4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi.

Brain Hearth Broth (BHI) (Merck 1.10493)

Hazırlanışı: Besiyerinden 37 g tartıldı ve 1000 ml distile suda çözündürüldü. pH değeri $7,4 \pm 0,2$ olarak ayarlandı ve cam tüplere 10'ar ml konularak otoklavda 121°C 'de 15 dakika steril edildi. Otoklavdan çıkan besiyeri 50°C 'ye kadar soğutuldu ve 4°C 'de muhafaza edildi.

Tryptone Soya Agar (TSA) (Merck 1.05458)

Hazırlanışı: Besiyerinden 40 g tartıldı ve 1000 ml distile suda çözüldürüldü. pH değeri $7,3 \pm 0,2$ olarak ayarlandı ve su banyosunda 95°C 'de eritildi. Daha sonra besiyeri otoklavda 121°C 'de 15 dakika steril edildi. Otoklavdan çıkan besiyeri 50°C 'ye kadar soğutuldu. Steril plastik petrilere döküldü ve 4°C ' de muhafaza edildi.

Tryptic Soy Broth (TSB) (Merck 1.05459)

Hazırlanışı: Besiyerinden 30 g tartıldı ve 1000 ml distile suda çözüldürüldü. pH değeri $7,3 \pm 0,2$ olarak ayarlandı. Amaca uygun olarak tüplere dağıtıldı. Otoklavda 121°C 'de 15 dakika steril edildi. Steril plastik petrilere döküldü ve 4°C ' de muhafaza edildi.

DNase Agar (Merck 1.10449)

Hazırlanışı: Besiyerinden 42 g alınarak 1000 ml distile su içerisinde çözüldürüldü. pH değeri $7,3 \pm 0,2$ olarak ayarlandıktan sonra, sıcak su banyosunda tamamen eritildi. Daha sonra besiyeri 121°C 'de 15 dk otoklavda sterilize edildi. Besiyeri 50°C 'ye soğutulduktan sonra steril petrilere 12-13 ml miktarında döküldü.

Purple Broth Base (PBB) (HiMedia M284, Mumbai, Hindistan)

Hazırlanışı: Besiyerinden 15,02 g tartıldı ve 1000 ml distile suda çözüldürüldü. pH değeri $6,8 \pm 0,2$ ayarlandıktan sonra cam tüplere 9'ar ml paylaştırıldı ve otoklavda 121°C 'de 15 dakika steril edildi. Hazırlanan besiyeri soğutulduktan sonra içine %0,5 oranında steril şeker solusyunu ilave edildi.

Mannitol Solüsyonu

Bileşimi: Mannitol (Merck 1.05980), Distile su 100ml

Glukoz Solüsyonu

Bileşimi: Glukoz (Merck 1.08342), Distile su 100ml

Hazırlanışı: Şekerlerden 5'er g tartılarak 100 ml distile su içinde çözüldürüldü. %0,5 oranında çözelti hazırlandı. Hazırlanan bu çözelti $0,45 \mu\text{m}$ por genişliğine sahip steril filtre ile (Corning, MA - USA) steril edildi ve kullanıma hazır hale getirildi.

MR-VP Broth (Merck 1.05712)

Hazırlanışı: Besiyerinden 17 g tartıldı 1000 ml distile suda çözüldürüldü. pH değeri $6,9 \pm 0,2$ ayarlandıktan sonra cam tüplere paylaştırıldı. 121°C 'de 15 dakika steril edildi.

 α -naftol (Merck 1.06223)

5g α -naftol 100 ml %96 alkol içinde hazırlandı

Potassium Hydroxide (Merck 1.05033)

%40'lık konsantrasyonda hazırlandı.

Koyun Kanlı Agar (Oxilab)

Kullanıma hazır 20'li paket

Bactident Coagulase (Merck 1.13306)

EDTA ilave edilmiş liyofilize tavşan plazmasıdır.

Hazırlanışı: Bir pakette EDTA ilave edilmiş liyofilize tavşan plazması içeren 6 adet şişe bulunur. Her şişe üzerine 3 ml steril damıtık su ilave edilerek karıştırıldı. Bundan 0,3 ml'si 1 örnek analizi için tüpte koagulaz testinde kullanıldı.

Staphaurex Plus (Remel R30950102, Dartford, EN)

Bağlı koagulaz (clumping factor) tespiti için hazır Remel Staphaurex Plus aglütinasyon test kiti kullanıldı.

Katalaz Testi

Hidrojen Peroksit %30 (H_2O_2) (Merck 8597)

Hazırlanışı: Ticari %30'luk H_2O_2 'den 3 ml alındı ve 27 ml distile su ile karıştırıldı ve %3 lük H_2O_2 solüsyonu elde edildi.

3.1.2. PCR Analizlerinde Kullanılan Malzemeler**Proteinase K (Sigma P6556, USA)**

10mg/ml Proteinase K

Tris (Merck 1.082129)

0,1 M Tris pH 7,5

Lysostaphin (Sigma L7386)

Hazırlanışı: 1 mg lysostaphin 10 ml steril distile su içerisinde sulandırılarak 100 µg/ml'lik konsantrasyon elde edildi. Bu karışım 1'er ml'lik hacimlerde ependorf tüplere paylaştırıldı. Tüpler -20°C'de muhafaza edildi.

DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific SM0243)

100 bp DNA Ladder

Tris EDTA Buffer (Sigma T9285)

100X Tris EDTA Buffer, 1X hacimde TE buffer solüsyonu kullanıldı.

Taq DNA Polymerase Seti (Thermo Fisher Scientific EP0402, Litvanya)

100 µl Taq DNA Polymerase 500 units, 5U/µl

1,25 ml 10X Taq Buffer with KCl

1,25 ml 10X Taq Buffer with (NH₄)₂SO₄

1,25 ml 25mM MgCl₂

dNTP Mix (Thermo Fisher Scientific R0193)

10mM dNTP Mix (dATP, dTTP, dGTP ve dCTP karışımı içerir)

TBE Solüsyonu (Thermo Fisher Scientific B52)

10X TBE buffer (Tris-borate-EDTA)

Hazırlanışı: 10X konsantrasyonda olan TBE buffer solüsyonundan 100 ml alınarak 1 litreye tamamlandı. Elde edilen 1X konsantrasyon analiz için kullanıldı.

Loading dye (Thermo Fisher Scientific R0611)

6X DNA Loading dye

Primerler (Iontek, İstanbul)

Primerler Iontek firması tarafından sentezlendi. Üretici firmanın önerdiği miktarlarda steril bidistile su ile 100 pmol konsantrasyonda hazırlandı.

Hedef gen	Primer dizisi	bp
16S rRNA	F: 5' AAC TCT GTT ATT AGG GAA GAA CA 3'	750
	R: 5' CCA CCT TCC TCC GGT TTG TCA CC 3'	
<i>nuc</i>	F: 5' AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA 3'	279
	R: 5' GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT 3'	
<i>mecA</i>	F: 5' GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA 3'	310
	R: 5' CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A 3'	
<i>sea</i>	F: 5' GGTTATCAATGTGCGGGTGG 3'	102
	R: 5' CGGCACTTTTTTCTCTTCGG 3'	
<i>seb</i>	F: 5' GTATGGTGGTGTAACTGAGC 3'	164
	R: 5' CCAAATAGTGACGAGTTAGG 3'	
<i>sec</i>	F: 5' AGATGAAGTAGTTGATGTGTATGG 3'	451
	R: 5' CACACTTTTAGAATCAACCG 3'	
<i>sed</i>	F: 5' CCAATAATAGGAGAAAATAAAAAG 3'	317
	R: 5' ATTGGTATTTTTTTTCGTTC 3'	
<i>see</i>	F: 5' AGGTTTTTTCACAGGTCATCC 3'	209
	R: 5' CTTTTTTTTCTTCGGTCAATC 3'	

Agarose (Sigma A9539)

Hazırlanışı: 1,5 g agaroz tartıldı ve 100 ml 1X TBE ile sulandırıldı. Daha sonra mikrodalga fırında eritildi. 50°C'ye soğutulduktan sonra içerisinde 5 µl ethidium bromide (10 mg/ml) ilave edilerek kullanıldı.

Ethidium Bromide (Applichem A1152, USA)

Ethidium Bromide solution, %1, 10 mg/ml

Hazırlanışı: 10 mg/ml konsantrasyonunda ethidium bromide solüsyonundan 5 µl alındı ve 100 ml agaroz içinde kullanıldı.

3.1.3. Antibiyotik Dirençliliğinin Belirlenmesinde Kullanılan Malzemeler

Mueller Hinton Agar (MHA) (Oxoid CM0337)

Hazırlanışı: Besiyerinden 38 g tartıldı ve 1000 ml distile su içerisinde çözüldürüldü. pH değeri 7,3 ± 0,1'e ayarlandı. Su banyosunda 95°C'de eritildi. Daha

sonra besiyeri otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildi. Otoklavdan çıkan besiyeri 45°C'ye kadar soğutuldu ve steril plastik petrilere döküldü.

Antibiyotik Diskleri

Oxacillin 1µg (Oxoid CT0159B, Hampshire, UK)

Cefoxitin 30 µg (Oxoid CT0119B, Hampshire, UK)

E-Test Stripleri

E-TEST Oxacillin (Biomerieux 520518, USA)

E-TEST Cefoxitin (Biomerieux 506518, USA)

3.2. Metot

Soğuk zincirde laboratuvara getirilen çiğ manda sütü ve süt ürünlerinde i) ilk aşamada *S. aureus*'un izolasyon ve identifikasyonu EN ISO 6888-1-2:1999'de belirtilen yöntemle göre yapıldı (ISO, 1999). ii) Klasik kültür yöntemi ile elde edilen *Staphylococcus* spp. ve *S. aureus* izolatları 16S rRNA ve *nuc* genleri varlığı yönünden PCR ile doğrulandı (Brakstad ve ark., 1992; Maes ve ark., 2002). iii) *S. aureus* pozitif bulunan izolatlardaki enterotoksin genlerin (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* ve *see* genleri) varlığı multipleks PCR ile belirlendi (Mehrotra ve ark. 2000). iv) Son aşamada *S. aureus* izolatlarının metisilin dirençliliği fenotipik olarak disk difüzyon ve E-test ile (CLSI, 2011) genotipik olarak ise *mecA* geni varlığı yönünden PCR ile belirlendi (Geha ve ark., 1994).

3.2.1. *S. aureus*'un İzolasyon ve İdentifikasyonu

Örneklerin Alınması ve Mikrobiyolojik Ekimler

Manda sütü ve süt ürünlerinde *S. aureus*'un izolasyon ve identifikasyonunda EN ISO 6888-1-2:1999 metodu (The International Standards Organization-Uluslararası Standartlar Organizasyonu) kullanıldı (Şekil 3) (ISO, 1999). Aseptik koşullarda 200 ml/g alınan örnekler soğuk zincir altında laboratuvara getirildi. 10 g/ml örnek stomacher poşetine alınarak üzerine 90 ml peptonlu su ilave edildi ve stomacherda (Interscience Bagmixer 400) orta hızda 3 dk homojenize edildi. Kaymak ve peynir numunelerinin homojenizasyonun sağlanması için 90 ml peptonlu su içerisine steril %1 Tween 80 (Merck 8.22187) ilave edildi. Daha sonra elde edilen bu homojenattan 1 ml alınarak içinde 9 ml peptonlu su bulunan tüplere geçildi ve desimal dilüsyonlar 10⁻⁷'e kadar

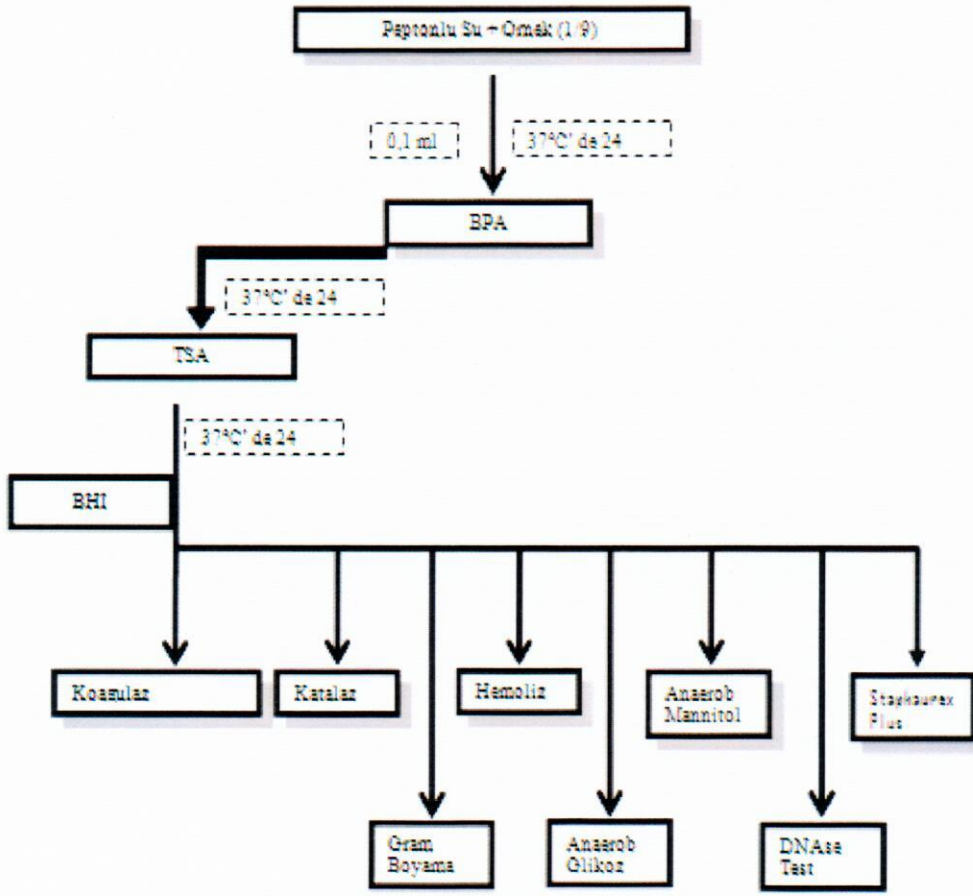
hazırlandı. Hazırlanan dilüsyonlardan 0,1 ml alınarak Baird-Parker agara (Merck 1.05406, Egg Yolk Tellürite Emulsion Merck 1.03785) yayma plak tekniği ile ekim yapıldı. Petriler 37°C’de 24-48 saat süre ile aerob ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda üreme saptanan plaklarda toplam mikrokok/stafilokok düzeyi belirlendikten sonra, plaklarda üreyen 1-3 mm çapında siyah, koyu kahverengi, konveks, kenarları düzgün ve etrafı haleli lesitinaz pozitif tipik koloniler ile etrafı halesiz atipik kolonilerden 3-5 adet koloni seçildi (Şekil 4).

Baird-Parker agarda (Merck 1.05406) örnekleme yoluyla seçilen tipik ve/veya atipik koloniler TSA (Merck 1.05458) besiyerine geçildi ve 37°C’de 24 saat aerob ortamda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra koagülaz pozitif stafilokokların saptanması için katı besiyerlerindeki izolatlar BHI broth’a (Merck 1.10493) geçildi ve 24 saat 37°C’de aerob ortamda inkübasyona bırakıldı. Liyofilize tavşan plazması (Bactident Coagulase Rabbit Plasma with EDTA-Merck 1.13306) ile tüpte koagülaz test yapıldı. Test sonucunda 3⁺ ve 4⁺ reaksiyon veren izolatlar koagülaz pozitif stafilokoklar olarak değerlendirildi. Daha sonra koagülaz pozitif olarak değerlendirilen stafilokoklarda clumping faktör Staphaurex Plus Test Kit (Remel) kullanılarak belirlendi (Şekil 7).

Biyokimyasal testler sonucunda Gram pozitif, kanlı agarda hemoliz yapan, katalaz, asetoin ve DNase test pozitif, anaerob glikoz ve mannitol şekerleri fermente izolatlar *S. aureus* olarak tanımlanmıştır (Lancette ve Tatini, 1992; Baumgart, 1997; Bennett ve Lancette, 1998; Bridson, 2008).



Şekil 3. Baird-Parker agarda *Staphylococcus* spp. kolonilerinin görünüşü

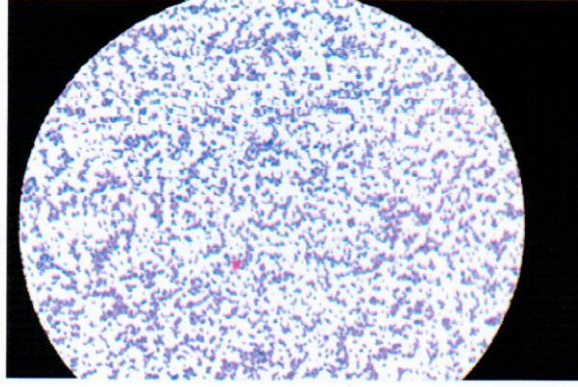


Şekil 4. *S. aureus*'un izolasyon ve identifikasyon şeması

Biyokimyasal Testler

Gram Boyama

TSA'da (Merck 1.05458) üreyen taze kolonilerden öze ile 1-2 tane alınıp temiz bir lam üzerine yayıldı. Steril fizyolojik tuzlu su ile homojen hale getirildi. Lam oda sıcaklığında kurutulduktan sonra birkaç defa alevden geçirilerek tespit edildi. Preperatlar sırasıyla 2 dk kristal viyole, 2 dk lugol solüsyonu ile boyandı. Boya döküldükten sonra %95'lik etil alkol-su ile 20-30 sn yıkandı. Daha sonra 30 sn karbol fuksin ile boyandı, boya döküldüp yıkandı ve lam kurutuldu. Hazırlanan preperatlar Olympus (CX 21) mikroskop ile 100X büyütmede immersiyon yağı damlatılarak incelendi. Mikroskopik bakı sonucunda Gram boyama sonucunda mor renkli, üzüm salkımı görünümünde koklardan oluşan koloniler pozitif olarak kabul edildi (Şekil 5) (Harrigan, 1998).



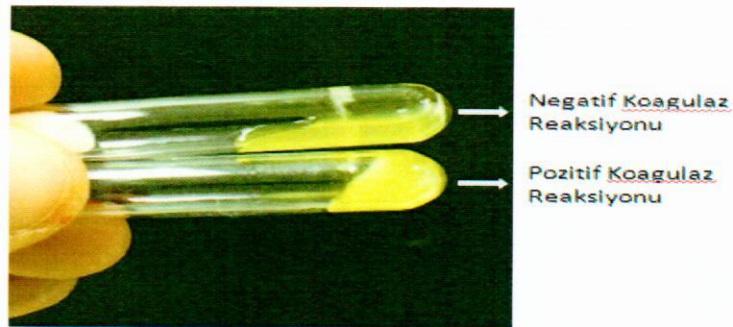
Şekil 5. *Staphylococcus* spp. kolonilerinin gram boyama görüntüsü

Koagulaz Testi

Serbest koagulazı tespit etmek için liyofilize tavşan plazması kullanılarak tüpte koagulaz testi, bağlı koagulazı (clumping faktör) tespit etmek için ise Staphaurex Plus test kiti kullanılarak lateks aglütinasyon testi yapıldı.

Tüpte Koagulaz Test

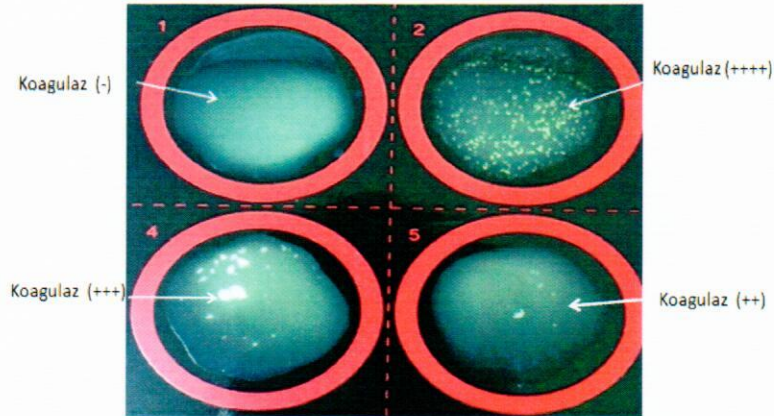
TSA'da üreyen taze kolonilerden kolonilerden BHI broth'a (Merck 1.10493) geçilerek 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi. Liyofilize tavşan plazması (Merck 1.13306) 3 ml steril distile su ile sulandırıldıktan sonra steril koagulasyon tüplerine 0,3'er ml olarak dağıtıldı. Daha sonra üzerine 18-24 saatlik sıvı kültürlerinden 0,1 ml ilave edilip, 37°C'de aerob koşullarda inkübasyona bırakıldı. İlk 6 saat boyunca 30 dk'lık periyotlar halinde kontroller yapıldı ve pıhtılaşma oranları +1, +2, +3 ve +4 olarak değerlendirildi. Pıhtı gözlenen ve +3, +4 olarak değerlendirilen tüpler koagulaz (+) olarak belirlendi. Koagulasyon olmayan veya yeterli oranda pıhtı şekillenmeyen tüpler 24 saat inkübasyona bırakılarak tekrar kontrol edildi (Bennett ve Lancette, 1998) (Şekil 6).



Şekil 6. Tüpte koagulaz testi

Clumping Faktör (Staphaurex Plus Lateks Aglütinasyon Testi)

Staphaurex Plus (Remel R30950102) test ile *S. aureus* suşlarının koagülaz enzimi üretip üretmediği 20 saniye içinde lateks aglütinasyon prensibine göre saptanır. Reaksiyon kartında *S. aureus* kolonileri ile lateks test reaktifi karşılaştığında mikroorganizmada mevcut bağlı koagülaz, fibrinojenle birleşerek gözle görülebilen bir aglütinasyon oluşturur. Bu amaçla -20°C'de muhafaza edilen izolatlar BHI broth'da (Merck 1.10493) 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda taze kültürden 0,1 ml alınarak reaksiyon kartı üzerine damlatıldı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda bir damla Staphaurex Plus test lateks ve 1 damla Staphaurex Plus kontrol lateks ilave edilerek steril öze ile karışmaları sağlandı. Yaklaşık 30 saniye içinde oluşan aglütinasyon derecelerine göre koagülaz 3⁺ ve 4⁺ izolatlar pozitif kabul edildi (Şekil 7).



Şekil 7. Staphaurex plus lateks aglütinasyon testi

Katalaz Testi

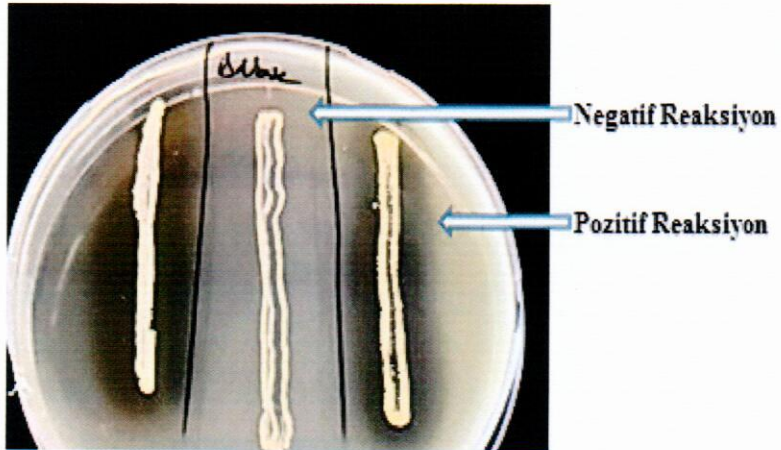
TSA'da üreyen kolonilerden 1-2 tane temiz bir lam üzerine alındı ve üzerlerine 1 ml %3'lük H₂O₂ damlatıldı. 1-2 sn içinde oluşan köpürme ve gaz çıkışı katalaz pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 8) (Bennett ve Lancette, 1998).



Şekil 8. Katalaz testi

DNase Testi

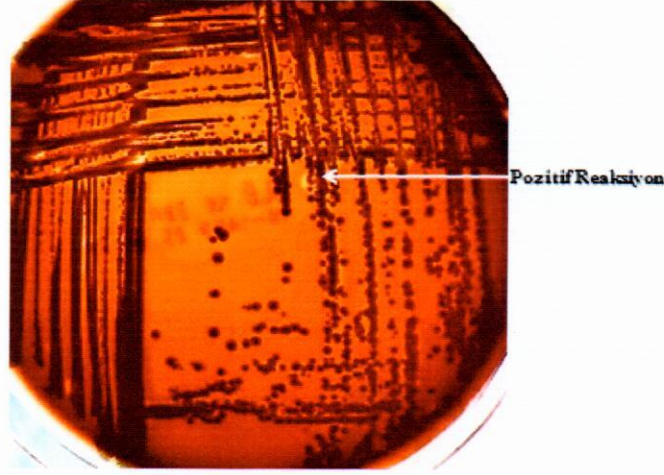
Bu test, mikroorganizmaların ısıya dayanıklı olan deoksiribonuklease (DNase) enzimini sentezleyebilme yeteneklerini ölçmede kullanılır. TSA'da üreyen koloniler içinde 4-5 ml BHI broth (Merck 1.10493) bulunan tüplere inokule edildi. Broth 37°C'de 18-24 saat aerob koşullarda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda sıvı brothdan bir öze dolusu alınarak DNase Agar'a (Merck, 1.10449) çizme plak yöntemi ile ekim yapıldı ve plaklar 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda DNase agarda üreyen kolonilerin üzeri 1N HCl ince bir tabaka halinde yayıldı. Birkaç dakika içinde kolonilerin etrafında berrak bir zonun oluşması pozitif, opak bir alanın oluşması ise negatif olarak değerlendirildi (Bennett ve Lancette, 1998; Anon, 2014) (Şekil 9).



Şekil 9. DNase testi

Kanlı Agarda β -Hemoliz Testi

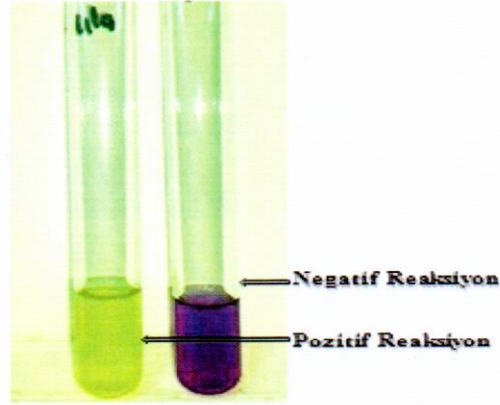
S. aureus kolonilerinin kanlı agarda β -hemoliz oluşturma özellikleri düzgün bir hat ile çevrili berrak bir zon oluşturmalarına bakılarak tespit edildi. BHI broth (Merck 1.10493)' da kültüre edilen kolonilerden 1-2 öze dolusu alınıp kanlı agara çizme yöntemi ile ekim yapıldı. Plaklar 37°C'de 24-48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda berrak hemoliz zonu oluşturan koloniler β -hemoliz pozitif kabul edildi (Şekil 10).



Şekil 10. Kanlı agarda β -hemoliz

Karbonhidrat Fermentasyon Testleri

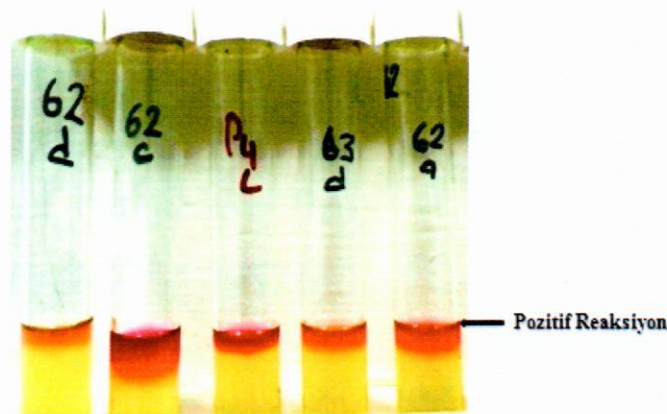
Hazırlanan Purple Broth Base (HiMedia M284) cam tüplere 9'ar ml paylaştırıldı. Şeker solüsyonları %5 konsantrasyonda hazırlandı. 0,22 μ m por çapında steril filtreden geçirildi ve içinde Purple Broth Base bulunan tüplere 1'er ml aktarıldı. Tryptone Soya Agar'da üreyen koloniler içerisinde karbonhidrat olan bu tüplere inoküle edilerek tüpler steril parafin ile kapatıldı. Bunu takiben tüpler 37°C'de 5 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda besiyeri renginin sarıya dönüşmesi pozitif, renk değişikliğinin olmaması negatif reaksiyon olarak kabul edildi (Bennett ve Lancette, 1998; Harrigan, 1998) (Şekil 11).



Şekil 11. Mannitol pozitif ve negatif izolatlar

Voges Proskauer Testi (Asetoin Testi)

Bu test, mikroorganizmaların glikozu fermente ederek nötral bir ürün olan acetyl methyl carbinol (acetoin) meydana getirme yeteneğinin tayininde kullanılmaktadır. TSA'da üreyen koloniler MR-VP broth (Merck 1.05712)'a geçilerek 37°C de 2-4 gün inkube edildi. İnkübasyon sonunda MR-VP broth besiyerinden 2 ml alınarak üzerine 0,6 ml α -naftol (%5'lik) çözeltisi ve 0,2 ml %40'luk potasyum hidroksit (KOH) (%0,5 kreatin içeren) ilave edilerek karıştırıldı. 15 dakika içinde üst kısımda pembeden parlak kırmızıya kadar değişen halka oluşumu pozitif, halka oluşmaması ise negatif reaksiyon olarak değerlendirildi (Voges ve Proskauer, 1989; Harrigan, 1998) (Şekil 12).



Şekil 12. Voges proskauer testi (Asetoin testi)

3.2.2. *S. aureus*'un PCR ile Doğrulanması

Biyokimyasal testler sonucu *S. aureus* pozitif veya şüpheli olarak tespit edilen izolatlar PCR tekniği kullanılarak doğrulandı. Bu amaçla öncelikle izolatların genomik DNA ekstraksiyonu yapıldı. *Staphylococcus* spp.'ye özgü 16S rRNA geni ve *S. aureus*'a özgü *nuc* geni primerleri kullanıldı. *S. aureus* izolatlarının metisilin direncinin belirlenmesinde ise altın standart olarak kabul edilen *mecA* genine ait primerler kullanıldı. 16S rRNA, *nuc* ve *mecA* genleri aynı master miks içinde hazırlandı ve multipleks PCR işlemi gerçekleştirildi. Amplifikasyon işlemleri sonrası elde edilen PCR ürünleri %1,5'lük agaroz jel elektroforezde yürütülerek elde edilen DNA bantları UV transiluminatör yardımıyla görüntüledi.

Genomik DNA Ekstraksiyonu

Genomik DNA ekstraksiyonu Ünal ve ark. (1992) ve Maniatis ve ark. (1982) tarafından belirtilen yönteme göre yapıldı. -20°C'de muhafaza edilen izolatlar BHI broth'da 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda taze kültürden 0,1 ml alınarak 12 000 rpm'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Dipte kalan tortu 50 µl lizostafin (100 µg/ml) (Sigma L7386) içerisinde süspanse edildi. Daha sonra kuru blok ısıtıcıda (Biosan Bio TDB-100, İstanbul, Türkiye) 37°C'de 10 dk inkübe edildi ve hücre süspanسیونuna 50 µl proteinaz K (Sigma P6556) (100µg/ml) ve 150 µl buffer solüsyonu (0,1 M Tris, pH 7.5) ilave edilerek tekrar 37°C'de 10 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından tüpler kuru blok ısıtıcı içerisinde 95°C'de 5 dk tutuldu. Elde edilen genomik DNA hemen buz üzerine alınarak analize kadar -20°C'de muhafaza edildi.

16S rRNA, *nuc* ve *mecA* Genlerinin Multipleks PCR İle Tespiti

16S rRNA gen varlığının belirlenmesi Maes ve ark. (2002), *nuc* (termonükleaz) gen varlığının belirlenmesi ise Brakstad ve ark. (1992) tarafından önerilen primer dizileri kullanılarak yapıldı. *mecA* gen varlığının belirlenmesinde Geha ve ark. (1994), tarafından belirtilen primer dizileri kullanıldı (Tablo 18). Pozitif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 43300 kullanıldı. Hazırlanan master miks ve PCR koşulları Tablo 19 ve Tablo 20'de belirtildi. PCR amplifikasyonu sonucu PCR ürünleri UV transiluminatörde görüntülenerek 750 bp'de görüntülenen bantlar 16S rRNA geni, 279

bp görüntülenen bantlar *nuc* geni, 310 bp'de görüntülenen bantlar ise *mecA* geni pozitif olarak kabul edildi.

PCR miksinin hazırlanması için toplam 25 µl hacimde 1X PCR buffer (500 mM KCl, 200 mM Tris HCl), 0,2 mM dNTPs, 2mM MgCl₂, 2 U *Taq* DNA polimeraz, 0,6 µM primer (16S rRNA geni için) 0,4 µM primer (*nuc* ve *mecA* geni için) ve 3 µL template DNA olacak şekilde karışım tüpte hazırlandı (Tablo 19). 16S rRNA, *nuc* ve *mecA* genleri için hazırlanan master miksten 22 µl alınarak üzerine 3 µl genomik DNA ilave edildi. Hazırlanan tüpler termal cycler (Bio-Rad MJ Mini-PTC-1148) cihazına yerleştirildi. 94°C'de 5 dakika ön denatürasyon, takiben 30 siklus, 94°C'de 2 dakika denatürasyon, 52°C'de 2 dakika bağlanma, 72°C'de 2 dakikada uzama, 72°C'de 7 dakika final uzama olacak şekilde cihaz ayarlandı (Tablo 20).

Tablo 18. 16S rRNA, *nuc* ve *mecA* genlerine ait primer dizileri

Gen	Primer Dizisi	bp	Kaynak
16S rRNA	F: 5' AAC TCT GTT ATT AGG GAA GAA CA 3' R: 5' CCA CCT TCC TCC GGT TTG TCA CC 3'	750	Maes ve ark. (2002)
<i>nuc</i>	F: 5' AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA 3' R: 5' GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT 3'	279	Brakstad ve ark. (1992)
<i>mecA</i>	F: 5'GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA 3' R: 5'CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A 3'	310	Geha ve ark. (1994)

Agaroz Jel Elektroforez

Elektroforez işlemi için %1,5'lik agaroz 1X TBE (Tris-borate-EDTA) (Thermo Fisher Scientific B52) içinde hazırlandı ve içine 5 µl (10 mg/ml) Ethidium bromide (Appllichem, A1152) ilave edildi. Hazırlanan agaroz mikrodalga fırında eritildi. PCR ürününden 25 µl alınarak 3 µl loading dye (Thermo Fisher Scientific R0611) ile boyandı ve jeldeki kuyucuklara yüklendi. Kuyucuklara DNA marker, pozitif ve negatif kontrol yüklendikten sonra 90 volt elektrik akımında 50 dk süreyle elektroforez işlemi yapıldı (BioRad CA - USA). Elektroforez sonunda genler UV transilluminatörde (Wise-UVWuv-L50, DAIHAN Scientific, Seoul, Korea) görüntülendi.

Tablo 19. 16S rRNA, *nuc* ve *mecA* genleri için master miks hazırlanması

Reaktif	Final Konsantrasyon	Volum
10XPCR buffer	1 X	2,5 µl
25 mM MgCl ₂	2 mM	2 µl
10 mM dNTP)	0,2 mM	0,5 µl
16S rRNA Primer- F (20 pmol)	0,6 µM	0,75 µl
16S rRNA Primer- R (20 pmol)	0,6 µM	0,75 µl
<i>nuc</i> Primer - F (20 pmol)	0,4 µM	0,5 µl
<i>nuc</i> Primer - R (20 pmol)	0,4 µM	0,5 µl
<i>mec</i> Primer - F (20 pmol)	0,4 µM	0,5 µl
<i>mec</i> Primer - R (20 pmol)	0,4 µM	0,5 µl
5U <i>Taq</i> polimeraz	2U	0,2 µl
DNA		3 µl
dH ₂ O		Son volüme tamamlanır
Total Volum		25 µl

Tablo 20. 16S rRNA, *nuc* ve *mecA* genleri için termal cykler programı

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
Başlangıç denatürasyonu	1	94°C	5 dk
Denatürasyon	30	94°C	2 dk
Bağlanma	30	52°C	2 dk
Uzama	30	72°C	2 dk
Son Uzama	1	72°C	7 dk
Bekletme	1	4°C	∞ dk

3.2.3. *S. aureus*'un Enterotoksin Genlerinin PCR ile Belirlenmesi

S. aureus izolatlarında *sea*, *seb*, *sec*, *sed* ve *see* enterotoksin genlerinin varlığı Mehrotra ve ark. (2000), tarafından bildirilen primerler dizileri kullanılarak multipleks PCR yöntemi ile belirlendi (Tablo 21). Pozitif kontrol olarak *S. aureus* National Collection of Type Cultures (NCTC) 10652 (*sea*+), *S. aureus* NCTC 10654 (*seb*+), *S. aureus* NCTC 10655 (*sec*+), *S. aureus* NCTC 10656 (*sed*+ ve *sea*+ ve ATCC 27664 (*see*+) kullanıldı.

Tablo 21. *S. aureus* enterotoksin genlerine ait primer dizileri

Gen	Primer	bp	Kaynak
<i>sea</i>	R:5' GGTTATCAATGTGCGGGTGG 3' R:5' CGGCACTTTTTTCTCTTCGG 3'	102	(Mehrotra ve ark., 2000)
<i>seb</i>	R:5' GTATGGTGGTGTAAGTACTGAGC 3' R:5' CCAAATAGTGACGAGTTAGG 3'	164	(Mehrotra ve ark., 2000)
<i>sec</i>	R:5' AGATGAAGTAGTTGATGTGTATGG 3' R:5' CACACTTTTAGAATCAACCG 3'	451	(Mehrotra ve ark., 2000)
<i>sed</i>	R:5' CCAATAATAGGAGAAAATAAAAG3' R:5' ATTGGTATTTTTTTTCGTTTC 3'	278	(Mehrotra ve ark., 2000)
<i>see</i>	R:5' AGGTTTTTTCACAGGTCATCC 3' R:5' CTTTTTTTTCTTCGGTCAATC 3'	209	(Mehrotra ve ark., 2000)

Multipleks PCR için toplam hacim 25 µl olacak şekilde; 1X PCR buffer, 2 mM MgCl₂, 0,2 µM dNTP, 20 pmol *sea*, *seb*, *sec*, *see* primerleri ve 40 pmol *sed* primeri, 2,5 U *Taq* polimeraz, 3 µl template DNA hazırlandı (Tablo 22).

Tablo 22. Enterotoksin genleri (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*) için master miks hazırlanması

Reaktif	Final Konsantrasyon	Volum
10XPCR buffer	1 X	2,5 µl
25 mM MgCl ₂	2 mM	2 µl
10 mM dNTP	0,2 mM	0,5 µl
<i>sea</i> Primer- F (20 pmol)	0,4 µM	0,5 µl
<i>sea</i> Primer- R (20 pmol)	0,4 µM	0,5 µl
<i>seb</i> Primer - F (20 pmol)	0,4 µM	0,5 µl
<i>seb</i> Primer - R (20 pmol)	0,4 µM	0,5 µl
<i>sec</i> Primer - F (20 pmol)	0,4 µM	0,5 µl
<i>sec</i> Primer - R (20 pmol)	0,4 µM	0,5 µl
<i>sed</i> Primer - F (40 pmol)	0,8 µM	1 µl
<i>sed</i> Primer - R (40 pmol)	0,8 µM	1 µl
<i>see</i> Primer - F (20 pmol)	0,4 µM	0,5 µl
<i>see</i> Primer - R (20 pmol)	0,4 µM	0,5 µl
5U <i>Taq</i> polimeraz	2,5U	0,5 µl
DNA		3 µl
dH ₂ O		Son volüme tamamlanır
Total Volum		25 µl

Enterotoksin genler için hazırlanan master miksdan 22 µl alınarak üzerine 3 µl genomik DNA ilave edildi ve termal cycler cihazına (Bio-Rad MJ Mini-PTC-1148) yerleştirildi. Program 94°C’de 5 dakikalık ön denatürasyonu takiben 30 siklus 94°C’de 2 dakika, 52°C’de 2 dakika ve 72°C’de 2 dakikada uzama, 72°C’de 7 dakika final uzama olacak şekilde ayarlandı (Tablo 23).

Tablo 23. Enterotoksin genleri (*sea,seb,sec,sed,see*) için termal cycler programı

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
Başlangıç denatürasyonu	1	94°C	5 dk
Denatürasyon	30	94°C	2 dk
Bağlanma	30	52°C	2 dk
Uzama	30	72°C	2 dk
Son Uzama	1	72°C	7 dk
Bekletme	1	4°C	∞ dk

3.2.4. Antibiyotik Dirençliliğin Belirlenmesi

Fenotipik Dirençlilik

a. Disk Difüzyon Testi: *S. aureus* izolatlarının fenotipik metisilin direncinin belirlenmesi için Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafından bildirilen disk difüzyon metodu kullanıldı (CLSI, 2011). Bu amaçla oxacillin (1 µg, Oxoid CT 0159B) ve cefoxitin (30 µg, Oxoid CT0119B) antibiyotik diskleri kullanıldı (Tablo 24). -20°C’de saklanan *S. aureus* izolatları Tryptic Soy Broth (TSB) (Merck 1.05459)’a transfer edildi ve 37°C’de 24 saat aktive edildi. Buradan 1 öze dolusu alınarak 5 ml %0,09’luk fizyolojik tuzlu su içerisinde 0,5 McFarland (2×10^8 kob/ml bakteri)’a ayarlandı. Daha sonra bu süspansiyondan 1 ml Mueller-Hinton Agar’a (Oxoid CM0337) transfer edildi ve steril bir eküvyon çubuğu ile yayıldı. Agarın yüzeyinin 3-5 dakika kuruması beklendi. Daha sonra antibiyotik diskleri yerleştirildi ve pleytler 35°C de 16-20 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda antibiyotik disklerinin etrafındaki inhibisyon zonlarının çapları ölçüldü (Şekil 13). Elde edilen zon çapları CLSI’deki standartlar ile karşılaştırılarak elde edilen izolatlar antibiyotiklere karşı duyarlı, orta dirençli veya dirençli olarak sınıflandırıldı. Oxacillin için zon çapı ≥ 13 olanlar duyarlı, 11-12 olanlar orta dirençli, $10 \leq$ olanlar ise dirençli kabul edildi.

Cefoxitin için zon çapı ≥ 22 olanlar duyarlı, zon çapı ≤ 21 olanlar ise dirençli kabul edildi (Tablo 25) (CLSI, 2011).

b. E-Test Yöntemi: E-Test yöntemi; oxacillin ve cefoxitin (Biomerieux 520518, USA) E-Test stripleri kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda uygulandı. -20°C 'de saklanan *S. aureus* izolatları TSB'ye transfer edildi ve 37°C de 24 saat aktive edildi. Buradan 1 öze dolusu alınarak 5 ml %0,09'luk fizyolojik tuzlu su içerisinde 0,5 McFarland (2×10^8 kob/ml bakteri)'a ayarlandı. Daha sonra bu süspansiyondan 1 ml Mueller-Hinton Agar'a (Oxoid CM0337) transfer edildi ve steril bir eküvyon çubuğu ile yayıldı. Agarın yüzeyinin 15 dk kuruması beklendi ve ardından E-Test stripleri besiyeri üzerine yerleştirilerek 35°C 'de 10-20 saat inkübe edildi. Strip etrafındaki MİK (Minimal inhibisyon konsantrasyonu) değeri okundu. MİK değeri şerit etrafında oluşan inhibisyon elipsinin şerit üzerindeki ölçekle kesiştiği nokta olarak değerlendirildi (Şekil 13). İki uç yükseklik farkı olduğunda daha yüksek olan üstteki uç MİK değeri olarak kabul edildi. Oxacillin için MİK değeri ≤ 2 olanlar duyarlı, ≥ 4 olanlar dirençli, cefoxitin için MİK değeri ≤ 4 olanlar duyarlı, ≥ 8 olanlar ise dirençli kabul edildi (CLSI, 2011) (Tablo 25).

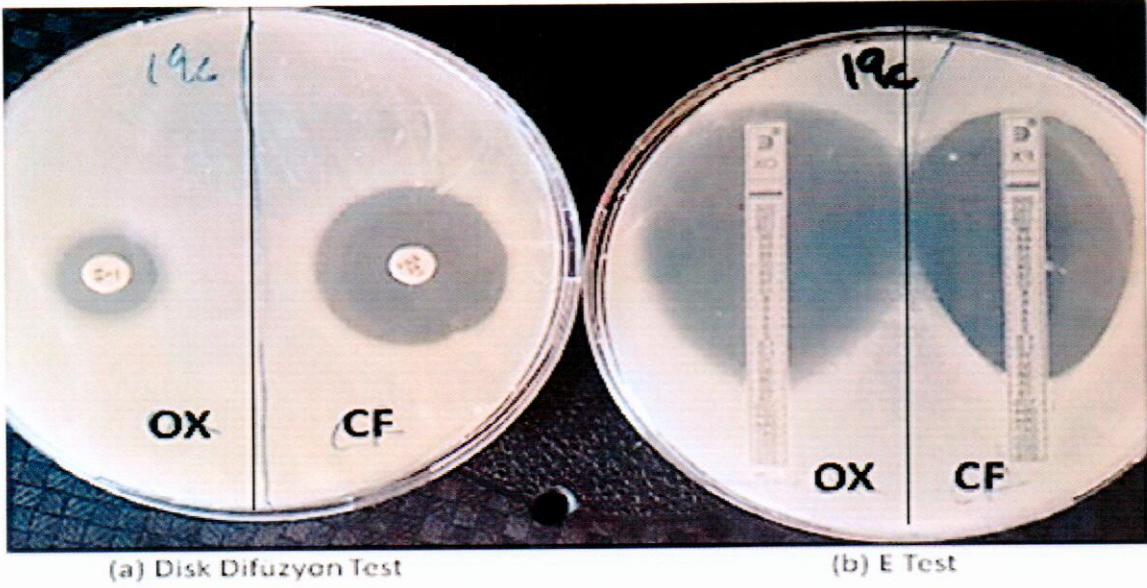
Tablo 24. Antibiyotik diskleri ve dozları

Antibiyotik Diski	Sembolü	Dozu
Oxacillin	OX	30 μg
Cefoxitin	CFX	1 μg

Tablo 25. CLSI tarafından önerilen oxacillin-cefoxitin için disk difüzyon ve E-test duyarlılık sınırları

Antibiyotik	Disk Difüzyon			MİK(mg/ml)	
	Zon çapı (mm)			R	S
	R	I	S	R	S
Oxacillin	≤ 10	11-12	≥ 13	≥ 4	≤ 2
Cefoxitin	≤ 21		≥ 22	≥ 8	≤ 4

MİK: Minimal inhibisyon konsantrasyonu



Şekil 13. Oxacillin-cefoxitin için disk difüzyon ve E-test görünümü

Genotipik Dirençlilik

S. aureus izolatlarının genotipik metisilin direncinin belirlenmesi için Geha ve ark. (1994) tarafından bildirilen yöntemle göre *mecA* gen varlığının belirlenmesi esas alındı. Bu amaçla F: 5' GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA 3' ve R: 5' CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A 3' primer dizileri kullanıldı. *mecA* geni, 16S rRNA ve *nuc* genleri ile birlikte aynı master miks ve PCR koşullarında analiz edildi (Tablo 19 ve Tablo 20). PCR'da amplifikasyonu sonucu elde edilen PCR ürünlerinin UV transilluminatörde görüntülenmesi sonucu 310 bp'de görüntülenen bantlar *mecA* pozitif olarak değerlendirildi.

3.2.5. İstatistik analizler

Verilerin istatistiksel analizleri Tukey testi ile SPSS 11 paket program kullanılarak yapıldı (Chicago, Illinois). Sonuçlar one-way ANOVA yöntemi ile değerlendirildi. $p < 0,05$ düzeyi önemli kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmada, Kasım 2012 - Mayıs 2013 tarihleri arasında Samsun ilinde bulunan 4 ilçeye (Çarşamba, Bafra, Terme ve 19 Mayıs) ait toplam 30 adet küçük, orta ve büyük ölçekli aile işletmesinden temin edilen 100 adet manda sütü, 50 adet manda kaymağı ve 50 adet manda peyniri olmak üzere toplam 200 numune materyal olarak kullanıldı. Manda kaymağı ve manda peyniri örnekleri yalnızca Bafra ve 19 Mayıs ilçelerinde üretimi yapılması nedeniyle bu ilçelerde bulunan işletmelerden temin edildi.

Manda sütü ve ürünlerinde *S. aureus*'un izolasyon ve identifikasyonu EN ISO 6888-1-2:1999'de belirtilen yöntemle yapıldı. İdentifiye edilen *S. aureus* izolatları 16S rRNA ve *nuc* genine özgü primerler kullanılarak PCR ile doğrulandı. İzolatların enterotoksin oluşturma yetenekleri *sea*, *seb*, *sec*, *sed* ve *see* genleri yönünden PCR ile belirlendi. Son olarak *S. aureus* izolatlarının metisiline dirençlilikleri fenotipik olarak disk difüzyon ve E-test yöntemi ile genotipik olarak ise *mecA* geni üzerinden PCR ile tespit edildi.

4.1. Mikrobiyolojik Ekim Sonuçları

Koagulaz Pozitif Stafilocok Sayısı

Manda sütü ve ürünlerinde koagulaz pozitif stafilocok sayısı toplam 104 örnekte 2,20 - 6,11 log₁₀ kob/g arasında tespit edildi. İncelenen 200 örnekten 96'sında koagulaz pozitif stafilocok tespit edilemedi. Koagulaz pozitif stafilocok sayısı açısından çiğ manda sütü, manda peyniri ve manda kaymağı arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli ($p < 0,05$) bulundu (Tablo 26).

Tablo 26. Analiz edilen örneklerde koagulaz pozitif stafilocok sayısı (log₁₀ kob/g)

Numune	n	Min-Mak (x±Sx)
Manda sütü (n:100)	65	2,20-5,28 (3,58±0,09 ^a)
Manda peyniri (n:50)	29	2,20-6,11 (4,60±0,23 ^b)
Manda kaymağı (n:50)	10	2,30-2,78 (2,44±0,71 ^c)
Toplam (n:200)	104	2,20-6,11 (3,75±0,10)

a, b, c : Aynı sütündeki farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasındaki fark önemlidir.

*: $p < 0,05$, Tukey test,

x: Ortalama, Sx: Standart hata, min: Minimum, mak: Maksimum

n: Koagulaz pozitif stafilocok örnek sayısı

Koagulaz pozitif stafilokok sayısının incelenen 100 manda sütü örneğinin 65'inde, 50 manda peyniri örneğinin 29'unda, 50 manda kaymağı örneğinin ise 10'unda Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği (Anon, 2011) ve Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği'ne (Anon, 2009) göre kabul edilebilir limit olan $\geq 10^2$ kob/g düzeyini aştığı belirlendi (Tablo 27).

Tablo 27. Analiz edilen örneklerde koagulaz pozitif stafilokok sayısının (kob/g) bazında dağılımı

Numune	Koagulaz pozitif stafilokok sayısı					Toplam
	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	
Manda sütü (n:100)	18	28	16	3	-	65/100 (%65)
Manda peyniri (n:50)	5	3	7	10	4	29/50 (%58)
Manda kaymağı (n:50)	10	-	-	-	-	10/50 (%20)

n:Analiz edilen örnek sayısı

4.2. *S. aureus*'un İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Manda sütü ve ürünlerinde *S. aureus*'un izolasyonu klasik kültür yöntemi EN ISO 6888-1-2:1999'ye göre yapıldı ve elde edilen izolatlar biyokimyasal testler (gram boyama, katalaz, koagulaz, hemoliz, glikoz, mannitol, DNase, Staphaurex Plus Latex testleri) ile identifiye edildi. Klasik kültür tekniği ile *Staphylococcus* spp. ve *S. aureus* olarak tespit edilen izolatlar 16S rRNA ve *nuc* genleri varlığı yönünden PCR yöntemi ile doğrulandı.

Klasik kültür tekniği sonucunda incelenen 100 çiğ manda sütü örneğinin 36 tanesinin (%36), 50 manda kaymağı örneğinin 9 tanesinin (%18) ve 50 manda peyniri örneğinin 21 tanesinin (%42) *S. aureus* ile kontamine olduğu belirlendi (Tablo 28).

PCR analizleri sonucunda incelenen 100 çiğ manda sütü örneğinin 76 tanesinin (%76), 50 manda kaymağı örneğinin 15 tanesinin (%30) ve 50 manda peyniri örneğinin 35 tanesinin (%70) *Staphylococcus* spp. ile kontamine olduğu belirlendi. *S.aureus* oranlarına bakıldığında ise 100 çiğ manda sütü örneğinin 30 tanesinin (%30), 50 manda kaymağı örneğinin 9 tanesinin (%18) ve 50 manda peyniri örneğinin 17 tanesinin (%34) *S. aureus* ile kontamine olduğu belirlendi (Tablo 28) (Şekil 14).

PCR amplifikasyon sonucu elde edilen PCR ürünlerinin UV lamba altında görüntülenmesi sonucu 750 bp'de bant veren izolatlar 16S rRNA geni pozitif *Staphylococcus* spp., 279 bp'de bant veren izolatlar ise *nuc* geni pozitif *S. aureus* olarak

kabul edildi (Şekil 15). İncelenen 200 manda sütü ve süt ürününün 172'sinden toplam 555 izolat elde edildi. PCR analizleri sonucunda 555 izolatın 283'ünün 16S rRNA geni içererek *Staphylococcus* spp. olduğu, 99 izolatın ise *nuc* geni içererek *S. aureus* olduğu doğrulandı. *S. aureus* olarak doğrulanan 99 izolatın 57'si manda sütünden, 9'u manda kaymağından ve 33'ü manda peynirinden elde edildi (Tablo 26). Konvansiyonel yöntemde biyokimyasal testler sonucu bir veya birden fazla testin atipik kimyasal reaksiyon vermesi sonucu elde edilen 116 *S. aureus* şüpheli izolatın 99'unun *nuc* geni yönünden pozitif *S. aureus* olduğu PCR ile doğrulandı.

Tablo 28. Analiz edilen örneklerden elde edilen izolatların 16S rRNA, *nuc* ve *mecA* gen varlığı sonuçları

Numune	Konvansiyonel Kültür Tekniği						PCR Tekniği					
	BP agarda tipik-atipik koloni sayısı		KPS		<i>S. aureus</i> sayısı		<i>Staphylococcus</i> spp. sayısı (16S rRNA)		<i>S. aureus</i> sayısı (<i>nuc</i>)		<i>mecA</i>	
	n	i	n	i	n	i	n	i	n	i	n	i
Manda sütü (n:100)	98	349	65	199	36	75	76	167	30	57	4	8
	(%98)*		(%65)		(%36)		(%76)		(%30)		(%13,3)	(%8,0)
Manda kaymağı (n:50)	26	45	10	13	9	7	15	27	9	9	0	0
	(%52)		(%20)		(%18)		(%30)		(%18)		%0	
Manda peyniri (n:50)	48	161	29	52	21	34	35	89	17	33	1	1
	(%96)		(%58)		(%42)		(%70)		(%34)		(%5,8)	(%1)
Toplam (n: 200)	172	555	104	264	69	116	126	283	56	99	5	9
	(%86)		(%52)		(%34,5)		(%63)		(%28)		(%8)	(%9)**

n: Numune; i: İzolat; KPS: Koagulaz pozitif *Staphylococcus* spp. sayısı

*: % oranları incelenen numune sayıları üzerinden hesaplanmıştır.

** : % oranları *S. aureus* pozitif 99 izolat üzerinden hesaplanmıştır.

S. aureus pozitif bulunan numunelerin aylara göre dağılımı Tablo 29'da, ilçelere göre dağılımı ise Tablo 30'da belirtildi. Buna göre *S. aureus* en fazla %46 ile Mayıs ayında izole edildi. İlçe bazında bakıldığında ise en yüksek insidensin %40 ile Çarşamba ve Terme ilçelerinde olduğu tespit edildi.

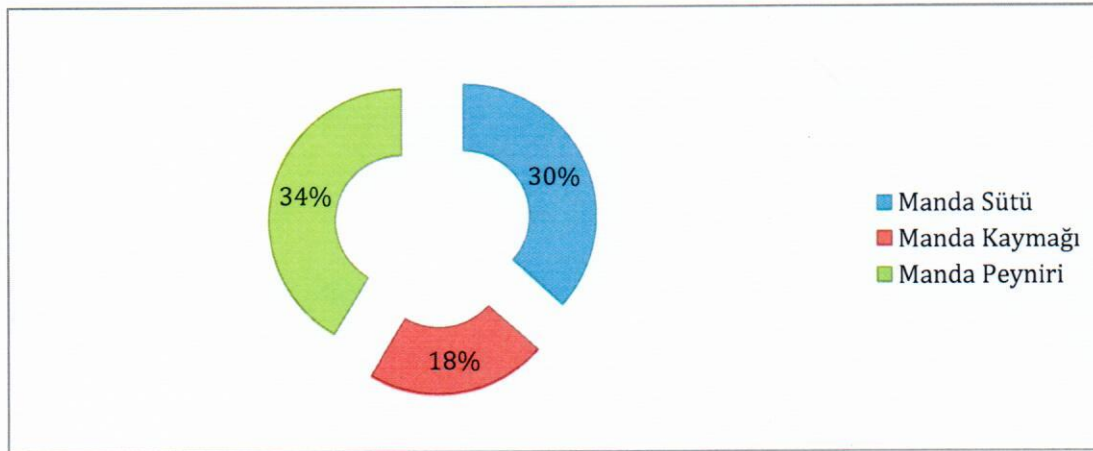
Tablo 29. Analiz edilen örneklerde *S. aureus* pozitif numunelerin aylara göre dağılımı

Numune	Kasım	Aralık	Ocak	Şubat	Mart	Nisan	Mayıs	Toplam
Manda sütü	8/20 (%40)	2/18 (%11)	0/15	6/10 (%60)	8/17 (%47)	6/15 (%40)	0/5	30/100 (%30)
Manda kaymağı	3/8 (%38)	1/7 (%14)	0/7	0/7	0/8	0/8	5/5 (%100)	9/50 (%18)
Manda peyniri	1/6 (%17)	2/9 (%22)	0/5	5/8 (%63)	4/8 (%50)	3/9 (%33)	2/5 (%40)	17/50 (%34)
Toplam	12/34 (%35)	5/34 (%14)	0/27 (% 0)	11/25 (%44)	12/33 (%36)	9/32 (%28)	7/15 (%46)	56/200 (%28)

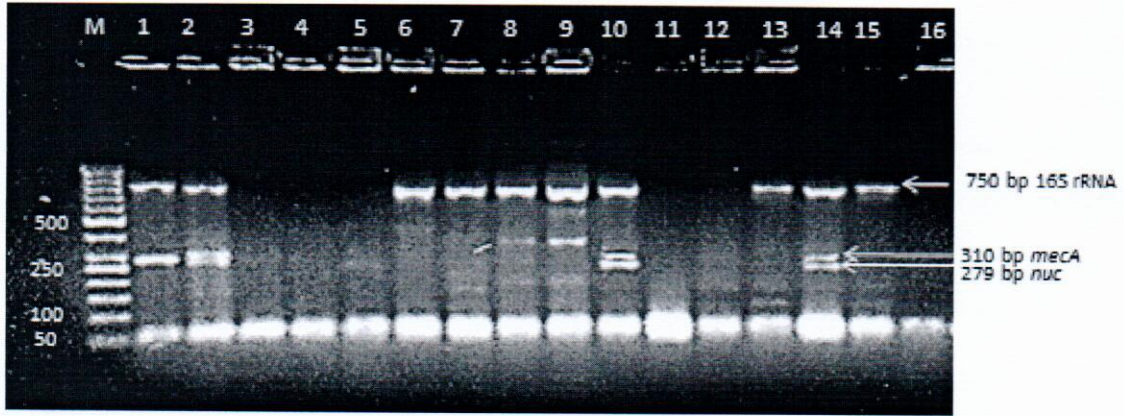
Tablo 30. *S. aureus* pozitif izolatların ilçe bazlı dağılımı

İlçeler	Manda sütü		Manda kaymağı		Manda peyniri	
	n	i	n	i	n	i
Bafra	14/50 (%28)	27	9/37 (%24)	9	12/32 (%37,5)	20
19 Mayıs	6/25 (%24)	14	0/13	-	5/18 (%27,7)	13
Çarşamba	6/15 (%40)	11	-	-	-	-
Terme	4/10 (%40)	5	-	-	-	-
Toplam	30/100 %30	57	9/50 %18	9	17/50 %34	33

n: Numune; i: İzolat



Şekil 14. Analiz edilen örneklerde *S. aureus*'un bulunma oranları



Şekil 15. Manda sütü ve ürünlerinden elde edilen *Staphylococcus* spp. izolatlarının 16S rRNA, *nuc* ve *mecA* genlerinin multipleks PCR görüntüsü. M: 50 bp DNA marker, Sıra 1: Pozitif kontrol 16S rRNA (750bp), *nuc* (279bp) geni içeren *S. aureus* ATCC 43300, Sıra 2: Pozitif kontrol *mecA* (310 bp) geni içeren *S. aureus* ATCC 46300, 3: Negatif kontrol (steril deiyonize su), Sıra 4, 5, 11, 12, 16: Negatif manda sütü izolatları, Sıra 6, 7, 8, 9, 13, 15: 16S rRNA pozitif manda sütü izolatları, Sıra 10, 14: 16S rRNA, *nuc* ve *mecA* geni pozitif manda sütü izolatları

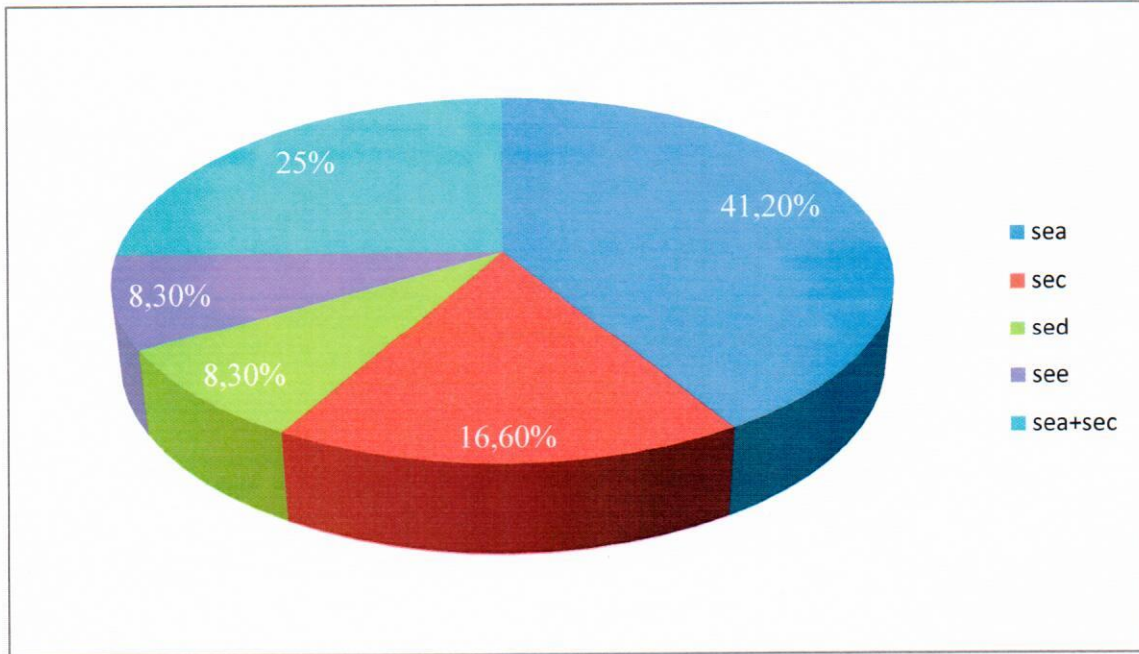
4.3. *S. aureus* İzolatlarının Enterotoksin Genlerinin Belirlenmesi

S.aureus izolatlarında enterotoksin genlerinin varlığı Mehrotra ve ark. (2000) tarafından bildirilen *sea*, *seb*, *sec*, *sed* ve *see* genlerine ait primer dizileri kullanılarak multiplex PCR yöntemi ile araştırıldı. UV görüntüleme sonucu 102 bp'de bant veren izolatlar *sea*, 164 bp'de bant veren izolatlar *seb*, 451 bp'de bant veren izolatlar *sec*, 278 bp'de bant veren izolatlar *sed* ve 209 bp'de bant veren izolatlar *see* olarak değerlendirildi (Şekil 17,18). Yapılan değerlendirme sonucunda *S.aureus* pozitif bulunan 56 çiğ manda sütü ve ürününün 9'unun (%16) en az bir enterotoksin içerdiği tespit edildi. İzolat bazında bakıldığında 99 *S. aureus* izolatının 12 tanesinin (%12) en az bir enterotoksin ürettiği tespit edildi. Bu enterotoksinlerin süt ve süt ürünlerindeki dağılımına bakıldığında; çiğ süttten elde edilen 57 izolatın 2 (%2) tanesinin SEA, 2 (%2) tanesinin SEC, 1(%1) tanesinin SEE, 3 (%3) tanesinin ise SEC ve SED tipi toksini birlikte ürettikleri tespit edildi. Manda kaymağından elde edilen 9 izolatın 1(%1) tanesinin SED, manda peynirinden elde edilen 33 izolatın 3(%3) tanesinin ise SEA tipi toksin ürettiği tespit edildi. Enterotoksin tespit edilen 12 izolattan en fazla SEA tipi toksin (%41,2) elde edildi. Bunu takiben sırasıyla SEC+SED (%25), SEC (%16,6), SED (%8,3) ve SEE (%8,3) elde edildi (Tablo 31) (Şekil 16).

Tablo 31. Analiz edilen örneklerden elde edilen *S. aureus* enterotoksin genlerinin dağılımı

Numune türü	<i>S.aureus</i> pozitif		Enterotoksin içeren		Enterotoksin genlerinin dağılımı					
	n	i	n	i	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>see</i>	<i>sec sed</i>
Manda sütü (n:100)	30	57	6	8	2	-	2	-	1	3
Manda kaymağı (n:50)	9	9	1	1	-	-	-	1	-	-
Manda peyniri (n:50)	17	33	2	3	3	-	-	-	-	-
Toplam (n:200)	56	99	9/56 (%16)	12/99 (%12,1)	5/12 (%41,2)	-	2/12 (%16,6)	1/12 (%8,3)	1/12 (%8,3)	3/12 (%25)

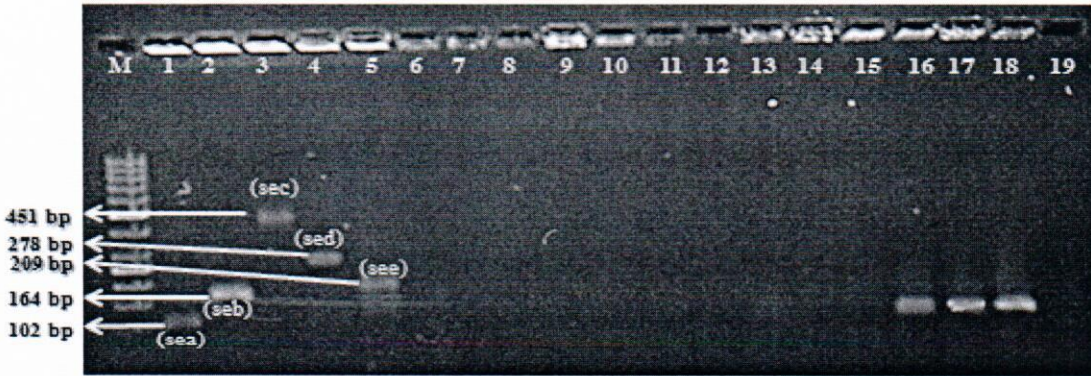
n: Numune; i: İzolat



Şekil 16. *S. aureus* enterotoksin genlerinin dağılımı



Şekil 17. Manda sütünden izole edilen *S.aureus* enterotoksin genlerinin elektroforez görüntüsü. M: 50 bp DNA marker, Sıra 1: Pozitif kontrol *sea* (102 bp) (*S. aureus* NCTC 10652), Sıra 2: Pozitif kontrol *seb* (164 bp) (*S. aureus* NCTC 10654), Sıra 3: Pozitif kontrol *sec* (451 bp) (*S. aureus* NCTC 10655), Sıra 4: Pozitif kontrol *sed* (278 bp) ve *sea* (102 bp) (*S. aureus* NCTC 10656), Sıra 5: Pozitif kontrol *see* (209 bp) (*S. aureus* ATCC 27664) Sıra 6: Negatif kontrol (steril deiyonize su), Sıra 7, 8, 9: *sec* (451 bp) ve *sed* (278 bp) pozitif manda sütü izolatlari, Sıra 10, 11, 12, 13, 14, 15, 18: Negatif manda sütü izolatlari, Sıra 16, 17: *sea* (102 bp) pozitif manda sütü izolatlari



Şekil 18. Manda peynirinden izole edilen *S.aureus* enterotoksin genlerinin elektroforez görüntüsü. M: 50 bp DNA marker, Sıra 1: Pozitif kontrol *sea* (102 bp) (*S. aureus* NCTC 10652), Sıra 2: Pozitif kontrol *seb* (164 bp) (*S. aureus* NCTC 10654), Sıra 3: Pozitif kontrol *sec* (451 bp) (*S. aureus* NCTC 10655), Sıra 4: Pozitif kontrol *sed* (278 bp) ve *sea* (102 bp) (*S. aureus* NCTC 10656), Sıra 5: Pozitif kontrol *see* (209 bp) (*S. aureus* ATCC 27664), Sıra 6: Negatif kontrol (steril deiyonize su), Sıra 7,8: Negatif manda sütü izolatlari, Sıra 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 19: Negatif manda peyniri izolatlari, Sıra 16, 17, 18: *sea* (102 bp) pozitif manda peyniri izolatlari

4.4. *S. aureus* İzolatlarının Antibiyotik Dirençlilik Sonuçları

Fenotipik Dirençlilik

Disk Difüzyon Testi Sonuçları

PCR ile doğrulanan *S. aureus* izolatlarının fenotipik metisilin direncinin belirlenmesi amacıyla oxacillin ve cefoxitin disk difüzyon testleri yapıldı. Bu test sonucunda 99 *S. aureus* izolatının 7'sinin (%7) yalnızca oxacilline, 2'sinin (%2) yalnızca cefoxitine ve 7'sinin (%7) ise her iki antibiyotiğe karşı dirençli olduğu belirlendi (Tablo 32).

Tablo 32. *S. aureus* izolatlarının oxacillin-cefoxitin antibiyotiklerine karşı disk difüzyon sonuçları

<i>S. aureus</i> (+) izolatlar	Oxacillin			Cefoxitin			Oxacillin+ Cefoxitin		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Manda Sütü (n:57)	52	-	5	57	-	-	54	-	3
Manda Kaymağı (n:9)	9	-	-	9	-	-	6	-	3
Manda Peyniri (n:33)	31	-	2	31	-	2	32	-	1
Toplam (n:99)	92	-	7	97	-	2	92	-	7

R: Dirençli; I:Orta dirençli; S:Duyarlı

E-Test Sonuçları

Disk difüzyon testi ile dirençli bulunan *S. aureus* izolatlarının metisilin direncinin belirlenmesi ve MİK değerlerinin tespiti amacıyla E-Test yapıldı. Oxacillin MİK değerlerine göre ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$ duyarlı (S), ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$ dirençli (R), cefoxitin MİK değerlerine göre ≤ 6 $\mu\text{g/mL}$ duyarlı (S), ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$ dirençli (R) olarak değerlendirildi. Buna göre oxacilline dirençli izolat sayısı 11 (%11) ve cefoxitine dirençli izolat sayısı ise 5 (%5) olarak belirlendi (Tablo 33).

E-Test sonucuna göre oxacilline dirençli bulunan 11 izolatın; 1 adeti 64 $\mu\text{g/mL}$, 1 adeti 32 $\mu\text{g/mL}$, 1 adeti 16 $\mu\text{g/mL}$, 1 adeti 12 $\mu\text{g/mL}$, 3 adeti 8 $\mu\text{g/mL}$, 1 adeti 6 $\mu\text{g/mL}$, 3 adeti ise 4 $\mu\text{g/mL}$, cefoxitine karşı dirençli bulunan 5 izolatın ise 1 adedi 24 $\mu\text{g/mL}$, 3 adeti 12 $\mu\text{g/mL}$ ve 1 adeti 8 $\mu\text{g/mL}$ MİK değerinde tespit edildi (Tablo 34).

Tablo 33. *S. aureus* izolatlarının oxacillin-cefoxitin antibiyotiklerine karşı E-test sonuçları

<i>S. aureus</i> (+) izolatlar	Oxacillin	Cefoxitin
	(MİK) değeri µg/ml	(MİK) değeri µg/ml
Manda sütü (n:57)	0,16	
	12,0 (R)	
	0,38	6,0
	8,0 (R)	24,0 (R)
	4,0 (R)	12,0 (R)
	16,0 (R)	
	32,0 (R)	
Manda kaymağı (n:9)	64,0 (R)	
	8,0 (R)	12,0 (R)
	6,0 (R)	6,0
Manda peyniri (n:33)	1,0	2,0
	8,0 (R)	4,0
	4,0 (R)	8,0 (R)
	4,0 (R)	12,0 (R)

R: Dirençli

Tablo 34. *S. aureus* izolatlarının oxacillin-cefoxitin antibiyotiklerine karşı MİK değerleri dağılımı

Oxacillin-Cefoxitin MİK değerlerine göre izolat sayıları (µg/ml)																		
İ	≤0.25	0.32	0.50	0.64	0.75	1.0	1.5	2	3	4	6	8	12	16	24	32	64	
		0.38																
OX	99	56	13	6	1	2	6	3	1	-	3	1	3	1	1	-	1	1
CFX	99	16	9	9	-	7	9	15	16	7	4	2	1	3	-	1	-	-

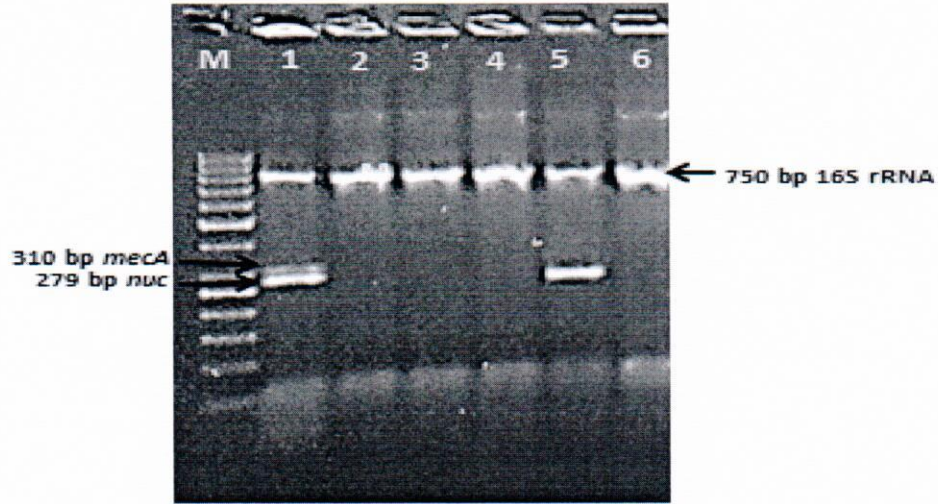
İ: İzolat sayısı, OX: Oxacillin, CFX: Cefoxitin

Genotipik Dirençlilik

mecA geni PCR Sonuçları

Manda sütü ve ürünlerinden elde edilen *S. aureus* izolatlarında metisilin direnci (*mecA*) geni varlığı yönünden Geha ve ark. (1994) tarafından belirtilen yöntemle PCR ile belirlendi. UV görüntüleme sonucunda 310 bp'de bant veren izolatlar *mecA* geni pozitif olarak kabul edildi (Şekil 19). Buna göre toplam 99 izolatın 9'unun (%9) *mecA* geni içerdiği belirlendi. Numune dağılımına göre, manda sütü örneklerinden izole

edilen 57 *S. aureus* izolatının 8'inin (%8,0), manda peynirlerinden elde edilen 9 *S. aureus* izolatının 1'inin (%1,0) *mecA* geni taşıdığı, manda kaymaklarından elde edilen *S. aureus* izolatlarının ise *mecA* geni taşımadığı tespit edildi.



Şekil 19. *mecA* geni elektroforez görüntüsü. M: 50 bp DNA marker, Sıra 1: 16S rRNA, *nuc*, ve *mecA* geni pozitif manda sütü izolatu, Sıra 2,3,4,6: 16S rRNA pozitif manda sütü izolatları, Sıra 5: 16S rRNA ve *nuc* pozitif manda sütü izolatu

4.5. Metisilin Direncinin Fenotipik ve Genotipik Olarak Karşılaştırması

Çalışmamızda manda sütü ve ürünlerinden elde edilen 99 *S. aureus* izolatının metisilin direnci fenotipik ve genotipik yöntemlerle karşılaştırıldı. Buna göre fenotipik olarak 16 izolatın (disk difüzyon ve E-Test), genotipik olarak ise 9 izolatın (*mecA* geni pozitif) metisiline karşı dirençli olduğu tespit edildi.

PCR analizi sonucunda genotipik olarak *mecA* geni taşıyan 9 izolatın 3'ünün, disk difüzyon testi ile oxacilline, 2'sinin ise cefoxitine dirençli olduğu belirlendi. Başka bir ifade ile disk difüzyon testi ile oxacilline dirençli bulunan 14 izolattan 3'ünün, cefoxitine dirençli bulunan 9 izolattan ise 2'sinin *mecA* geni taşıdığı belirlendi (Tablo 35)

Tablo 35. Metisilin direncinin fenotipik ve genotipik olarak karşılaştırılması

No	Numune/ İzolat kodu	Genotipik <i>mecA</i> geni	Fenotipik			
			Disk difüzyon		E-test (MİK değeri)	
			Oxacillin	Cefoxitin	Oxacillin	Cefoxitin
1.	Manda sütü/16b	+	S	S	0,19	1,5
2.	Manda sütü /17c	+	S	S	0,38	1,5
3.	Manda sütü /19a	+	S	S	0,50	1,0
4.	Manda sütü /19c	+	S	S	0,38	0,38
5.	Manda sütü /19d	+	R	S	12,0	2,0
6.	Manda sütü /19e	+	S	S	0,50	1,5
7.	Manda peyniri/66a	+	S	R	2,0	4,0
8.	Manda sütü /131d	+	R	R	4,0	24,0
9.	Manda sütü /131e	+	R	S	16,0	0,094
10.	Manda sütü /9a		R	S	0,16	0,16
11.	Manda sütü /44c		R	R	0,38	6,0
12.	Manda sütü /94a		R	S	8,0	1,5
13.	Manda sütü /185c		R	R	32,0	12,0
14.	Manda sütü /190d		R	S	64,0	0,25
15.	Manda kaymağı /27e		R	R	8,0	12,0
16.	Manda kaymağı /50d		R	R	6,0	6,0
17.	Manda kaymağı /202a		R	R	1,0	2,0
18.	Manda peyniri /69a		R	R	8,0	8,0
19.	Manda peyniri /114a		R	S	4,0	0,50
20.	Manda peyniri /122c		S	R	0,38	12,0
21.	Manda peyniri /142d		R	S	4,0	3,0

R: Dirençli; S:Duyarlı

Çalışmamızda disk difüzyon testi ile oxacilline dirençli bulunan 11 izolat ve cefoxitine dirençli bulunan 7 izolatın *mecA* geni taşımadığı halde fenotipik olarak metisiline dirençli olduğu tespit edildi. E-Test yönteminde ise elde edilen MİK değerlerine göre 11 izolat oxacilline dirençli, 5 izolat ise cefoxitine dirençli bulundu. Oxacilline dirençli bulunan 11 izolattan 3'ünün *mecA* geni taşırken, 8'inin taşımadığı, cefoxitine dirençli bulunan 5 izolattan 2'sinin *mecA* geni taşırken 3'ünün ise taşımadığı görüldü (Tablo 36).

Tablo 36. *S. aureus* izolatlarında *mecA* geni varlığının fenotipik yöntemlerle karşılaştırılması

<i>mecA</i>	Disk Difüzyon				E-Test			
	Oxacillin		Cefoxitin		Oxacillin		Cefoxitin	
	R	S	R	S	R	S	R	S
<i>mecA</i> (+) n:9	3	6	2	7	3	6	2	7
<i>mecA</i> (-) n:90	11	79	7	83	8	82	3	87
Toplam n:99	14	85	9	90	11	88	5	94

R: Dirençli; S:Duyarlı

Çalışmamızda manda sütü örneklerinden, *mecA* (+) olduğu halde oxacillin MİK değeri <2 olan ve OS-MRSA (oksasiline duyarlı *mecA* pozitif *S. aureus*) olarak değerlendirilen 5 (%5) adet MRSA suşu izole edildi (Tablo 37).

Tablo 37. Oxacilline duyarlı *mecA* pozitif *S.aureus* (OS-MRSA) izolatları

İzolat No	O MİK	<i>mecA</i>	ODD	SDD	Numune
1- 16b	<2	+	S	S	Manda Sütü
2- 17c	<2	+	S	S	Manda Sütü
3- 19a	<2	+	S	S	Manda Sütü
4- 19c	<2	+	S	S	Manda Sütü
5- 19e	<2	+	S	S	Manda Sütü

OS-MRSA: Oxacillin duyarlı *mecA* pozitif *S.aureus*; OMİK: Oxacillin minimal inhibisyon konsantrasyonu; ODD: Oxacillin disk difüzyon; SDD: Cefoxitine disk difüzyon; S: Duyarlı

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, Samsun ilinde manda yetiştiriciliği yapan işletmelerden temin edilen 200 adet manda sütü ve ürünlerinin 56'sında (%28) *S. aureus* izole edilmiştir. Numune bazında dağılım incelendiğinde 100 manda sütü örneğinin %30'unun (30/100), 50 kaymak örneğinin %18'inin (9/50) ve 50 peynir örneğinin ise %34'ünün (17/50) *S. aureus* ile kontamine olduğu tespit edilmiştir.

İlçe bazlı dağılım incelendiğinde; Bafra ilçesinden elde edilen 50 manda sütü örneğinin %28'inin, 37 manda kaymağı örneğinin %18'inin ve 32 manda peyniri örneğinin %24'ünün *S. aureus* ile kontamine olduğu tespit edilmiştir. 19 Mayıs ilçesinden elde edilen 25 manda sütü örneğinin %24'ünün, 18 manda peyniri örneğinin %27'sinin *S. aureus* ile kontamine olduğu, incelenen 13 manda kaymağında ise *S. aureus* izole edilemediği tespit edilmiştir. Çarşamba ilçesinden elde edilen 15 manda sütü örneğinin %40'ının ve Terme ilçesinden elde edilen 10 manda sütü örneğinin %40'ının *S. aureus* ile kontamine olduğu tespit edilmiştir. Bafra ve 19 Mayıs ilçelerindeki işletmelerden temin edilen manda sütlerindeki kontaminasyon düzeyi Terme ve Çarşamba ilçelerine göre daha düşük bulunmuştur. Manda yetiştiriciliği yapılan Bafra ve 19 Mayıs'daki işletmelerin daha büyük ölçekli olması, süt sağım ve üretim işlemlerinin daha hijyenik ve teknik koşullarda gerçekleştirilmesi, personel hijyeni, ahır, alet ve ekipman hijyenine dikkat edilmesinden dolayı bu işletmelerde insidensin daha düşük bulunduğu kanısına varılmıştır.

İşletme bazlı dağılım incelendiğinde; *S. aureus* izolasyon oranı küçük ölçekli (5-10 baş) işletmelerde %25-40, orta ölçekli işletmelerde (10-50 baş) %20-30 ve büyük ölçekli işletmelerde %10-28 düzeylerinde tespit edilmiştir. Sonuç olarak kontaminasyon düzeylerinin işletme büyüklüğü ile ters orantılı olduğu belirlenmiştir. Hayvan popülasyonunun fazla olduğu orta ve büyük ölçekli işletmelerde manda sütünün çeşitli süt ürünlerinin yapımında değerlendirilmesine bağlı olarak sağımın daha dikkatli ve hijyenik olarak yapıldığı, bazı işletmelerde makineli sağım yönteminin uygulandığı belirlenmiştir.

Çalışmamızda çiğ manda sütü örneklerinde *S. aureus* insidensi %30 olarak tespit edilmiş olup, bizim bulgularımıza benzer olarak Pamuk ve ark. (2012), Afyonkarahisar ilinden temin ettikleri 120 manda sütünün %33'ünde, Singh ve Prakash (2010), Hindistan'da inceledikleri 52 manda sütü örneğinin %28,84'inde, Abo-Shama

(2014), Mısır'da 140 adet manda sütü örneğinin %30'unda, Sharma ve ark. (2011), Hindistan'da 40 manda sütü örneğinin %34,78'inde *S. aureus* izole etmişlerdir. Çalışma bulgularımızdan daha düşük olarak ise Rahimi ve Alian (2013), İran'da 40 manda sütü örneğinin %17,5'unda *S. aureus* izole etmişlerdir.

İnek sütünde yapılan araştırmalarda çalışma bulgularımıza benzer olarak, Yücel ve Anıl (2011), Ankara ilinde inceledikleri 190 çiğ süt örneğinin %35'inden, Nassasra (2011), İstanbul ilinden temin ettikleri 406 süt örneğinin %29,31'inden *S. aureus* izole etmişlerdir. Çalışma bulgularımızdan yüksek olarak ise Muratoğlu (2010), İstanbul ilinden temin ettiği 122 adet çiğ süt örneğinde *S. aureus* insidensini %43,3 olarak bulmuştur.

Diğer ülkelerde yapılan çalışmalara bakıldığında, Jorgensen ve ark. (2005), Norveç'te temin ettikleri 220 adet inek sütü örneğinin %75'inde, 213 adet keçi sütü örneğinin %96,2'sinde, Rall ve ark. (2008), Brezilya'da temin ettikleri 54 çiğ süt örneğinin %70'inde çalışma bulgularımızdan daha yüksek insidenslerde *S. aureus* izole etmişlerdir. Dehkordi ve ark. (2015), İran'da 320 çiğ süt (sığır, koyun ve keçi sütü) örneğinde çalışmamıza benzer olarak %27,8 oranında *S. aureus* izole etmişlerdir. Fagundes ve ark. (2010), Brezilya'da 208 çiğ sığır sütünde %6,7 oranında, Riva ve ark. (2015), ise İtalya'da 383 çiğ süt örneğinde %9,1 oranından çalışma bulgularımızdan düşük insidenslerde *S. aureus* pozitif bulmuşlardır.

S. aureus hayvanların deri mukozası ve çevrede bulunmaktadır. Toz, toprak ve gübre ile *S. aureus* mikroorganizmaları süte rahatlıkla bulaşabilmektedir. *S. aureus*'un sütte bulunması kötü hijyen koşulları, sağım hijyenine dikkat edilememesi, eldiven giyilmemesi, süt ekipmanlarının kirliliği ve çevresel kontaminasyona bağlı olabilmektedir. Yapılan çalışmalarda çiğ sütte *S. aureus*'un farklı insidenslerde bulunması sütin hijyenik koşullarının farklılığı, hayvanların sağlık durumu özellikle subklinik mastitisli hayvanlar, sütin uygun olmayan koşullarda muhafaza ve nakliyesine bağlı olabilir (Mutluer ve ark., 1993). Bu çalışmada çiğ sütte yüksek oranda *S. aureus* izole edilmiş olmasının, süt numunelerinin toplandığı çiftlikler ve mandıralardaki hijyen yetersizliği ve sütin temin edildiği hayvanlardaki meme hastalıklarıyla ilişkili olabileceği kanaatine varılmıştır. Numune temini aşamasında işletmelerde yapılan incelemelerde çiğ sütin sağımı esnasında gerek alet ve ekipman gerekse personel hijyenine dikkat edilmediği gözlemlenmiştir.

Bu araştırmada manda sütününden yapılan peynirlerde *S. aureus* izolasyon oranı %34 olarak bulunmuştur. Çalışma bulgularımızdan daha dūřuk olarak Pamuk ve ark. (2012), Afyonkarahisar ilinden temin ettikleri 120 manda peynirinin %25,8'inden, Yücel ve Anıl (2011), Ankara ilinden temin ettikleri 90 adet peynir örneğinin (kaşar, tulum ve lor peyniri) %20,2'sinden, Muratoęlu (2010), İstanbul ilinden temin ettiği 92 peynir örneğinin %25,2'sinden *S. aureus* izole etmişlerdir. Gülmez ve ark. (2001), Kars ilinden temin ettikleri 50 adet salamura beyaz peynir örneğinde çalışma bulgularımıza benzer olarak %30 oranında, 50 adet taze beyaz peynir örneğinde ise bulgularımızdan daha yüksek olarak %78 oranında *S.aureus* izole etmişlerdir. Çalışma bulgularımızdan yüksek olarak ise, Keskin ve ark. (2006), İstanbul ilinde çeşitli semt pazarlarından temin ettikleri 50 adet beyaz peynir örneğinin %66'sının, şengül (2006), Erzurum ilinde farklı marketlerde satışa sunulan 15 adet civil peyniri örneğinin %66,6'sının *S. aureus* ile kontamine olduğunu belirtmişlerdir.

Dięer ölkelerde yapılan çalışmalara bakıldığında, Manfreda ve ark. (2005), çalışma bulgularımıza benzer şekilde İtalya'da inceledikleri 427 peynir örneğinin %34'ünün, bulgularımızdan daha yüksek olarak ise Andre ve ark. (2008), Brezilya'da inceledikleri 24 adet peynir örneğinin %70,8'inin, Basanisi ve ark. (2016), İtalya'da inceledikleri 90 adet koyun ve keçi peynirinin %41,1'inin *S. aureus* ile kontamine olduğunu belirtmişlerdir. Dehkordi ve ark. (2015), ise çalışma bulgularımızdan daha dūřuk olarak İran'da 350 süt ürünü (geleneksel metotla üretilen kaymak, hamur, yoğurt, peynir, krema ve peynir altı suyu) %24,85'inde *S. aureus* pozitif bulmuşlardır.

Basanisi ve ark. (2017), İtalya'da toplam 3760 süt ürünü (süt, mozzarella peyniri ve çeşitli yöresel peynirleri) üzerine yaptıkları çalışmada, *S. aureus* insidensini çalışma bulgularımızdan daha dūřuk %12,9 olarak tespit etmişlerdir.

Elde edilen veriler arasındaki farklılıkların, hayvanların genel sağlık durumları (mastitis), yetiştirme koşulları, mevsimsel ve coğrafi farklılıklar, numunelerin temin edildiği mandıra ve işletmelerin koşulları, süt ürünlerindeki üretim teknikleri farklılıkları (uygulanan pastörizasyon sıcaklık ve süreleri), uygulanan analiz metotları ve yöntemlerinin farklılığı gibi nedenlerden kaynaklanabileceği düşünölmektedir.

Çalışmamızda kullanılan mandaların günlük süt verimi oldukça dūřuk olduğundan (ortalama 3-4 kg) peynir üretiminde kullanılan sütlerin yeterince kaynatılmadan ürüne işlendiği, genellikle de çię sütlerin peynir üretiminde kullanıldığı

gözlemlenmiştir. Manda sütünden yapılan peynir örneklerinde *S.aureus*'un yüksek düzeyde bulunması çiğ süt kaynaklı bir kontaminasyon, sağım sırasında personel ve meme hijyenine dikkat edilmemesi, peynir yapımı sırasında sütün pastörizasyon derecelerine kadar ısıtılmaması, üretim sonrası kullanılan alet ve ekipmanlardan kaynaklanan kontaminasyon kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda manda sütünden yapılan kaymaklarda *S. aureus* izolasyon oranı %18 olarak bulunmuştur. Çalışma bulgularımıza benzer olarak, Sağun ve ark. (2001), Van ilinden temin ettikleri kaymak örneklerinin %20'sinden *S. aureus* izole etmişlerdir. Çalışma bulgularımızdan yüksek olarak Pamuk ve ark. (2012), Afyonkarahisar ilinden temin ettikleri 120 manda kaymağının %21,6'sında, Kurt ve Özdemir (1988), Erzurum ilinden temin ettikleri 10 kaymak örneğinin %50'sinde, *S.aureus* izole etmişlerdir. Yine çalışma bulgularımızdan yüksek olarak Yılsay ve Bayizit (2002), Bursa ilinde tüketime sunulan 30 adet kaymak örneğinin %86,6'sında, Akalın ve ark. (2006), İzmir ilinde inek sütlerinden elde edilen 5 kaymak örneğinin %60'ında *Staphylococcus* spp. izole etmişlerdir.

Çalışma bulgularımızdan düşük olarak, Mashouf ve ark. (2015), İran'da temin ettikleri 66 kaymak örneğinin %6,1'inde, Muratoğlu (2010), ise İstanbul ilinden temin ettiği 6 kaymak örneğinin hiçbirinde *S. aureus* izole edilemediğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar kaymak üretiminde yüksek ısı işlem uygulanması ve incelenen örneklerin hijyenik koşullarda muhafazası nedeniyle etkenin izole edilememiş olduğunu belirtmiştir. Benzer şekilde bizim çalışmamızda da kaymak örneklerinde *S.aureus* insidensi çiğ süt ve peynirden daha düşük oranda bulunmuştur. Bölgemizde kaymak üretimi özel sipariş ile sınırlı sayıda üretilmekte olup semt pazarları gibi noktalarda satışa sunulmadan direk üreticiden tüketiciye ulaşmakta böylece kontaminasyon düzeyi düşük olmaktadır. Bunun yanında kaymak üretiminde yüksek ısı işlem uygulanması, ürünün hijyenik koşullarda muhafaza edilmesi gibi nedenlerle *S.aureus* ile kontaminasyon düzeyinin düşük olduğu kanısına varılmıştır.

Çalışmamızda incelenen 100 manda sütü örneğinin 65 (%65)'inin, 50 manda peyniri örneğinin 29 (%58)'unun, 50 manda kaymağı örneğinin ise 10 (%20)'unun Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'ne göre kabul edilebilir limit olan 10^2 kob/g düzeyini aştığı belirlenmiştir (Anon, 2011).

Çalışmamızda koagülaz pozitif stafilokok sayısı manda sütü örneklerinde $1,0 \times 10^1$ - $1,9 \times 10^5$ kob/ml arasında (ort $3,8 \times 10^3$ kob/ml), manda peyniri örneklerinde $2,0 \times 10^2$ - $1,3 \times 10^6$ kob/g arasında (ort $4,0 \times 10^4$ kob/g), manda kaymağı örneklerinde $2,0 \times 10^2$ - $6,0 \times 10^2$ kob/g (ort $2,8 \times 10^2$ kob/g) düzeyinde tespit edilmiştir.

Çalışmamızda manda sütü örneklerinin %65'inde koagülaz pozitif stafilokok tespit edilmiş olup çalışma bulgularımıza benzer şekilde Yıldırım ve ark. (2016), Amasya ilinde 50 çiğ süt örneğinin %64'ünde, Pamuk ve ark. (2012), Afyonkarahisar ilinde 120 manda sütünün, %60,8'inde koagülaz pozitif stafilokok tespit etmişlerdir. Çalışma bulgularımızdan düşük olarak Normanno ve ark. (2005), İtalya'da inceledikleri çiğ süt örneklerinin %38,4'ünde, Oliveira ve ark. (2011), Brezilya'da 548 çiğ manda sütünün %11,1'inde koagülaz pozitif stafilokok tespit etmişlerdir. Çalışmamızda manda sütlerinde koagülaz pozitif stafilokok sayısı ortalama $3,8 \times 10^3$ kob/ml olup çalışma bulgularımıza benzer olarak, Pamuk ve ark. (2012), inceledikleri manda sütlerinin ortalama $5,7 \times 10^3$ kob/ml düzeyinde koagülaz pozitif stafilokok içerdiğini bildirmişlerdir. Çalışma bulgularımızdan yüksek olarak Evrensel ve ark (2003), yaptıkları çalışmada çiğ süt örneklerinin ortalama $1,9 \times 10^4$ kob/ml, Rola ve ark. (2016), ise Polonya'da inceledikleri çiğ inek sütlerinin %46,2'sinin $0-1,2 \times 10^5$ kob/ml, Viçosa ve ark. (2010), Brezilya'da inceledikleri 31 çiğ süt örneğinin %54'ünün ortalama $4,2 \times 10^4$ kob/ml düzeylerinde koagülaz pozitif stafilokok içerdiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda manda peyniri örneklerinin %58'inin koagülaz pozitif stafilokok içerdiği tespit edilmiştir. Çalışma bulgularımızdan düşük olarak Tekinşen ve Çelik (1979), Elazığ ilinden temin ettikleri Şavak peynirlerin %20,5'inin, Küplülü ve ark. (2004), Ankara ilinden temin ettikleri 214 peynir örneğinin %26,2'sinin, Yıldırım ve ark. (2016), Amasya ilinden temin edilen 60 peynir örneğinin %30'unun, Pamuk ve ark. (2012), Afyonkarahisar ilinden temin ettikleri 120 manda peyniri örneğinin %33,3'ünün, Normanno ve ark. (2005), İtalya'da çeşitli peynir örneklerinin %23,7'sinin koagülaz pozitif stafilokok içerdiğini tespit etmişlerdir. Williams ve Syson (1984), ise Kıbrıs'ta başta hellim peyniri olmak üzere çeşitli peynirlerde yaptıkları çalışmada koagülaz pozitif stafilokok tespit edilmediğini bildirmişlerdir. Çalışma bulgularımızdan yüksek olarak Rola ve ark. (2016), Polonya'da inek sütünden üretilen 26 olgunlaşmış peynir örneğinin %69,2'sinin koagülaz pozitif stafilokok içerdiğini bildirmiştir.

Çalışmamızda manda peynirinde koagulaz pozitif stafilokok sayısı ortalama $4,0 \times 10^4$ kob/g olup, çalışma bulgularımıza benzer şekilde, Tekinşen ve Çelik (1979), Elazığ ilinden temin ettikleri taze Şavak peynirlerinin %20,5'nin $5,0 \times 10^5$ kob/g, Evrensel ve ark (2003), inceledikleri peynir örneklerinin ortalama $5,0 \times 10^4$ kob/g, Pamuk ve ark. (2012), ise inceledikleri manda peyniri örneklerinin %33,3'ünün $2,2 \times 10^4$ kob/g düzeyinde koagulaz pozitif stafilokok içerdiğini belirtmişlerdir. Çalışma bulgularından düşük olarak Usca ve Erol (1998), inceledikleri 50 adet hellim peyniri örneğinin %26'sının $1,0 \times 10^3$ kob/g düzeyinde koagulaz pozitif stafilokok içerdiğini bildirmişlerdir. Çalışma bulgularımızdan yüksek olarak, Viçosa ve ark. (2010), Brezilya'da 37 adet çiğ süttten üretilmiş peynir örneğinin %43'ünün ortalama $1,4 \times 10^5$ kob/g düzeyinde koagulaz pozitif stafilokok ile kontamine olduğunu belirtmiştir.

Çalışmamızda manda kaymağı örneklerinin %20'sinin koagulaz pozitif stafilokok içerdiği tespit edilmiştir. Çalışma bulgularımızdan yüksek olarak Pamuk ve ark. (2012), Afyonkarahisar ilinde 120 manda kaymağının %33,3'ünün, Rola ve ark. (2016), Polonya'da inek sütlerinden üretilen 27 kaymak örneğinin %70,4'ünün koagulaz pozitif stafilokok içerdiğini tespit etmiştir.

Çalışmamızda manda kaymağında koagulaz pozitif stafilokok sayısı ortalama $2,8 \times 10^2$ kob/g olup, çalışma bulgularımızdan daha yüksek olarak Pamuk ve ark. (2012), Afyonkarahisar ilinde 120 manda kaymağında ortalama $1,3 \times 10^4$ kob/g, Pamuk ve Gürler (2009), Afyonkarahisar ilinde inceledikleri 150 kaymaklı lokum örneğinde $8,0 \times 10^4$ kob/g düzeyinde koagulaz pozitif stafilokok tespit etmişlerdir. Süt ve süt ürünlerinin koagulaz pozitif stafilokoklarla yüksek düzeyde kontamine olması, toksin üretilmesine neden olabileceğinden halk sağlığı için oldukça önemlidir (Le Loir ve ark., 2003).

Stafilokokal gıda zehirlenmeleri başta *S.aureus* olmak üzere enterotoksijenik karakterdeki tüm stafilokoklar tarafından üretilen bir veya daha fazla enterotoksinin kontamine gıdalarla alınması sonucu şekillenmektedir. Stafilokokal enterotoksinler, fonksiyonel olarak birbiri ile yapısal, fonksiyonel ve filogenetik ilişkisi olan protein yapısında pirojenik ekzotoksinlerin bir üyesidir (Kluytmans ve ark., 1997).

Çalışmamızda *S. aureus* pozitif 56 manda sütü ve ürününden 9'unun (%16) en az bir enterotoksin içerdiği tespit edildi. Numune bazında dağılımına bakıldığında *S.aureus* pozitif 30 manda sütünün 6'sının (%20), 9 manda kaymağının 1'inin (%11),

17 manda peynirinin 2'sinin (%11) enterotoksijenik özellikte olduğu tespit edildi. İzolat bazında bakıldığında ise elde edilen 99 *S.aureus* izolatının 12 tanesinin (%12) enterotoksin ürettiği tespit edildi. Bu izolatların 8 tanesi manda sütü, 1 tanesi manda kaymağı, 3 tanesi de manda peynirinden elde edildi.

Çalışma bulgularımızdan yüksek olarak, Carfora ve ark. (2015), İtalya'da *S. aureus* pozitif 54 süt ve süt ürünü örneğinin 31'inin (%57,4) enterotoksijenik yapıda olduğunu belirtmişlerdir. Çalışma bulgularımıza benzer olarak, Küplülü ve ark. (2004), Ankara ilinde tüketime sunulan toplam 214 adet peynir (77 beyaz peynir, 65 tulum peyniri, 72 kaşar peyniri) örneğinin 35'inin (%16,4) enterotoksijenik stafilokok türleri ile kontamine olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda izole edilen 99 *S.aureus* izolatından %12'sinin (%12) enterotoksin ürettiği tespit edildi. Çalışma bulgularımıza benzer olarak, Neder ve ark. (2011), Arjantin'de 47 farklı çiftlikteki süt toplama tanklarından temin ettikleri süt örneklerinden izole ettikleri 94 *S. aureus* izolatının 11'inin (%11,7) enterotoksijenik karakterde olduğunu belirtmişlerdir. Çalışma bulgularımızdan yüksek olarak Ertaş ve Gönülalan (2010), Kayseri ilinde 100 adet çiğ süttten izole ettikleri 42 *S. aureus* izolatının 31'inin (%73,8), Muratoğlu (2010), İstanbul'da 225 çiğ süt ve süt ürünüden izole ettiği 52 *S. aureus* izolatının %32,6'sının, Rahimi ve Alian (2013), İran'da 200 adet süttten (inek, koyun,keçi,deve ve manda sütü) izole ettikleri 22 *S. aureus* izolatının %62,8'inin, Normanno ve ark. (2005), İtalya'da 3097 süt ve süt ürünüden izole ettikleri 362 *S. aureus* izolatının 217'sinin (%59,9), Morandi ve ark. (2007), İtalya'da 86 çiğ süt ve 26 süt ürünüden izole ettikleri 112 *S. aureus* izolatının 75'inin (%67), Normano ve ark. (2007), İtalya'da 641 çiğ süt ve süt ürünüden (mozzarella, ricotta, koyun ve sığır peynirleri, dondurma) izole ettikleri 109 *S. aureus* izolatının %54'ünün, Rall ve ark. (2008), Brezilya'da 54 adet çiğ ve pastörize süttten izole ettikleri 57 *S. aureus* izolatının %68,4'ünün en az bir enterotoksin içerdiğini bildirmişlerdir. Çalışma bulgularımızdan düşük olarak, Pajć ve ark. (2016), Sırbistan'da 111 adet inek süttünden izole ettikleri 62 *S. aureus* izolatının 5'inin (%6,67) en az bir enterotoksin taşıdığını belirtmiştir. Bostan ve ark. (2006), İstanbul ilinde 30 adet beyaz peynir örneğinden izole ettikleri 11 *S. aureus* izolatının, Gencay ve ark. (2010), Kırıkkale ilinde 24 süt ürünüden elde ettikleri 17 *S.aureus* izolatının ve Can (2011), Ankara ilinde 100 adet

beyaz peynirden izole ettiği 5 *S. aureus* izolatının hiçbirinde enterotoksijenik *S. aureus* tespit edilemediğini belirtmişlerdir.

S. aureus izolatlarının enterotoksijenik özelliklerine bakıldığında çalışmamızda manda sütü ve ürünlerinden en çok SEA tipi (%41,2) enterotoksin elde edildiği bunu SEC ve SED (%25) tipi toksinlerin takip ettiği görülmüştür. Yapılan literatür taramalarında benzer şekilde süt ve süt ürünlerinde SEA, SEC ve SED tipi toksinlerin en sık üretildiği gözlemlenmiştir (Normanno ve ark., 2005; Jorgensen ve ark., 2005; Morandi ve ark. 2007; Ertaş ve Gönülalan, 2010; Muratoğlu, 2010; Neder ve ark., 2011).

Muratoğlu (2010), İstanbul ilinde çiğ sütlerden temin edilen 42 *S. aureus* izolatının 12'sinin (%28,5), peynirlerden izole edilen 10 *S. aureus* izolatının 5'inin (%50) en az bir enterotoksin geni taşıdığını belirtmiştir. Aynı çalışmada çalışma bulgularımıza benzer olarak çiğ sütlerden elde edilen izolatların 8'inin *sec* (%19,4) ve 5'inin *sea* (%14,9), peynirlerden elde edilen izolatların ise 3'ünün *sea* (%60) gen dağılımına sahip olduğunu bildirmiştir. Can (2011), Ankara ilinde farklı marketlerde satışa sunulan 100 adet tulum peyniri örneğinden elde ettiği 7 izolattan 3'ünün (%42,8) (2 adet SEC,1 adet SEC-SED birlikte) enterotoksijenik karakterde olduğunu belirtmiştir. Morandi ve ark. (2007), İtalya'da çeşitli hayvan türlerinden (inek, manda, koyun, keçi) elde edilen 86 çiğ süt ve 26 süt ürününden (peynir, tereyağı, kaymak) izole ettikleri 112 *S. aureus* izolatından 75'inin (%67) en az bir veya daha fazla toksin geni taşıdığını ve tespit edilen toksinlerin sıklığı bakımından çalışma bulgularımıza benzer olarak izolatların 36'sının (%48) SEA, 37'sinin (%49,3) SED ve 15'inin (%20) SEC tipi toksin ürettiklerini belirtmişlerdir.

Yapılan çalışmalarda *S. aureus* enterotoksinlerinin neden olduğu stafilokokal gıda zehirlenmelerinin %95'ine SEA, SEB, SEC, SED ve SEE tipi toksinlerin neden olduğu bildirilmektedir. Bu toksin tipleri içinde stafilokokal infeksiyonların yaklaşık %80'ine A tipi toksinlerin neden olduğu bunu SEB ve SED'nin izlediği bildirilmektedir. (Bergdoll, 1983). SEA ve SED tipi toksinlerin en sık görülme nedeni bu toksinlerin asıl kaynağının insan orijinli olması, logaritmik üreme fazında primer metabolit olarak oluşması, olumsuz çevre koşulları dirençli olmasından kaynaklanmaktadır (Erol, 2007).

Son yıllarda yapılan moleküler çalışmalarla stafilokokların yaygın olarak izole edilen toksin tiplerinin yanı sıra çok sayıda farklı enterotoksin tipi (SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SEU) üretebilme potansiyeline sahip oldukları bildirilmiştir (Omoe ve ark., 2003).

Çalışmamızda incelediğimiz izolatların %12'sinin *sea*, *seb*, *sec*, *sed* ve *see* genlerine sahip olması, %88'inin enterotoksin oluşturmadığı anlamına gelmemelidir. Negatif izolatların %5 lik kısmı temsil eden diğer enterotoksin tiplerini oluşturabilme potansiyeli olduğu ve stafilokokal gıda intoksikasyonlarına neden olabileceği göz ardı edilmemelidir. Gıda maddesinin türü ile ilişkili olarak şekillenen zehirlenme vakalarında klasik toksinlerin yanı sıra diğer toksin tiplerinin de yüksek düzeylerde tespit edildiğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Jorgensen ve ark. 2005).

Nitekim yapılan çeşitli çalışmalar incelendiğinde; Rall ve ark. (2008), Brezilya'da çiğ ve pastörize sütlerden izole ettikleri 57 *S. aureus* izolatında klasik enterotoksinlerin yanı sıra 11 izolatta (%19,2) SEG, 10 izolatta (%17,5) SEI ve 3 izolatta (%5,2) SEH ve SEJ tipi toksin tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Hait ve ark. (2014), ABD'de 585 adet çevresel swap ile 16 çiğ hammadde içeren çeşitli gıdalardan izole ettikleri 85 *S. aureus* izolatının 81'inin (%95,3) klasik enterotoksin tiplerini ürettiğini, 4'ünün (%4,7) ise klasik olmayan enterotoksin tiplerini içerdiğini belirtmişlerdir. Bianchi ve ark. (2014), İtalya'da 1245 süt ve süt ürününden (848 çiğ süt, 397 süt ürünü) izole ettikleri 481 *S. aureus* izolatının 255'inin (%53) bir yada daha fazla enterotoksin ürettiğini belirtmişlerdir. Çalışma bulgularımızdan farklı olarak klasik enterotoksinlerin yanı sıra 134 (%28) izolatta SER tipi toksin sonra sırasıyla 120 izolatta (%25) SED ve 120 izolatta (%25) SEIJ tipi toksin tiplerini tespit ettiklerini bildirilmişlerdir. Nazari ve ark. (2014), İran'da 8 farklı çiftlikten elde ettikleri 246 süt örneğinden elde ettikleri 52 *S. aureus* izolatının 42'sinin (%80,7) en az bir enterotoksin geni taşıdığını ve çalışmamızla benzer olarak SEA tipi toksinin en fazla izole edilen toksin olduğunu ve klasik toksin tiplerinin yanı sıra 8 izolatta (%15,8) SEG ve SEH tipi, 6 izolatta (%11,5) SEJ tipi, ve 1 izolatta (%3,8) SEİ tipi toksinlerin tespit edildiğini bildirmişlerdir.

Stafilokokal gıda intoksikasyonlarında klasik enterotoksin tiplerinin yanın sıra yeni tanımlanan ve klasik olmayan toksin tiplerinin de rolü hafife alınmamalıdır. Gerek çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar gerekse literatür bilgileri incelendiğinde SEA ve

SED tipi toksinlerin yanı sıra SEC'nin de kontamine süt ve süt ürünlerinden sıklıkla izole edildiği ve bu ürünlerin tüketimine bağlı olarak gıda kaynaklı stafilokokal intoksikasyonların oluşabileceği kanaatine varılmıştır.

Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşları sahip oldukları antimikrobiyal direnç, virülans faktörleri ve enfeksiyon oluşturma yetenekleri gibi özellikleri nedeniyle dünya çapında nazokomiyal ve toplum kökenli enfeksiyonlarda insan sağlığı açısından büyük bir tehdit oluşturmaktadır (Chambers, 2005). Antibiyotiklerin tedavi, koruma ve verim arttırmak amacıyla bilinçsiz ve yüksek dozlarda kullanılması sonucu oluşan antimikrobiyel direnç önemli bir halk sağlığı problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca oluşan bu direnç tedavide başarısızlıkları beraberinde getirmekte, yeni ve daha kuvvetli antimikrobiyel ajanlara ihtiyaç duyulmasına sebep olmaktadır (Perreten ve ark., 1997).

Hayvansal kökenli gıdalarda metisilin dirençli *S.aureus*'ların (MRSA) kontaminasyonu çiftlik, mezbaha, gıda üretim ve işleme alanları ve bu alanlarda çalışan personel tarafından şekillenebilmektedir. Yapılan çalışmalarda gıda orjinli MRSA suşlarının prevalansının hastane ve toplumsal orjinli MRSA suşlarına oranla oldukça düşük düzeylerde olduğu bildirilmiştir (Shimamura ve ark., 2009). Toplumsal orjinli MRSA suşları direkt temas yoluyla bulaşabileceği gibi hayvansal orjinli gıdaların tüketimi yoluyla da bulaşabilmekte ve gıda kaynaklı hastalıkların yanı sıra deri enfeksiyonlarından pnömoniye varan ölümcül enfeksiyonlara neden olabilmektedir. (Stastkova ve ark., 2009).

Hastane kökenli MRSA suşlarına özellikle yoğun bakım üniteleri gibi invaziv girişimin fazla olduğu kliniklerde fazla rastlanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda MRSA direnç oranlarının %70'lere ulaştığı bildirilmiştir (Eşel ve ark., 2003). Ersoy ve ark. (2003), İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde hastane enfeksiyonlarını araştırdıkları çalışmada metisilin direncini %89,2 olarak bildirmişlerdir. Klevens ve ark. (2007), ABD'de hastane kökenli invaziv MRSA enfeksiyonlarını araştırdıkları bir çalışmada direnç oranını %26,6 olarak bildirmişlerdir. Hastane kökenli MRSA suşlarının gıda ve toplumsal orjinli MRSA suşlarından daha yüksek olmasına, sağlık personelinde nazal *S. aureus* taşıyıcılığının daha yüksek olması (%50-70), hasta odalarının koşulları, kateter gibi gereçlerin kullanımı, kronik ve bilinçsiz antibiyotik ilaç

kullanımı, reçetesiz antibiyotik satışı, yetersiz veya yanlış tedaviler gibi birçok faktörün neden olabileceği belirtilmektedir (Sherertz ve ark., 1993).

Gıdalarda metisilin direncinin belirlenmesinde kullanılan metisilin disklerinin güvenilir sonuç vermediği bu nedenle metisilin direncinin tespiti amacıyla metisilin disklerinin yerine oxacillin ve cefoxitin disklerinin birlikte kullanılması gerektiği önerilmektedir (Cauwelier, 2004; CLSI, 2011).

Fenotipik metisilin direncinin belirlenmesi amacıyla çalışmamızda oxacillin (1 µg) ve cefoxitin (30 µg) diskleri kullanılarak disk difüzyon testleri yapıldı. MİK değerlerinin belirlenmesi için ise E-Test yöntemi kullanıldı. Çalışma bulgularımız sonucunda 99 *S. aureus* izolatının 16'sının (%16) oxacillin ve/veya cefoxitine karşı dirençli olduğu tespit edildi. Tespit edilen sonuçlara göre çiğ süt numunelerinden elde edilen 57 izolattan 8'inin (%14), kaymaklardan elde edilen 9 izolattan 3'ünün (%33) ve peynirlerden elde edilen 33 izolattan 5'inin (%15) oxacillin ve/veya cefoxitine karşı dirençli olduğu belirlendi. Disk difüzyon testi sonucunda 99 *S. aureus* izolatının 7'sinin (%7) yalnızca oxacilline, 2'sinin (%2) yalnızca cefoxitine ve 7'sinin (%7) ise her iki antibiyotiğe karşı dirençli olduğu belirlendi. MİK değerlerinin tespiti amacıyla yapılan E-Test yöntemi sonucunda oxacilline dirençli izolatların MİK değerlerinin 4-64 µg/ml, cefoxitine dirençli izolatların MİK değerlerinin ise 8-24 µg/ml arasında olduğu tespit edildi.

Gıda orjinli MRSA suşlarının tespitine yönelik gerek ülkemizde gerekse çeşitli ülkelerde çiğ süt ve süt ürünleri, kırmızı ve beyaz et ve et ürünleri gibi çeşitli hayvansal gıdalar üzerinde yapılan çalışmalarda farklı izolasyon oranları bildirilmiştir. Çalışma bulgularımızla benzer olarak Can (2011), Ankara'da 200 adet beyaz peynir ve tulum peyniri örneğinden izole ettiği 12 *S.aureus* izolatından 2'sinin (%16,2) fenotipik olarak (disk difüzyon testi) metisiline dirençli olduğunu belirtmiştir. Çalışma bulgularımızdan düşük olarak, Pamuk ve ark. (2012), Afyonkarahisar ilinde 360 örnekten (120 manda sütü, 120 manda peyniri, 120 manda kaymağı) elde ettikleri 97 izolatın fenotipik olarak (disk difüzyon testi) 9'unun (%9,2), Ünal ve İstanbulluoğlu (2009), Kırıkkale ilinde mastitli süt, inek meme başı ve hayvan bakıcılarından izole ettikleri toplam 96 *S. aureus* izolatından 3'ünün (%3,1) fenotipik olarak (E-test) oxacilline dirençli olduğunu tespit etmişlerdir. Nam ve ark. (2011), Kore'de mastitisli süt ineklerinden izole ettikleri 402 adet *S.aureus* izolatından 25'inin (%6,2) fenotipik olarak oxacillin ve cefoxitine karşı

dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Pu ve ark. (2014), Çin Halk Cumhuriyeti'nde mastitisli sığırlardan izole ettikleri 103 *S. aureus* izolatının 13'ünün (%12,6) fenotipik olarak oxacilline dirençli olduğunu belirtmişlerdir.

Genotipik metisilin direncinin belirlenmesi amacıyla çalışmamızda elde edilen *S. aureus* izolatlarında *mecA* geni varlığı PCR ile araştırıldı. Elde edilen bulgular sonucunda 99 *S. aureus* izolatının 9'unun (%9) *mecA* geni taşıdığı tespit edildi. İzolatların numune bazında dağılımına bakıldığında çiğ süttten elde edilen 8 izolatın, peynirlerden elde edilen 1 izolatın *mecA* geni içerdiği tespit edildi. Kaymak örneklerinde ise MRSA'ya rastlanılmadı. Çalışma bulgularımıza benzer olarak, Pamuk ve ark. (2012), Afyonkarahisar ilinden temin ettikleri 360 manda sütü ve süt ürününden izole edilen 97 *S. aureus* izolatının 9'unun genotipik olarak *mecA* geni taşıdığını (%9,2) belirtmişlerdir. Araştırmacılar çalışmamızdan farklı olarak fenotipik yöntemlerle (disk difüzyon) oxacilline dirençli buldukları 9 izolatın tamamının genotipik olarak *mecA* geni içerdiğini belirtmişlerdir. Vanderhaegen ve ark. (2010), Belçika'da mastitisli süt örneklerinden elde ettikleri 118 adet *S. aureus* izolatının 11'inin (%9), Rizek ve ark. (2011), Brezilya'da hazır gıda maddeleri ve hazır yemeklerden elde ettikleri 57 *S. aureus* izolatının 5'inin (%9), Basanisi ve ark. (2017), İtalya'da 3760 örnekten (süt ve süt ürünleri) elde ettikleri 484 *S. aureus* izolatın 40'ının (%8,3) genotipik olarak *mecA* geni taşıdığını belirtmişlerdir. Çalışma bulgularımızdan düşük olarak, Normanno ve ark. (2007a), İtalya'da 1634 adet gıda örneğinden (süt, süt ürünleri, et, et ürünleri) elde edilen 160 *S. aureus* izolatının 6'sının (%0,4) *mecA* geni taşıdığını ve MRSA pozitif tüm izolatların çiğ inek sütü ve peynirlerden elde edildiğini belirtmişlerdir. Pereria ve ark., (2009), Portekiz'de çeşitli gıda maddelerinden (çiğ inek sütü, peynir, çiğ et, fermente et ürünleri) elde ettikleri 148 koagulaz pozitif stafilokok izolatının yalnızca 1'inin (%0,68), Nam ve ark. (2011), Kore'de mastitisli süt ineklerinden izole ettikleri 402 adet *S. aureus* izolatının 17'sinin (%4,2) genotipik olarak metisiline dirençli *S. aureus* olduğunu bildirmişlerdir.

Metisilin direnci homojen ve heterojen direnç olarak karşımıza çıkmaktadır. Homojen dirençte bakteriler *mecA* genine sahiptir ve bu gen fonksiyonel durumdadır. Bakteriler yüksek konsantrasyondaki metisilin varlığında üreyebilmekte ve yüksek düzeyde direnç ortaya koymaktadır. Heterojen dirençte ise bakteriler *mecA* geni taşımalarına rağmen sadece belirli kısmında direnç açığa çıkmaktadır. Homojen

dirençte *mecA* genine sahip bakterilerde oxacillin MİK değeri >4 mg/L iken direnç şekillenmekte, heterojen dirençte ise *mecA* genine sahip bakterilerde oxacillin MİK değeri ≤ 2 mg/L altında yani oxacilline duyarlı iken direnç şekillenebilmektedir (Chambers, 1988; Hartman ve Tomasz, 1986; Jacoby ve Archer, 1991).

Bu veriler ışığında çalışmamızda elde edilen 99 *S. aureus* izolatının 16'sının fenotipik, 9'unun ise genotipik olarak metisiline dirençli olduğu tespit edildi. Çiğ sütlerden elde edilen 5 izolatın genotipik olarak *mecA* geni taşımasına rağmen fenotipik olarak (disk difüzyon testi) oxacillin ve cefoxitine duyarlı olduğu görüldü. Bu izolatların E-test yöntemi ile MİK değerleri incelendiğinde, MİK değerlerinin de düşük olduğu görüldü. *mecA* geni tespit edilen diğer 4 izolatın ise hem genotipik hem de fenotipik olarak dirençli olduğu, oxacillin ve cefoxitin disk difüzyon testleri ile E-Test yönteminin sonuçlarının uyumlu olduğu görüldü. Çalışmamızda *mecA* geni taşıdığı halde fenotipik yöntemlerle oxacillin ve cefoxitine duyarlı bulunan 5 izolatın (%5) MİK değeri <2 mg/L elde edilmesi bu izolatların heterojen dirence sahip olması ve oksasiline duyarlı *mecA* pozitif *S. aureus* olmaları ile ilişkilendirildi.

Fenotipik yöntemlerle metisilin direncinin belirlenmesi amacıyla yapılan testlerde sonuçların inkübasyon süresi, düşük sıcaklıkta inkübasyon, inokülüm düzeyi, sodyum klorür (NaCl) ilavesi ve ortamın pH'sı gibi birçok koşuldaki etkilenebileceği ve direncin belirlenmesinde hatalı sonuçlar ortaya çıkabileceği bildirilmektedir (Cauwelier ve ark., 2004). Heterodirençli MRSA suşlarının fenotipik yöntemlerle her zaman doğru olarak tanımlanamadığından dolayı metisilin direncinin belirlenmesinde *mecA* geninin tespiti altın standart olarak kabul edilmiştir (Tomasz ve ark., 1991).

Stafilokoklarda metisilin direnci; değiştirilmiş penisilin bağlayıcı protein 2a (PBP2a) tarafından kodlanan ve beta-laktam antibiyotiklere karşı affiniteyi azaltan *mecA* geninin varlığına bağlıdır (Oliveira ve de Lencastre, 2002). Bu çalışmada metisiline fenotipik direnç gösteren 16 izolattan yalnızca 5'inin (%31,2) PBP2a'yı eksprese ederek *mecA* geni taşıdığı belirlendi. Çalışmamıza benzer şekilde yapılan araştırmalarda fenotipik dirence yalnızca *mecA* geninin aracılık etmediği ve bu tip direncin beta-laktamaz ve metisilinaz enzimlerinin üretimine bağlı olarak PBP2a'da şekillenen değişikliklerden kaynaklanabileceği belirtilmektedir. Bununla birlikte fenotipik olarak metisiline dirençli olmayan ve *mecA* geni taşıdığı belirlenen izolatların

ciddi sağlık sorunlarına neden olabileceği ve klinik açıdan buyk öneme sahip olduğu bildirilmiştir (Oliveira ve de Lencastre, 2002; Swenson ve ark., 2007).

Çalışma bulgularımıza benzer olarak Türkyılmaz ve ark. (2010), MRSA tespitinde fenotipik ve genotipik yöntemler arasında fark olduğunu ve moleküler teknikler ile daha iyi sonuç elde edildiğini belirtmişlerdir. Cekovska ve ark. (2005), MRSA tespiti için oxacillin disk difüzyon, mikrodilüsyon ve oxacillin agar tarama testlerini karşılaştırmış, heterojen dirençten dolayı test sonuçlarının değişkenlik gösterdiğini ve bu testlerin başka bir konvansiyonel yöntemle birlikte kullanılması gerektiğini belirtmiştir. Lee (2003), Kore’de sığır, domuz ve tavuk kaynaklı 1,913 örnekten elde ettikleri 421 *S. aureus* izolatından 28’inin (%6,65) fenotipik olarak MRSA olduğunu, fakat genotipik değerlendirmede çalışmamıza benzer olarak sadece 15’inin (%3,56) MRSA pozitif bulunduğunu bildirmişlerdir. Pu ve ark. (2014), Çin Halk Cumhuriyeti’nde mastitisli sığırlardan izole ettikleri 103 *S. aureus* izolatının 49’unun (%47,6) *mecA* geni taşıdığını çalışmamıza benzer olarak *mecA* pozitif bulunan 49 izolattan 37’sinin (%75) fenotipik olarak oxacilline duyarlı olduğunu belirtmiştir. Aynı araştırmacılar elde ettikleri izolatların çalışmamızla benzer şekilde oxacilline duyarlı *mecA* pozitif *S. aureus* (OS-MRSA) olduğunu bildirmişlerdir.

Yapılan alışmalar sonucunda antibiyotik duyarlılık testlerinin fenotipik değişikliklerden (düşük sıcaklıkta inkübasyon, inokülüm düzeyi, sodyum klorür (NACI) ilavesi ve ortamın pH’sı, ışık ve iyon tutucu maddeler vb.) etkilendiği, buna karşın genotipik yöntemlerin daha duyarlı ve güvenilir olduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak çalışmamızda da fenotipik ve genotipik metisilin direncinin farklı insidenslerde bulunması her iki testin de birlikte yapılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Samsun iline bağlı 4 ilçede (Çarşamba, Bafra, Terme ve 19 Mayıs) manda yetiştiriciliği yapan 30 işletmeden elde edilen 100 adet manda sütünün 30'unun (%30), 50 adet manda kaymağının 9'unun (%18) ve 50 adet manda peynirinin 17'sinin (%34) *S. aureus* ile kontamine olduğu saptandı. Çalışmamızda elde ettiğimiz *S. aureus* izolatlarının %12'sinin enterotoksin oluşturduğu ve en sık SEA ve SEC+SED tiplerinin elde edildiği görüldü.

Çalışmamızda antibiyotik dirençlilik testleri sonucunda izolatların %16'sının fenotipik olarak, %9'unun ise *mecA* geni içererek genotipik olarak metisiline dirençli olduğu belirlendi. Ayrıca çalışmada fenotipik olarak direnç göstermeyen ancak genotipik incelemeler sonucu metisiline dirençli bulunan *S. aureus* (OS-MRSA) izolatlarının bulunması klinik açıdan önem taşımaktadır. Antibiyotiklere karşı artan direncin önlenmesi için üreticilerin bilinçsiz ve gelişmiş ilaç kullanımı konusunda bilgilendirilmeleri önerilmektedir.

Çalışmamızda işletmelerden temin ettiğimiz çiğ süt ve peynirlerin genellikle hijyenik olmayan koşullarda muhafaza edildiği, peynir yapımı aşamasında sütün kaynatılmadan maksimum 40-45°C'ye kadar ısıtıldığı ve mayalandığı gözlemlenmiştir. Bu süt ve süt ürünlerinde *S.aureus*'un %28 oranında bulunması halk sağlığı açısından önemli bir problemdir.

Sonuç olarak manda sütü ve ürünlerinde enterotoksijenik ve metisiline dirençli *S. aureus*'ların tespit edilmesi halk sağlığı açısından önemli bulunmuştur. Bu nedenle sektördeki üreticilerin üretim teknikleri, hijyen ve muhafaza koşulları konularında eğitilmeleri, tüketicilerin ise bu tip çiğ ya da düşük ısı işlemi görmüş ürünleri tüketmemeleri konusunda bilgilendirilmeleri gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Anon 2003. Türk Gıda Kodeksi Krema ve Kaymak Tebliği. <http://www.resmigazete.gov.tr/main.aspx?home=http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2003/09/20030927.htm&main=http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2003/09/20030927.htm>, 2017.
- Anon 2007. Manda Ürünleri. Hasad Hayvancılık Dergisi Sayı 271. İstanbul Bilnet Matbaacılık. 2007;14-16.
- Anon 2008. Todar's Online Textbook Of Bacteriology. *Staphylococcus*. http://textbookofbacteriology.net/staph_2.html, 2017.
- Anon 2009. Türk Gıda Kodeksi Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliğinde Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliğ (tebliğ no: 2009/14) <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2009/02/20090206-16.htm>, 2017.
- Anon 2011. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği. <http://mevzuat.basbakanlik.gov.tr/Metin.Aspx?MevzuatKod=7.5.15690&MevzuatIlski=0&sourceXmlSearch=g%C4%B1da>, 2017.
- Anon, 2014. UK Standards for Microbiology Investigations. Deoxyribonuclease Test. Bacteriology – Test Procedures TP 12,3:1-14.
- Anon 2015. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü. Hayvancılık Bilgi Sistemi, <http://hbsapp.tarim.gov.tr/Modules/TURKVET/Pages/TurkvDefault.aspx>, 2017.
- Anon 2015a. BBL™ CHROMagar™ MRSA II/ BBL™ CHROMagar™ *Staph aureus*. Quality Control Procedures, [https://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L010678\(02\).pdf](https://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L010678(02).pdf), 2017.
- Abo-Shama UH. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from cattle, buffalo, sheep and goat raw milk in Sohag Governorate, Egypt. Vet Med J 2014; 60-63.
- Adams MR, Moss MO. *S. aureus* in Food Microbiology. Allen Press, England. 1993;7:205-210.
- Adams MR, MOSS MO. Chapter 7, Bacterial Agents of Foodborne Illness. *Staphylococcus aureus*. In: Food Microbiology, Third Edition, The Royal Society of Chemistry, UK. 2008; 252-257.
- Adwan G, Abu-Shanab B. Adwan K. Enterotoxigenic *S. aureus* in raw milk in the North of Palestine. Turkish J Biol 2005; 29:229-232.
- Aestrup FM, Wegener HC. The effects of antibiotic usage in foodanimals on the development of antimicrobial resistance of importance for humans in *Campylobacter* and *Escherichia coli*. Microbes Infect 1999;1(8):639-44.

- Ahmad S, Gaucher I, Rousseau F, Beaucher E, Piot M, Grongnet JF, Gaucheron F. Effects of acidification on physico-chemical characteristics of buffalo milk: A comparison with cow's milk. *Food Chem* 2008;106(1):11-17.
- Akalın AS, Gönç S, Ünal G, Ökten S. Determination of some chemical and microbiological characteristics of Kaymak. *Grasas Y Aceites* 2006;57(4):429-432.
- Akindolire MA, Babalola OO, Ateba CN. Detection of Antibiotic Resistant *Staphylococcus aureus* from Milk: A Public Health Implication. *Int J Environ Res Public Health* 2015;12(9):10254-10275.
- Alen S, Koneman E, Janda W, Schreckenberger PC, Winn WC. The Gram-positive cocci: Part 1: Staphylococci and related organism. Eds. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5th Ed, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2006; 539-576.
- 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;27:1457-1462.
- Alişarlı M, Solmaz H. Sağmal İneklerin Meme Başı Derileri ve Çiğ Sütlerinden İzole Edilen *Staphylococcus aureus*'ların Patojenite Özellikleri ile Bazı Antibiyotiklere Duyarlılıkları. *Atatürk Üniv Ziraat Fak Derg* 2003;34(4):333-339.
- Alonzo F, Torres VJ. The bicomponent pore-forming leucocidins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Mol Biol R* 2014;78(2):199-230.
- Altbaum Z, Hertman I, Sarid S. Penicillinase plasmid-linked genetic determinants for enterotoxins B and C1 production in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 1985;47(2):514-521.
- Andre MCDPB, 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 Control* 2008;19:200-207.
- Archer GL. *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. *Clin Infect Dis* 1998;26(5):1179-1181.
- Arfatahery N, Davoodabadi A, Abedimohtasab T. Characterization of toxin genes and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates in fishery products in Iran. *Sci Rep* 2016;6:34216.
- Aydın A, Sudagiden 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* 2011;148(2):99-106.

- Baird-Parker AC. An improved diagnostic and selective medium for isolating for isolating coagulase positive Staphylococci. *J Appl Bact* 1962;25:12-19.
- Baird-Parker AC. The staphylococci: an introduction. *J App Bacteriol* 1990; 69(19):1-8.
- Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbiol* 2000; 61(1):1-10.
- Bannerman TL. "Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase-Positive Cocci That Grow Aerobically," In: P. R. Murray, et al., Eds., *Manual of Clinical Microbiology*, ASM Press, Washington DC. 2003;384-404.
- Barrett FF, McGehee RF Jr, Finland M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at Boston City Hospital. Bacteriologic and epidemiologic observations. *N Engl J Med* 1968;279:441-448.
- Basanisi MG, Nobili G, La Bella G, Russo R, Spano G, Normanno G, La Salandra G. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from sheep and goat cheeses in southern Italy. *Small Ruminant Res* 2016;135: 17-19.
- Basanisi MG, La Bella G, Nobili G, Franconieri I, La Salandra G. Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk and dairy products in South Italy. *Food Microbiol* 2017; 62:141-146.
- Baumgart J. *Mikrobiologische Untersuchungen von Lebensmitteln* Behr's Verlag. Robert Seeman GmbH&Co, Hamburg. 1997.
- Bayles KW, Iandolo JJ. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. *J Bacteriol* 1989;171(9):4799-4806.
- Beckers HJ, Van Leusden FM, Bindschedler O, Guerraz D. Evaluation of a pour plate system with rabbit plasma-bovine plasma-agar for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in food. *Can J Microbiol* 1984;30(4):470-474.
- Becker K, Friedrich AW, Lubritz G, Weilert M, Peters G, Von Eiff C. Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. *J Clin Microbiol* 2003;41(4):1434-1439.
- Bennett RW, Lancette GA. *Staphylococcus aureus*. Chapter 12. In: *FDA's Bacteriological Analytical Manual*, 8th Edition, Revision A. 1998.
- Bennett RW, Lancette GA. *Bacteriological analytical manual Chapter 12: Staphylococcus aureus*, <https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratory-methods/ucm071429.htm>, 2001, 2017.

- Bennett SD, Walsh KA, Gould LH. Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*-United States, 1998–2008. *Clin Infect Dis* 2013;57(3):425-433.
- Bergdoll MS, Surgalla MJ, Dack GM. Staphylococcal enterotoxin: Identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin neutralizing property. *J Immunol* 1959;83(3):334-338.
- Bergdoll MS, Borja CR, Avena RM. Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C. *J Bacteriol* 1965;90(5):1481-1485.
- Bergdoll MS, Borja CR, Robbins RN, Weiss KF. Identification of enterotoxin E. *Infect Immun* 1971;4(5):593-595.
- Bergdoll MS. Enterotoxins, *Staphylococci* and *staphylococcal* infections. Academic Press Inc New York. 1983;559-598.
- Bergdoll MS. *Staphylococcus aureus*. In, Doyle MP (Ed): Foodborne bacterial pathogens. Pp. Marcel Dekker, Inc., New York. 1989;463-523.
- Bergdoll MS, Lee Wong AC. Staphylococcal intoxications. In: (eds.: Rieman HP, Cliver, DO) Foodborne Infections and Intoxications. Academic Press, Elsevier Inc., San Diego, California. 2006;523-562.
- Betley MJ, Mekalanos JJ. Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage. *Science* 1985;229:185-187.
- Bhakoo M, Birkbeck TH, Freer JH. Interaction of *Staphylococcus aureus* delta-lysin with phospholipid monolayers. *Biochemistry* 1982;21(26):6879-6883.
- Bhargava K, Wang X, Donabedian S, Zervos M, da Rocha L, Zhang Y. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in retail meat, Detroit, Michigan, USA. *Emerg Infect Dis* 2011;17(6):1135-1137.
- Bhatia A, Zahoor S. *Staphylococcus aureus* enterotoxins: A review. *J Clin Diagn Res* 2007;3(1):188-197.
- Bianchi DM, Gallina S, Bellio A, Chiesa F, Civera T, Decastelli L. Enterotoxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Italy. *Lett Appl Microbiol* 2014;58(2):190-196.
- Bilal MQ, Suleman M, Raziq A. Buffalo: Black gold of Pakistan. *Livestock Res Rural Dev* 2006;18(9):128.
- Bokarewa MI, Jin T, Tarkowski A. "*Staphylococcus aureus*: Staphylokinase". *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38(4):504-509.

- Boost MV, Wong A, Ho J, O'Donoghue M. Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from retail meats in Hong Kong. *Foodborne Pathog Dis* 2013;10(8):705-710.
- Borghese A, Mazzi M. Buffalo population and strategies in the world. *Buffalo production and research* 2005;67:1-39.
- Borst DW, Betley MJ. Phage-associated differences in staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*) expression correlate with *sea* allele class. *Infect Immun* 1994;62(1):113-118.
- Bostan K, Çetin Ö, Büyükcinal SK, Ergün Ö. The presence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in ready-to-cook meatballs and white pickled cheese. *İstanbul Üniv Vet Fak Derg* 2006;32(3):31-39.
- Brakstad O, Aasbakk K, Maeland J. 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. *Staphylococcus aureus*. New Zealand Institute for Crop & Food Research Limited. Private Bag, Christchurch, New Zealand. 2004;4704;1-6.
- Bridson EY. *The Oxoid Manual* 9th Edition. Oxoid Ltd., pp Hampshire. 2008; 215-216.
- Brown DF, Edwards DI, Hawkey PM, Morrison D, Ridgway GL, Towner KJ. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Antimicrob Chemother* 2005;56(6):1000-1018.
- Can HY. Farklı tip peynirlerde *Staphylococcus aureus*'un enterotoksin oluşturma yeteneği ile antibiyotik direncinin belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Doktora Tezi. 2011;53-54.
- Cauwelier B, Gordts B, Descheemaeker P, Van Landuyt H. Evaluation of disk diffusion method with cefoxitin (30 µg) for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23(5):389-92.
- Carfora V, Caprioli A, Marri N, Sagrafoli D, Boselli C, Giacinti G, Giangolini G, Sorbara L, Dottarelli S, Battisti A, Amatiste S. Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Central Italy. *Int Dairy J* 2015; 42:12-15.
- Casman EP, Bennett RW, Dorsey AE, Issa JA. Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. *J Bacteriol* 1967; 94(6):1875-1882.

- CDC 2011. Estimates of Foodborne Illness in the United States. http://www.cdc.gov/foodborneburden/PDFs/FACTSHEET_A_FINDINGS_updated_4-13.pdf, 2017.
- CDC 2016. Foodborne Outbreak Tracking and Reporting Foodborne Outbreak Online Database (FOOD Tool) <http://wwwn.cdc.gov/foodborneoutbreaks/>, 2017.
- Cekovska Z, Panovski N, Petrovska M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility test methods with *mecA* gene analysis for determining oxacillin (methicillin) resistance in our clinical isolates. *Bratisl Lek Listy* 2005;106(4-5):163-167.
- Chaibenjawong P, Foster SJ. Desiccation tolerance in *Staphylococcus aureus*. *Arc Microbiol* 2011;193(2):125-35.
- Chambers HF. Methicillin-resistant staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 1988;1(2):173-186.
- Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 1997;10(4):81-791.
- Chambers HF. Community-associated MRSA-resistance and virulence converge. *New Engl J Med* 2005; 352:1485-1487.
- Chambers HF, DeLeo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* 2009;7(9):629-641.
- Chatterjee AN. Use of bacteriophage-resistant mutants to study the nature of the bacteriophage receptor site of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1969; 98(2):519-527.
- Chongtrakool P, Ito T, Ma XX, Kondo Y, Trakulsomboon S, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chavalit T, Song JH, Hiramatsu K. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in 11 Asian countries: a proposal for a new nomenclature for SCC*mec* elements. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50(3):1001-1012.
- Chu FS, Thadhani K, Schantz EJ, Bergdoll MS. Purification and characterization of *staphylococcal* enterotoxin A. *Biochemistry* 1966; 5(10):3281-3289.
- Cizman M. The use and resistance to antibiotics in the community. *Int J Antimicrob Agents* 2003;21(4):297-307.
- CLSI 2011. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 21th Informational Supplement M100-S21, CLSI, Wayne, PA. 2011;3(1).

- Crago B, Ferrato C, Drews SJ, Svenson LW, Tyrrell G, Louie M. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in food samples associated with foodborne illness in Alberta, Canada from 2007 to 2010. *Food Microbiol* 2012;32(1):202-205.
- Crass BA, Bergdoll MS. Involvement of coagulase negative staphylococci in toxic shock syndrome. *J Clin Microbiol* 1986;23(1):43-45.
- Cribier B, Piemont Y, Grosshans E. Staphylococcal scalded skin syndrome in adults. A clinical review illustrated with a new case. *J Am Acad Dermatol* 1994;30(2):319-324.
- Crossley K, Landesman B, Zaske D. An outbreak of infections caused by strains of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin and aminoglycosides. II. Epidemiologic studies. *J Infect Dis* 1979;139(3):280-287.
- Couch JL, Soltis MT, Betley MJ. Cloning and nucleotide sequence of the type E staphylococcal enterotoxin gene. *J Bacteriol* 1988;170(7):2954-2960.
- Cunha MLRS. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* and Bovine Mastitis. *Int J Med Biol Frontiers* 2009;15:1031-1042.
- Cunniff P. AOAC Official methods of analysis. AOAC International, Arlington. 1995; 45-46.
- Çon AH, Gökçe R, Gürsoy O. Farklı Şekillerde Ambalajlanan Afyon Kaymaklarının Muhafaza Sürelerinin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. *Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri*, VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu. (Ed. M. Demirci), Tekirdağ. 2000;557-566.
- Dancer SJ, Noble WC. Nasal, axillary, and perineal carriage of *Staphylococcus aureus* among women: identification of strains producing epidermolytic toxin. *J Clin Pathol* 1991;44(8):681-684.
- Dantes R, Mu Y, Belflower R, Aragon D, Dumyati G, Harrison LH, Lessa FC, Lynfield R, Nadle J, Petit S, Ray SM, Schaffner W, Townes J, Fridkin S. Emerging infections program-active bacterial core surveillance MRSA surveillance investigators: National burden of invasive methicillin-resistant *S. aureus* infections, United States 2011. *JAMA Intern Med* 2013;173(21):1970-1978.
- De Boer E, Zwartkruis-Nahuis J, Wit B, Huijsdens XW, de Neeling AJ, Bosch T, van Oosterom RAA, Vila A, Heuvelink AE. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. *Int J Food Microbiol* 2009;134(1):52-56.
- De Buyser ML, Lombard B, Schulten S M, In't Veld PH, Scotter SL, Rollier P, Lahellec C. Validation of EN ISO standard methods 6888 Part 1 and Part 2: 1999—Enumeration of coagulase-positive staphylococci in foods. *Int J Food Microbiol* 2003;83(2):185-194.

- De Haas CJ, Veldkamp KE, Peschel A, Weerkamp F, Van Wamel WJ, Heezius EC, Poppelier MJ, Van Kessel KP, van Strijp JA. Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial antiinflammatory agent. *J Exp Med* 2004;199:687-695.
- Dehkordi AA, Tajbakhsh E, Tajbakhsh F, Khamesipour F, Shahraki MM, Momeni H. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* strains from Iranian raw milk and dairy products by coagulase gene polymorphisms. *Adv Stud Bio* 2015;7(4):169-177.
- Demirel NN, Karapınar M. İzmir ilinde satılan bazı peynirlerde *S. aureus* enterotoksinlerinin ELISA yöntemi ile belirlenmesi. *Gıda* 2004;31(1):37-41.
- den Heijer CDJ, van Bijnen EME, Paget WJ, Pringle M, Goossens, H, Bruggeman CA, Schellevis FG, Stobberingh EE, Team AS. Prevalence and resistance of commensal *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *S. aureus*, in nine European countries: a cross-sectional study. *Lancet Infect Dis* 2013;13(5):409-415.
- Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, Beach M. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: Frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe and the Western Pacific Region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program 1997-1999. *Clin Infect Dis* 2001;32:114-132.
- Di Giannatale E, Prencipe V, Tonelli A, Margfoglio C, Migliorati G. Characterisation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food for human consumption. *Vet Ital* 2011;47(2):165-173.
- Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13(1):16-34.
- Dyke KGH, Gregory PD. Resist to beta-lactam antibiotics: resistance mediated by beta-lactamases, In K. B. Crossley and G. L. Archer (ed.), *The staphylococci in human disease*. Churchill Livingstone, Inc., New York, N.Y. 1997;136-157.
- EFSA 2010. The European Food Safety Authority; The European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA J* 2012;10(3):2597.
- EFSA 2011. The European Food Safety Authority; The European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. *EFSA J* 2013;11(4):3129.
- EFSA 2012. The European Food Safety Authority; The European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. *EFSA J* 2014;3547.

- EFSA 2012a. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3991.pdf>, 2017.
- EFSA 2013. The European Food Safety Authority; The European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. EFSA J 2015;13(1):3991.
- EFSA 2014. The European Food Safety Authority; The European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. EFSA J 2015;13(2):4329.
- EFSA 2015. European Food Safety Authority. 2015 Strong - evidence outbreaks in Reporting Countries <https://dwh.efsa.europa.eu/bi/asp/Main.aspx?rwtrep=603>, 2017.
- Eisler P. Dangerous MRSA bacteria expand into communities. USA Today 2013. <https://www.usatoday.com/story/news/nation/2013/12/16/mrsa-infection-community-schools-victims-doctors/3991833/>, 2017.
- Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Proc Natl Acad Sci 2002;99(11):7687-7692.
- Ergün Y, Aslantaş Ö, Cantekin Z, Doğruer G. Hatay ilindeki aile tipi süt sığırcılığı işletmelerinde subklinik mastitislerin epidemiyolojisi. Vet Bilim Derg 2004;20:25-28.
- Eriksen NH, Espersen F, Rosdahl VT, Jensen K. Evaluation of methods for the detection of nasal carriage of *S. aureus*. APMIS 1994 ;102(6):407-412.
- Ertaş N, Gönülalan Z, Yıldırım Y, Kum E. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in sheep cheese and dairy desserts by multiplex PCR technique. Int J Food Microbiol 2010; 142(1):74-77.
- Ertaş N, Gönülalan Z. Kayseri İlinde Satılan Çiğ Sütlerde *Staphylococcus aureus* ve Enterotoksinlerinin Varlığı Üzerine Araştırmalar. FÜ Sağ Bil Vet Derg 2010;24(1):11-15.
- Erol İ. Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi. Ankara, Pozitif Matbaacılık. 2007.
- Ersoy T, Fırat M, Kuzucu Ç, Bayındır Y, Karaaslan Ş, Bilişik G, But AD. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanesinde hastane infeksiyonları. İnönü Üniv Tıp Fak Derg 2003;10(3)133-137.

- Eşel D, Doğanay M, Alp E, Sümerkan B. Prospective evaluation of blood cultures in a Turkish university hospital; epidemiology, microbiology and patient outcome Clin Microbiol Infect 2003;9(10):1038-1044.
- EUCAST 2014. Reference broth microdilution MICs from EUCAST Development Laboratory. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Network_labs/EDL/MICs_from_EUCAST_Development_Laboratory.pdf, 2017.
- 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(4):311-316.
- Evrensel SS, Temelli S, Anar Ş. Mandıra düzeyindeki işletmelerde beyaz peynir üretiminde kritik kontrol noktalarının belirlenmesi. Türk J Vet Anim Sci 2003;27:29-35.
- Fagundes H, Barchesi L, Filho AN, Ferreira LM, Oliveira CAF. Occurrence of *Staphylococcus aureus* in raw milk produced in dairy farms in São Paulo state, Brazil. Braz J Mikrobiol 2010;(41):376-380.
- Faller A, Schleifer KH. Modified oxidase and benzidine test for separation of staphylococci and micrococci. J Clin Microbiol 1981;13(6):1031-1035.
- FAO 2014. Faostat. Food And Agriculture Organization of The United Nations <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>, 2017.
- FDA 2011. U.S. Food and Drug Administration. Questions&Answers: Raw Milk. <http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/BuyStoreServeSafeFood/ucm122062.htm>, 2017.
- Fedio WM, Wendakoon CN, Zapata R, Carrillo C, Browning P. Comparison of petrifilm staph express count system with the bacteriological analytical manual direct-plating method for enumeration of *Staphylococcus aureus* in artificially contaminated hard cheese. J AOAC Int 2008;91(5):1138-1141.
- 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 Microb 2011;77(20):7151-7157.
- Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Staphylococcus, Micrococcus* and Similar Organisms: Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 12th Ed. USA: Mosby. 2007; 254-263.
- Foster TJ, Höök M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol 1998;6(12):484-488.
- Foster TJ. Immune evasion by staphylococci. Nat Rev Microbiol 2005;3(12):948-958.

- Fox A, Pichon B, Wilkinson H, Doumith M, Hill RL, McLauchlin J, Kearns AM. Detection and molecular characterisation of livestock-associated MRSA in raw meat on retail sale in North West England. *Lett Appl Microbiol* 2017;64(3):239-245.
- Fueyo JM, Mendoza MC, Martin MC. Enterotoxins and toxic shock syndrome toxin *Staphylococcus aureus* recovered from human nasal carriers and manually handled foods: epidemiological and genetic findings. *Microbes Infect* 2005;7(2):187-194.
- Gally D Archibald AR. Cell wall assembly in *Staphylococcus aureus*: proposed absence of secondary crosslinking reactions. *J Gen Microbiol* 1993;139(8):1907-1913.
- García-Álvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD, Walpole E, Brooks K, Pickard DJ, Teale C, Parkhill J, Bentley SD, Edwards GF, Girvan EK, Kearns AM, Pichon B, Hill RL, Larsen AR, Skov RL, Peacock SJ, Maskell DJ, Holmes MA. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis* 2011;11(8):595-603.
- Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG. Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition, Springer, Inc. 223 Spring Street, New York, USA. 2004.
- Geha DJ, Uhl JR, Gustaferra CA, Persing DH. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 1994;32(7):1768-1772.
- Gencay YE, Ayaz ND, Doğru AK. Enterotoxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* and other staphylococcal isolates from various foods and food ingredients. *J Fac Vet Med Univ Erciyes* 2010;7(2):75-80.
- Gerberding JL, Miick C, Liu HH, Chambers HF. Comparison of conventional susceptibility tests with direct detection of penicillin-binding protein 2a in borderline oxacillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35(12):2574-2579.
- Greenfield RA, Brown BR, Hutchins JB, Iandolo JJ, Jackson R, Slater LN, Bronze MS. Microbiological, biological, and chemical weapons of warfare and terrorism. *Am J Med Sci* 2002; 323(6):326-340.
- Grisold AJ, Leitner E, Mühlbauer G, Marth E, Kessler HH. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous confirmation by automated nucleic acid extraction and real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2002;40(7):2392-2397.
- Grüneberg RN. Anti-Gram positive agents: What we have and what we would like. *Drugs* 1997;54(6):29-38.

- Gücükoğlu A, Kevenk TO, Uyanık T, Çadırcı O, Terzi G, Alişarlı M. Detection of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in Raw Milk and Dairy Products by Multiplex PCR. J Food Sci 2012;77:620-623.
- Gülmez M, Güven A, Çetinkaya A. Kars'ta tüketime sunulan taze ve salamura beyaz peynirlerin bazı mikrobiyolojik ve kimyasal özellikleri. Kafkas Üni Vet Fak Derg 2001;7(1):55-62.
- Gündoğan N, Ataol Ö. Et örneklerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* ve koagulaz negatif stafilokokların biyofilm üretimi ve DNaze aktivitelerinin belirlenmesi. Turk Hij Den Biyol Derg 2012;69(3):135-142.
- Güven K, Mutlu MB, Gülbandılar A, Çakır P. Occurrence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products consumed in Turkey. J Food Safety 2010;30(1):196-212.
- Hait J, Tallent S, Melka D, Keys C, Bennett R. Prevalence of enterotoxins and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from a bakery involved in a second staphylococcal food poisoning occurrence. J Appl Microbiol 2014;117(3):866-875.
- 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.
- Hanson BM, Dressler AE, Harper AL, Scheibel RP, Wardyn SE, Roberts LK, Kroeger JS and Smith TC. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on retail meat in Iowa. J Infect Public Health 2011;4(4):169-174.
- 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.
- Harrigan WF. Laboratory Methods in Food Microbiology. 3rd ed. Gulf Professional Publishing. San Diego.1998.
- Hartman BJ, Tomasz A. Expression of methicillin resistance in heterogeneous strains of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1986;29(1):85-92.
- Hartstein AI, Sebastian TJ, Strausbaugh LJ. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, "Mayhall CG (ed): Hospital Epidemiology and Infection Control 3rd ed" Lippincott Williams and Wilkins, New York. 2004;471-94.

- Hennekinne JA, De Buyser ML, Dragacci S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol Rev* 2012; 36(4):815-36.
- Hiramatsu K, Asada K, Suzuki E, Okonogi K, Yokota T. Molecular cloning and nucleotide sequence determination of the regulator region of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *FEBS Lett* 1992;298(2-3):133-136.
- 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 Protect* 2012;75(10):1774-1782.
- Hososaka Y, Hanaki H, Endo H, Suzuki Y, Nagasawa Z, Otsuka Y, Nakae T, Sunakawa K. Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA. *J Infect Chemother* 2007;13(2):79-86.
- Hovde CJ, Hackett SP, Bohach GA. Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C3 gene: sequence comparison of all three type C staphylococcal enterotoxins. *Mol Gen Genet* 1990;220(2):329-333.
- Huang IY, Bergdoll MS. The primary structure of staphylococcal enterotoxin B. 3. The cyanogen bromide peptides of reduced and aminoethylated enterotoxin B, and the complete amino acid sequence. *J Biol Chem* 1970;245(14):3518-3525.
- Igbinosa EO, Beshiru A, Akporehe LU, Oviasogie FE, Igbinosa OO. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other *staphylococcus* species in raw meat samples intended for human consumption in Benin City, Nigeria: Implications for public health. *Int J Environ Res Public Health* 2016;13(10):949.
- Ingham SC, Schoeller NP. Comparison of the Baird-Parker agar and 3M™ Petrifilm™ rapid *S.aureus* count plate methods for detection and enumeration of *Staphylococcus aureus*. *Food Microbiol* 2001;18:581-587.
- ISO 1999. ISO-International Organisation of Standardisation ISO 6888-1. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs-Horizontal Method for the Enumeration of Coagulase Positive Staphylococci (*Staphylococcus aureus* and Other Species): Part 1. Technique Using Baird-Parker Agar Medium International Organisation of Standardisation, Geneva. 1999.
- ISO 1999a. 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 1. Technique using Rabbit Plasma Fibrinogen agar medium International Organisation of Standardisation, Geneva. 1999.

- ISO 2003. ISO-International Organisation of Standardisation. ISO 6888-3. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species)-Part 3: Detection and MPN technique for low numbers. 2003.
- İnal T. Süt ve Süt Ürünleri Hijyen ve Teknolojileri, İstanbul.1990.
- Jacoby GA, Archer GL. New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. N Eng J Med 1991;324(9):601-612.
- Jarraud S, Peyrat MA, Lim A, Tristan A, Bes M, Mougel C, Etienne J, Vandenesch F, Bonneville M, Lina G. *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. J Immunol 2001;166(1):669-677.
- Jay JM. Staphylococcal gastroenteritis. 5th ed. New York. In: Mod Food Microbiol 1996;429-450.
- Jay JM, Loessner MJ, Golde DA. *Staphylococcal* Gastroenteritis. In: Mod. Food Microbiol 7th Ed. USA. 2005.
- Jevons MP. Celbenin-resistant staphylococci. Br Med J 1961; 1(5219): 124–125.
- Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. Physiol Rev 2011;91(1):221-264.
- Joklik WK, Willet HP, Amos DB, Wilflet C. Zinsser Microbiology. 20th Ed, Appleton and Lange, USA. 1992; 401-416.
- Jorgensen JH, Mork T, Hogasen HR, Rorvik LM. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk Norway. J Appl Microbiol 2005; 99(1):158-166.
- Kadlec K, Ehricht R, Monecke S, Steinacker U, Kaspar H, Mankertz J, Schwarz S. Diversity of antimicrobial resistance pheno- and genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from diseased swine. J Antimicrob Chemother 2009;64(6):1156-1164.
- Kadlec K, Wendlandt S, Feßler AT, Schwarz S. Methods for the Detection of Antimicrobial Resistance and the Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates from Food-Producing Animals and Food of Animal Origin. Institute of Farm Animal Genetics, Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Neustadt-Mariensee, Germany. 2015.
- Kamal RM, Bayoumi MA, El Aal SFA. MRSA detection in raw milk, some dairy products and hands of dairy workers in Egypt, a mini-survey. Food Control 2013;33(1):49-53.

- Kanafani H, Martin SE. Catalase and superoxide dismutase activities in virulent and nonvirulent *Staphylococcus aureus* isolates. J Clin Microbiol 1985;21(4):607-610.
- Karakuş M. Gıdalarda Mikrobiyel Gelişmeyi Etkileyen Faktörler, Gıda Sanayinde Mikrobiyoloji ve Uygulamaları. Mam Yayınları, Gebze. 1995;2:133-147.
- Kav K, Col R, Ardic, M. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from white-brined Urfa cheese. J Food Prot 2011;74(11):1788-1796.
- Kelman A, Soong YA, Dupuy N, Shafer D, Richbourg W, Johnson K, Brown T, Kestler E, Li Y, Zheng J. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* from retail ground meats. J Food Prot 2011;74(10):1625-1629.
- Keskin Y, Özyaral O, Başkaya R, Susur MA. Semt pazarlarında satılan beyaz peynirlerin mikrobiyolojik kalitesinin araştırılması. Türk Mikrobiyol Cemiy Derg 2006;36(1):9-19.
- Keyvan E. Sığır Karkaslarında *Staphylococcus aureus*'un Varlığı, Karakterizasyonu ve Antimikrobiyal Dirençliliğin Belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Doktora Tezi, 2014;63-64.
- Khan SA, Nawaz MS, Khan AA, Cerniglia CE. Transfer of erythromycin resistance from poultry to human clinical strains of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2000;38(5):1832-1838.
- Kitai S, Shimizu A, Kawano J, Sato E, Nakano C, Kıttagawa H, Fujio K, Matsumura K, Yasuda R, Inamoto T. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* and enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in retail raw chicken meat throughout Japan. J Vet Med Sci 2005;67(3):269-274.
- Klevens RM, Edwards JR, Tenover FC, McDonald LC, Horan T, Gaynes R. Changes in the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units in US hospitals, 1992-2003. Clin Infect Dis 2006;42(3):389-391.
- Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, Harrison LH, Lynfield R, Dumyati G, Townes JM, Craig AS, Zell ER, Fosheim GH, McDougal LK, Carey RB, Fridkin SC. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. Jama 2007;298(15):1763-1771.
- Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin Microbiol Rev 1997;10(3):505-520.
- Kluytmans J, Wertheim HFL. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and prevention of nosocomial infections. Infection 2005;33(1):3-8.

- Koneman EW, Allen SD, Janda WM. Medical Bacteriology: Taxonomy, Morphology, Physiology, and Virulence. Colar Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology 6th ed. Philadelphia, Lippincott. 2006;167-210.
- Kubica M, Guzik K, Koziel J, Zarebski M, Richter W, Gajkowska B, Golda A, Maciag-Gudowska A, Brix K, Shaw L, Foster T, Potempa J. A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. PLoS One 2008;3:e1409.
- Kurt A, Özdemir S. Erzurum'da yapıлып satılan kaymakların bileşimi ve mikrobiyolojik kalitesi. Gıda 1988;13:205-8.
- Küplülü Ö, Sarımehmetoğlu B, Kaymaz Ş. Pastörize sütlerde Elisa tekniği ile Stafilokokal Enterotoksin varlığının belirlenmesi. Türk J Vet Anim Sci 2002;26:631-637.
- Küplülü Ö, Sarımehmetoğlu B, Çelik TH. Determination of the enterotoxigenicity of coagulase positive staphylococci isolated from cheese by ELISA. Milchwissenschaft 2004;59(1-2):17-19.
- Ladhani S, Joannou CL, Lochrie DP, Evans RW, Poston SM. Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. Clin Microbiol Rev 1999;12(2):224-242.
- Lancette GA, Tatini SR. *Staphylococcus aureus*. In: Compendium of the methods for the microbiological examination of foods. 3rd ed. Vanderzant, C., Splittstoesser, D.F. (ed)., American Public Health Assoc. 1992;371-404.
- Lancette GA, Bennett RW, Downes FC, Ito K. (Eds.), Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (fourth ed.), American Public Health Press. 2001;387-403.
- Larsen HD, Sloth KH, Elsberg C, Enevoldsen C, Pedersen LH, Eriksen NHR, Aarestrup FM, Jensen NE. The dynamics of *Staphylococcus aureus* intramammary infection in nine Danish dairy herds. Vet Microbiol 2000;71(1):89-101.
- Lee ACM, Robbins RN, Bergdoll MS. Isolation of specific and common antibodies to staphylococcal enterotoxin A and E by affinity chromatography. Infect Immun 1978;21(2):387-391.
- 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.
- Lee JH. Occurrence of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* strains from cattle and chicken, and analysis of their *mecA*, *mecR1*, and *mecI* genes. Vet Microbiol 2006;114(1):155-159.

- Le Loir Y, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genet Mol Res 2003;2(1):63-76.
- Levinson W, Jawetz E. Medical Microbiology and Immunology, 6th. Ed., Singapore: Lange Medical Books/McGraw-Hill. 2000; 85-95.
- Lina G, Bohach GA, Nair SP, Hiramatsu K, Jouvin-Marche E, Mariuzza R. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. J Infect Dis 2004;189:2334-2336.
- Lodise TP, McKinnon PS. Clinical and economic impact of meticillin resistance in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. Diagn Microbiol Infect Dis 2005; 52(2):113-22.
- Lozano C, López M, Gómez-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(6):1325-1326.
- Lowy FD. Medical progress: *Staphylococcus aureus* infections, N Engl J Med 1998; 339(8):520-532.
- Maes N, Magdalena J, Rottiers S, Gheldre Y, Struelens MJ. Evaluation of a triplex PCR assay to discriminate *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci and determine methicillin resistance from blood cultures. J Clin Microbiol 2002;4(40):1514-1517.
- Manfreda G, Mioni R, De Cesare A. Surveillance and characterization of enterotoxigenic staphylococci in foods animal origin collected in the Veneto region. Vet Res Commun 2005;29(2):331-333.
- Maniatis TE, Fritsch F, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory NY, Cold Spring Harbor.1982.
- Mashouf RY, Hosseini SM, Mousavi SM, Arabestani MR. Prevalence of enterotoxin genes and antibacterial susceptibility pattern of *Staphylococcus aureus* strains isolated from animal originated foods in West of Iran. Oman Med J 2015;30(4): 283-290.
- Matthews PR, Stewart PR. Resistance heterogeneity in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett 1984;22(3):161-166.
- 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.
- Melish ME, Glasgow LA. The staphylococcal scalded-skin syndrome: development of an experimental model. N Engl J Med 1970;282(20):1114-1119.

- Merz A, Stephan R, Johler S. *Staphylococcus aureus* isolates from goat and sheep milk seem to be closely related and differ from isolates detected from bovine milk. *Front Microbiol* 2016;7:319.
- Metin M. Süt Teknolojisi, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları no: 33. Bornova, İzmir. 1996.
- McDougal LK, Thornsberry C. The role of beta-lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase resistant penicillins and cephalosporins. *J Clin Microbiol* 1986;23(5):832-839.
- Miller GD, Jarvis KJ, McBean LD. Handbook of Dairy Foods and Nutrition. In: Jensen RG, Kroger M, editors. The Importance of Milk and Milk Products in the Diet. CRC Press, New York. 2000;4-24.
- Moioli B, Borghese A. Buffalo breeds and management systems. In *Buffalo Production and Research*, Ed. Antonio Borghese, FAO Reu Technical Series 2005;67:51-76.
- Monecke S, Coombs G, Shore AC, Coleman DC, Akpaka P, Borg M, Chow H, Ip M, Jatzwauk L, Jonas D, Kadlec K, Kearns A, Laurent F, O'Brien FG, Pearson J, Ruppelt A, Schwarz S, Scicluna E, Slickers P, Tan HL, Weber S, Ehricht R. A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* 2011;6(4):e17936.
- Monno R, De Vito D, Ceci G, Costi A, Coscia F, de Nicolo T, Rizzo G. Comparative evaluation of test assays for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2003;9(6):574-575.
- Morandi S, Brasca M, Lodi R, Cremonesi P, Castiglioni B. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. *Vet Microbiol* 2007;124(1):66-72.
- Moreillon P, Entenza JM, Francioli P, McDevitt D, Foster TJ, Francois P, Vaudaux P. Role of *Staphylococcus aureus* coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis. *Infect Immun* 1995;63(12):4738-4743.
- Moreillon P, Que Y, Glauser MP. *Staphylococcus aureus* (Including *Staphylococcal Toxic Shock*). Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th Ed. Volume 2, Elsevier Inc. 2005; 2321-2352.
- Muratoğlu K. Gıdalardan İzole Edilen *Staphylococcus Aureus* Suşlarının Toksikjenik Özellikleri Ve Antibiyotiklere Duyarlılıkları Üzerine Bir Araştırma. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Doktora Tezi, 2010; 65-66.
- Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Staphylococcus* and related Organisms. In: *Medical Microbiology*. 3rd ed. Mosby, Missouri, USA. 1998;175-188.

- Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Staphylococcus* and related organisms. Mosby Inc St Louis 2002; 202-216.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller PA. Medical Microbiology; 4th ed. Philadelphia, Pa.:Elsevier Mosby, USA. 2005.
- Murray RJ. Recognition and management of *Staphylococcus aureus* toxin-mediated disease. Intern Med J 2005;106-119.
- Mutluer B, Erol İ, Kaymaz Ş, Akgün S. Enterotoksijenik *Staphylococcus aureus* suşlarının beyaz peynirde üretim ve olgunlaşma sırasındaki üreme ve enterotoksin oluşturma yetenekleri. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1993;40(3):413-426.
- Nam HM, Lee AL, Jung SC, Kim MN, Jang GC, Wee SH, Lim SK. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Korea. Foodborne Pathog Dis 2011;8(2):231-238.
- 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.
- Nazari R, Godarzi H, Baghi FR, Moeinrad M. Enterotoxin gene profiles among *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk. Iran J Vet Res 2014;15(4):409-412.
- Neder VE, Canavesio VR, Calvino LF. Presence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk tank milk from Argentine dairy farms. Rev Argent Microbiol 2011;43:104-106.
- Normanno G, Firinu A, Virgilio S, Mula G, Dambrosio A, Poggiu A, Decastelli L, Mioni R, Scuota S, Bolzoni G, Di Giannatale E, Salinetti AP, La Salandra G, Bartoli M, Zuccon F, Pirino T, Sias S, Parisi A, Quaglia NC, Celano GV. Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. Int J Food Microbiol 2005; 98(1):73-79.
- Normanno G, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, Corrente M, Parisi A, Santagada G, Firinu A, Crisetti E, Celano GV. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. Int J Food Microbiol 2007;115(3):290-296.
- Normanno G, Corrente M, La salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, Parisi A, Greco, G, Bellacicco AL, Virgilio, S, Celano GV. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product Italy. Int J Food Microbiol 2007a;117(2):219-222.
- Novick RP. Auto induction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. Mol Microbiol 2003;48(6):1429-1449.

- O'Brien AM, Hanson BM, Farina SA, Wu JY, Simmering JE, Wardyn SE, Forshey BM, Kulick ME, Wallinga DB, Smith TC. MRSA in conventional and alternative retail pork products. PLoS ONE 2012;7(1):e30092.
- Ogston A. Micrococcus poisoning. J Anat Physiol 1882;17:24-58.
- Okuma K, Iwakawa K, Turnidge JD, Grubb WB, Bell JM, O'Brien FG, Coombs GW, Pearman JW, Tenover FC, Kapi M, Tiensasitorn C, Ito T, Hiramatsu K. Dissemination of new methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. J Clin Microbiol 2002;40(11):4289-94.
- 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(7):2155-2161.
- Oliveira AAF, Pinheiro JW, Mota RA, Cunha ML, Lopes CA, Rocha NS. Phenotype characterization of *Staphylococcus* species strains isolated from buffalo milk. J Vet Diagn Invest 2011;23(6):1208-1211.
- Omoe K, Hu DL, Takahashi-Omoe H, Nakane A, Shinagawa K. Identification and characterization of a new *staphylococcal* enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. Infect Immun 2003;71(10):6088-6094.
- O'Riordan K, Lee JC. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. Clin Microbiol Rev 2004;17(1):218-234.
- Oysun G. Süt Kimyası ve Biyokimyası. O.M.Ü. Yayınları. Yayın no: 18, Samsun. 1987.
- Pajić M, Boboš S, Velebit B, Rašić Z, Katić, Radinović M, Nikolić A Simonović D, Babić M. Prevalence and molecular characterization of enterotoxin-producing strains of *Staphylococcus aureus* isolated from Serbian dairy cows. Acta Vet Beograd 2016; 66(4):466-477.
- Pala K, Özakin C, Akiş N, Sinirtaş M, Gedikoğlu S, Aytekin H. Asymptomatic carriage of bacteria in food workers in Nilüfer district, Bursa, Turkey. Turk J Med Sci 2010;40(1):133-139.
- Pamuk Ş, Gürler Z. Afyonkarahisar'da tüketilen kaymaklı lokumların mikrobiyolojik kalitesinin araştırılması. Kocatepe Vet J 2009;2(2):33-38.
- Pamuk S, Yıldırım Y, Şeker E, Gürler 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 Technol 2012;65(3):416-422.
- Papageorgiou A, Acharya K. Microbial superantigens: from structure to function. Trends Microbiol 2000; 8(8):369-375.

- Parry MA, Fernandez-Catalan C, Bergner A, Huber R, Hopfner KP, Schlott B, Gührs KH, Bode W. The ternary microplasmin–staphylokinase–microplasmin complex is a proteinase–cofactor–substrate complex in action. *Nat Struct Biol* 1998; 5(10):917-923.
- Patrick CC. Coagulase negative staphylococci: pathogens with increasing clinical significance. *J Pediatr* 1990;116(4):497-507.
- Peacock SJ. *Staphylococcus*. In Borriello SP, Murray PR, Funke G. (Ed). *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 10th Ed. Hodder Arnold, London, United Kingdom. 2005; 771-832.
- Pereira V, Lopes C, Castro A, Silva J, Gibbs P, Texeira P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. *Food Microbiol* 2009;26(3):278-282.
- Perreten V, Schwarz F, Cresta L, Boeglin M, Dasen G, Teuber M. Antibiotic resistance spread in food. *Nature* 1997;389(6653):801-802.
- Petersen A, Stegger M, Heltberg O, Christensen J, Zeuthen A, Knudsen LK, Urth T, Sorum M, Schouls L, Larsen J, Skov R, Larsen AR. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the novel *mecC* gene in Denmark corroborates a zoonotic reservoir with transmission to humans. *Clin Microbiol Infect* 2013;19(1):16-22.
- Pichon B, Hill R, Laurent F, Larsen AR, Skov RL, Holmes M, Edwards GF, Teale C, Kearns AM. Development of a real-time quadruplex PCR assay for simultaneous detection of *nuc*, Panton–Valentine leucocidin (PVL), *mecA* and homologue *mecALGA251*. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67(10):2338-2341.
- Prévot AR. *Manuel de Classification et de Détermination des Bactéries Anaérobies*, 1st ed., Masson, Paris. 1940.
- Pu W, Su Y, Li J, Li C, Yang Z, Deng H, Ni C. High incidence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with bovine mastitis in China. *PLoS ONE* 2014; 9(2):e88134.
- Qi Y, Miller KJ. Effect of low water activity on staphylococcal enterotoxin A and B biosynthesis. *J Food Prot* 2000; 63(4):473–478.
- Rahimi E, Alian F. Presence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in cow, camel, sheep, goat, and buffalo bulk tank milk. *Vet Arhiv* 2013;83(1):23-30.
- Rall VLM, Vieira FP, Rall R, Vieitis RL, Fernandes A, Candeias JMG, Cardoso KFG, Araujo JP. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. *Vet Microbiol* 2008;132(3):408-413.

- Rao S. Coagulase test. <http://www.microrao.com/micronotes/coagulase.pdf>, 2006, 2017.
- Rhee CH, Woo GJ. Emergence and characterization of foodborne methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Korea. *J Food Prot* 2010;73(12):2285-2290.
- Riva A, Borghi E, Cirasola D, Colmegna S, Borgo F, Amato E, Pontello MM, Morace G. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in raw milk: prevalence, *SCCmec* typing, enterotoxin characterization, and antimicrobial resistance patterns. *J Food Prot* 2015;78(6):1142-1146.
- Rizek CF, Matté MH, Dropa M, Mamizuka LM, de Almeida LM, Lincopan N, Matté GR, Germano PML. Identification of *Staphylococcus aureus* carrying the *mecA* gene in ready-to-eat food products sold in Brazil. *Foodborne Pathog Dis* 2011;(8)4:561-563.
- Rola JG, Czubkowska A, Korpysa-Dzirba W, Osek J. Occurrence of *Staphylococcus aureus* on farms with small scale production of raw milk cheeses in Poland. *Toxins* 2016; 8(3):62.
- Rosato AE, Kreiswirth BN, Craig WA, Eisner W, Climo MW, Archer GL. *mecA*-*blaZ* corepressors in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(4):1460-1463.
- Rosenbach AJF. Mikro-Organismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen. Wiesbaden, JF Bergmann. 1884.
- Ruben FL, Norden CW, "Staphylococcal Infections", (in) *Bacterial Infections of Humans*, 2nd edition, Evans, A. S., Brachman, P. S., (ed), Plenum Medical Book Company, New York and London. 1991; 621-637.
- Sağun E, Sancak H, Durmaz H.. Van'da kahvaltı salonlarında tüketime sunulan süt ürünlerinin mikrobiyolojik ve kimyasal kaliteleri üzerine bir araştırma. *YYÜ Vet Fak Derg* 2001;12(1-2):108-112.
- Salgado CD, Farr BM, Calfee DP. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk factors. *Clin Infect Dis* 2003;36(2):131-139.
- Salmenlinna S. Molekular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Finland. Academic dissertation. Faculty of Medicine, University of Helsinki, Haartman Institute. Helsinki. 2002.
- Salmenlinna S, Lyytikäinen O, Kotilainen P, Scotford R, Siren E, Vuopio-Varkila J. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Finland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19(2):101-107.

- Sangeetha N, Thenmozhi S, Vijayalakshmi P. Assessment Of Virulence And Antimicrobial Susceptibility Of *Staphylococcus Aureus* From Different Milk Samples. *Int J Cur Res* 2014;(6):6097-6104.
- Sato H, Matsumori Y, Tanabe T, Saito H, Shimizu A, Kawano J. A new type of staphylococcal exfoliative toxin from a *Staphylococcus aureus* strain isolated from a horse with phlegmon. *Infect Immun* 1994;62(9):3780-3785.
- Sawhney D. The toxicity of potassium tellurite to *Staphylococcus aureus* in rabbit plasma fibrinogen agar. *J Appl Bacteriol* 1986;61(2):149-155.
- Sentandreu MA, Coulis G, Ouali A. Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends Food Sci Tech* 2002;13(12):400-421.
- Seo KS, Bohach GA. Foodborne Pathogenic Bacteria. *Staphylococcus aureus*. In: *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 3rd Ed, Edited by M.P. Doyle and L.R. Beuchat. ASM Press, Washington. 2007; 493-518.
- Schelin J, Wallin-Carlquist N, Cohn MT, Lindqvist R, Barker GC, Radstrom P. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence* 2011;2(6):580-592.
- Scherrer D, Corti S, Muehlherr JE, Zweifel C, Stephan R. Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. *Vet Microbiol* 2004;101(2):101-107.
- Schleifer KH, Bell JA. *Staphylococcus*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. pp.1–43. Published by John Wiley & Sons, Inc. 2015.
- Schlievert PM, Bohach GA, Ohlendorf DH, Stauffacher CV, Leung DY, Murray DL, Prasad GS, Earhart CA, Jablonski LM, Hoffmann ML, Chi YI. Molecular Structure of *Staphylococcus* and *Streptococcus* Superantigens. *J Clin Immunol* 1995;15:4-10.
- Schlievert PM, Case LC. Molecular analysis of Staphylococcal superantigens. In *Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) Protocols* 2007;391:113-126.
- Schneewind O, Missiakas D. *Staphylococcus aureus* and related *Staphylococci*. In: *Practical Handbook of Microbiology*. Ed.: Goldman E, Green LH. USA: Crc press. 2009; 275-294.
- 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.

- Shalita Z, Hertman I, Sarid S. Isolation and characterization of a plasmid involved with enterotoxin B production in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 1977;129(1):317-325.
- Sharma D, Sharma PK, Malik A. Prevalence and antimicrobial susceptibility of drug resistant *Staphylococcus aureus* in raw milk of dairy cattle. Int Res J Microbiol 2011;2(11):466-470.
- Sherertz RJ, Marosok RD, Streed SA. Infection control aspects of hospital employee health. In: Wenzel RP (ed). Prevention and control of nosocomial infections. Second edition, Maryland: Williams & Wilkins, 1993:295-332.
- Shimamura H, Gouda H, Nagai K, Hirose T, Ichioka M, Furuya Y, Ōmura S. Structure determination and total synthesis of bottromycin A2: A potent antibiotic against MRSA and VRE. Angew Chemi Int Edit 2009;48(5):914-917.
- Shopsin B, Kreiswirth BN. Molecular epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Emerg Infect Dis 2001;7(2):323-326.
- Singh P, Prakash A. Prevalence of coagulase positive pathogenic *Staphylococcus aureus* in milk and milk products collected from unorganized sector of Agra. Acta Agr Slovenica 2010;96(1):37-41.
- Sindhu JS, Arora S. Buffalo milk. Encyclopedia of Dairy Sciences. 2nd ed. Academic Press. 2011;503-511.
- Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG. Bergey's manual of systematic bacteriology, Williams&Wilkins, Baltimore, A.B.D. 1986.
- Sompolinsky D, Samra Z, Karakawa WW, Vann WF, Schneerson R, Malik Z. Encapsulation and capsular types in isolates of *Staphylococcus aureus* from different sources and relationship to phage types. J Clin Microbiol 1985;22(5):828-834.
- Song JW, Yang SJ, Shin S, Seo KS, Park YH, Park KT. Genotypic and phenotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk in Korea. J Food Prot 2016;79(10):1725-1732.
- Soysal Mİ. Manda ve Ürünleri Üretimi. Tekirdağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü, Ders Notları. Tekirdağ, 2006.
- Soysal Mİ. Manda ve ürünleri Üretimi, Yayın no: 978-9944-5405-3-7, 2009;161-171, Tekirdağ.
- Spaan AN, Henry T, van Rooijen WJM, Perret M, Badiou C, Aerts PC, Kemmink J, de Haas CJ, van Kessel KP, Vandenesch F, Lina G, van Strijp JAG. The staphylococcal toxin panton-valentine leukocidin targets human c5a receptors. Cell Host Microbe 2013;13(5):584-594.

- Spaan AN, Vrieling M, Wallet P, Badiou C, Reyes-Robles T, Ohneck EA, Lina G, van Kessel KP, Torres VJ, van Strijp JA, Henry T. The Staphylococcal Toxins γ -Hemolysin AB and CB Differentially Target Phagocytes by Employing Specific Chemokine Receptors. *Nat Commun* 2014;11(5):5438.
- Stapleton PD, Taylor PW. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. *Sci Prog* 2002;85(1):57-72.
- Stastkova Z, Karpiskova S, Karpiskova R. Occurrence of methicillin resistant strains of *Staphylococcus aureus* at a goat breeding farm. *Vet Med-Czech* 2009;54(9): 419-426.
- Strominger JL, Ghuysen JM. Mechanisms of enzymatic bacteriolysis. Cell walls of bacteria are solubilized by action of either specific carbohydrases or specific peptidases. *Science* 1967;156(3772):213-221.
- Sutherland J, Varnam A. Enterotoxin-producing *Staphylococcus*, *Shigella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In: CW Blackburn, PJ McClure (Eds), *Foodborne Pathogens*. CRC Press, Washington, DC. 2002;384-415.
- Sundström M, Abrahmsen L, Antonsson P, Mehindate K, Mourad W, Dohlsten M. The crystal structure of staphylococcal enterotoxin type D reveals Zn²⁺-mediated homodimerization. *EMBO J* 1996;15(24):6832-6840.
- Swaminathan S, Furey W, Pletcher J, Sax M. Crystal structure of staphylococcal enterotoxin B, a superantigen. *Nature* 1992;359(6398):801-806.
- Swenson JM, Lonsway D, McAllister S, Thompson A, Jevitt L, Zhu W, Patel JB. Detection of *mecA*-mediated resistance using reference and commercial testing methods in a collection of *Staphylococcus aureus* expressing borderline oxacillin MICs. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;58(1):33-39.
- Şahin A, Yıldırım A, Ulutaş Z. Tokat ili halk elinde yetiştirilen mandaların çiğ süt kompozisyonu ve somatik hücre sayısı. Gaziosmanpaşa Üniv. Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Sonuç Raporu, Proje No: 2011/13. 2012.
- Şekerden Ö. Büyükbaş Hayvan Yetiştirme (Manda Yetiştiriciliği), Temizyürek Ofset Matbaacılık Antakya, Hatay. 2001.
- Şengül M. Microbiological characterization of Civil cheese, a traditional Turkish cheese: microbiological quality, isolation and identification of its indigenous Lactobacilli. *World J Microbiol Biotechnol* 2006;22(6):613-618.
- Tamarapu S, McKillip JL, Drake M. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. *J Food Prot* 2001;64(5):664-668.

- Tatini SR. Influence of food environments on growth of *Staphylococcus aureus* and production of various enterotoxins. J Milk Food Technol 1973;36(11):559-563.
- Tekinşen OC, Çelik C. Şavak peynirlerinde 'staphylococcus'lar ve micrococcus'lar. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1979;3-4:47-63.
- Tekinşen OC. Süt ürünleri teknolojisi. 3. Baskı, Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya. 2000; 1-2.
- Tenhagen BA, Vossenkuhl B, Käsbohrer A, Alt K, Kraushaar B, Guerra B, Schroeter A, Fetsch A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in cattle food chains- prevalence, diversity, and antimicrobial resistance in Germany. J Anim Sci 2014;92(6): 2741-2751.
- Tenover FC, Arbeit R, Archer G, Biddle J, Byrne S, Goering R, Hancock G, Hebert AG, Hill B, Hollis R, Jarvis WR, Kreiswirth B, Eisner W, Maslow J, McDougal LK, Miller JM, Mulligan M, Pfaller MA. Comparison of Traditional and Molecular Methods of Typing Isolates of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 1994; 32(2):407-415.
- Thomas DY, Jarraud S, Lemerrier B, Cozon G, Echasserieau K, Etienne J, Gougeon ML, Lina G, Vandenesch F. *Staphylococcal* enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. Infect Immun 2006;74(8):4724-4734.
- Tomasz A, Drugeon HB, De Lencastre HM, Jabes D, McDougal LK, Bille J, Ile J. New mechanism for metisilin resistance in *S. aureus*. Clinical isolates that lack the PBP 2a and contain normal penicilin binding proteins with modified penicillin-binding capacity. Antimicrob Agents Chemother 1989;33(11):1869-1874.
- TÜİK 2016. Türkiye İstatistik Kurumu Hayvancılık İstatistikleri (TÜİK). <https://biruni.tuik.gov.tr/hayvancilikapp/hayvancilik.zul>, 2017.
- Türkyılmaz S, Tekbiyik S, Oryasin E, Bozdoğan B. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. Zoonoses Public Hlth 2010;57(3):197-203.
- Uraz G, Arslan S. Çiğ süt, pastörize süt ve beyaz peynir örneklerinde bulunan beta-laktamaz pozitif *Staphylococcus* 'lar üzerine bir araştırma. Gazi Üniv Fen Bilim Derg 1997;22(3):201-207.
- Usca A, Erol İ. Hellim peynirinin mikrobiyolojik kalitesi. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1998;45:97-103.
- Üçüncü M. A'dan Z'ye Peynir Teknolojisi Cilt II, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İzmir. 2004;545-1235.

- Ünal S, Hoskins J, Flokowitsch JE, Ernie Wu CY, Preston DA, Skatrudl PL. Detection of methicillin-resistant staphylococci by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30(7):1685-1691.
- Ünal S. Stafilokoklarda metisilin direnç mekanizmaları ve metisilin direnç tespit yöntemleri. *Flora* 1996;1:14-17.
- Ünal N, İstanbulluoğlu E. İnsan ve sığır kökenli *Staphylococcus aureus* izolatlarının fenotipik ve genotipik özelliklerinin araştırılması. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 2009;56:119-126.
- Vanassche T, Peetermans M, Van Aelst LN, Peetermans WE, Verhaegen J, Missiakas DM, Schneewind O, Hoylaerts MF, Verhamme P. The role of staphylothrombin-mediated fibrin deposition in catheter-related *Staphylococcus aureus* infections. *J Infect Dis* 2013;208(1):92-100.
- 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):166-171.
- Vasudevan P, Nair MKM, Annamalai T, Venkitanarayanan KS. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet Microbiol* 2003;92(1):179-185.
- Velasco D, del Mar Tomas M, Cartelle M, Beceiro A, Perez A, Molina F, Bou G. Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2005 ;55(3):379-382.
- Vernozy-Rozand C, Mazuy-Cruchaudet C, Bavai C, Richard Y. Comparison of three immunological methods for detecting staphylococcal enterotoxins from food. *Lett Appl Microbiol* 2004;39(6):490-494.
- Viçosa GN, Moraes PN, Yamazi AK, Nero LA. Enumeration of coagulase and thermonuclease-positive *Staphylococcus* spp. in raw milk and fresh soft cheese: An evaluation of Baird-Parker agar, rabbit plasma fibrinogen agar and the Petrifilm™ Staph express count system. *Food Microbiol* 2010;27(4):447-452.
- Voges O, Proskauer B. Beitrage zur Ernährungsphysiologie und zur differential diagnose der Bakterien der hemmorrhagischen septicamie. *Zeit Fur Hyg* 1898; 28(1):20-32.
- Vojtkovská H, Myšková P, Gelbíčová T, Skočková A, Koláčková I, Karpíšková R. Occurrence and characterization of food-borne pathogens isolated from fruit, vegetables and sprouts retailed in the Czech Republic. *Food Microbiol* 2017;63:147-152.

- Waldvogel FA. "*Staphylococcus aureus*", including toxic shock syndrome." Principles and practice of infectious diseases. Churchill Livingstone, New York, NY. 1995:1754-1777.
- Wang HY, Kim S, Kim J, Park SD, Uh Y, Lee H. Multiplex real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant staphylococci directly from positive blood cultures. J Clin Microbiol 2014;52(6):1911-1920.
- Wendlandt S, Schwarz S, Silley P. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Food-Borne Pathogen?. Annu Rev Food Sci Technol 2013;4:117-39.
- Wendlandt S, Feßler AT, Monecke S, Ehricht R, Schwarz S, Kadlec K. The diversity of antimicrobial resistance genes among staphylococci of animal origin. Int J Med Microbiol 2013a ;303(6):338-349.
- Wertheim HFL, Melles DC, Vos MC, Leeuwen WV, Belkum AV, Verbrugh HA, Nouwen JL. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. Lancet Infect Dis 2005;5(12):751-762.
- Wieneke AA, Roberts D, Gilbert RJ, Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969–1990. Epidemiol Infect 1993;110(03):519-531.
- Williams MR, Syson R. The bacteriological quality of Cyprus cheese. Environ Health 1984;92:(6)146-149.
- Wilson GJ, Seo KS, Cartwright RA, Connelley T, Chuang Smith ON, Merriman JA, Guinane CM, Park JY, Bohach GA, Schlievert PM. A novel core genome-encoded superantigen contributes to lethality of community associated MRSA necrotizing pneumonia. PLoS Pathog 2011;7(10):e1002271.
- Winn WC Jr, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6th ed. Baltimore: Lipincott Williams & Wilkins. 2006; 623-671.
- Wiseman GM. The hemolysins of *Staphylococcus aureus*. Bacteriol Rev 1975; 39(4):317-344.
- Wu S, Piscitelli C, de Lencastre H, Tomasz A. Tracking the evolutionary origin of the methicillin resistance gene: cloning and sequencing of a homologue of *mecA* 66 from a methicillin susceptible strain of *Staphylococcus sciuri*. Microb Drug Resist 1996;2(4):435-441.
- Yıldırım T, Sırken B, Yavuz C. Çiğ süt ve peynirlerde koagulaz pozitif stafilkoklar Vet Hekim Der Derg 2016;87(2):3-12.
- Yılsay TÖ, Bayizit A. Bursa ilinde tüketilen kaymakların mikrobiyolojik özellikleri ve bazı patojen bakterilerin aranması. Ulud Üniv Zir Fak Derg 2002;16:77-86.

Yücel N, Aml Y. Çiğ süt ve peynir örneklerinden *Staphylococcus aureus* ve koagulaz negatif stafilocokların identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılığı. Türk Hij Den Biyol Derg 2011;68(2):73-78.

Zadoks RN, Van Leeuwen WB, Kreft D, Fox LK, Barkema HW, Schukken YH, Belkum A. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and binary typing. J Clin Microbiol 2002;40(11):3894-3902.

Zinke C, Winter M, Mohr E, Krömker V. Occurrence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Cheese Produced in German Farm-Dairies. Adv Microbiol 2012;2:629-633.

EKLER

EK 1. *S. aureus* izolatlarının antibiyotik dirençliliklerinin disk difüzyon, E test ve PCR test sonuçları

No	Numune/İzolat kodu	<i>mecA</i> geni	Disk difüzyon		E-test (MİK değeri)	
			Oxacillin	Cefoxitin	Oxacillin	Cefoxitin
1.	Çiğ süt/8c		S	S	0,25	0,50
2.	Çiğ süt/8d		S	S	0,64	0,38
3.	Çiğ süt/8e		S	S	0,19	0,125
4.	Çiğ süt/9a		R	S	0,16	0,16
5.	Çiğ süt/16b	+	S	S	0,19	1,5
6.	Çiğ süt/17c	+	S	S	0,38	1,5
7.	Çiğ süt/19a	+	S	S	0,50	1,0
8.	Çiğ süt/19c	+	S	S	0,38	0,38
9.	Çiğ süt/19d	+	R	S	12,0	2,0
10.	Çiğ süt/19e	+	S	S	0,50	1,5
11.	Çiğ süt/21d		S	S	0,50	1,5
12.	Çiğ süt/21e		S	S	0,38	1,5
13.	Çiğ süt/23a		S	S	1,0	2,0
14.	Çiğ süt/23c		S	S	1,5	2,0
15.	Çiğ süt/24a		S	S	1,0	3,0
16.	Çiğ süt/44c		R	R	0,38	6,0
17.	Çiğ süt/52b		S	S	1,5	0,064
18.	Çiğ süt/88c		S	S	1,0	0,25
19.	Çiğ süt/88d		S	S	0,25	0,19
20.	Çiğ süt/89a		S	S	0,25	0,38
21.	Çiğ süt/89b		S	S	0,19	1,5
22.	Çiğ süt/89c		S	S	0,38	3,0
23.	Çiğ süt/89d		S	S	1,0	2,0

EK 1. Devamı

No	Numune/İzolat kodu	<i>mecA</i> geni	Disk difüzyon		E-test (MİK değeri)	
			Oxacillin	Cefoxitin	Oxacillin	Cefoxitin
24.	Çiğ süt/89e		S	S	0,125	1,0
25.	Çiğ süt/90a		S	S	0,38	0,094
26.	Çiğ süt/92a		S	S	0,094	1,0
27.	Çiğ süt/93b		S	S	0,125	1,5
28.	Çiğ süt/93c		S	S	0,25	0,75
29.	Çiğ süt/93d		S	S	0,125	0,75
30.	Çiğ süt/93e		S	S	0,125	1,0
31.	Çiğ süt/94a		R	S	8,0	1,5
32.	Çiğ süt/94b		S	S	0,094	3,0
33.	Çiğ süt/94d		S	S	0,19	2,0
34.	Çiğ süt/94e		S	S	0,19	0,50
35.	Çiğ süt/109e		S	S	0,50	2,0
36.	Çiğ süt/110b		S	S	0,032	0,75
37.	Çiğ süt/110e		S	S	0,125	0,25
38.	Çiğ süt/111b		S	S	0,125	0,19
39.	Çiğ süt/112e		S	S	0,38	1,5
40.	Çiğ süt/113d		S	S	0,75	0,38
41.	Çiğ süt/131d	+	R	R	4,0	24,0
42.	Çiğ süt/131e	+	R	S	16,0	0,094
43.	Çiğ süt/132d		S	S	0,19	2,0
44.	Çiğ süt/132e		S	S	0,38	0,25
45.	Çiğ süt/133a		S	S	0,064	0,75
46.	Çiğ süt/133b		S	S	0,094	0,047
47.	Çiğ süt/133d		S	S	0,125	1,5
48.	Çiğ süt/158c		S	S	0,125	0,1125

EK 1. Devamı

No	Numune/İzolat kodu	<i>mecA</i> geni	Disk difüzyon		E-test (MİK değeri)	
			Oxacillin	Cefoxitin	Oxacillin	Cefoxitin
49.	Çiğ süt/183e		S	S	0,064	0,75
50.	Çiğ süt/184d		S	S	0,023	0,25
51.	Çiğ süt/184e		S	S	0,38	4,0
52.	Çiğ süt/185a		S	S	0,50	3,0
53.	Çiğ süt/185c		R	R	32,0	12,0
54.	Çiğ süt/186b		S	S	0,38	3,0
55.	Çiğ süt/190c		S	S	0,25	0,50
56.	Çiğ süt/190d		R	S	64,0	0,25
57.	Çiğ süt/190e		S	S	0,125	1,5
58.	Kaymak/27e		R	R	8,0	12,0
59.	Kaymak/31a		S	S	1,0	0,50
60.	Kaymak/32a		S	S	0,47	0,32
61.	Kaymak/50d		R	R	6,0	6,0
62.	Kaymak/199a		S	S	0,50	1,5
63.	Kaymak/200c		S	S	0,125	1,0
64.	Kaymak/201a		S	S	0,125	0,50
65.	Kaymak/202a		R	R	1,0	2,0
66.	Kaymak/205a		S	S	0,75	1,0
67.	Peynir/34a		S	S	0,32	2,0
68.	Peynir/66a	+	S	R	2,0	4,0
69.	Peynir/69a		R	R	8,0	8,0
70.	Peynir/96c		S	S	0,194	1,0
71.	Peynir/97e		S	S	0,19	2,0
72.	Peynir/98a		S	S	0,094	2,0
73.	Peynir/98b		S	S	0,19	1,0

EK 1. Devamı

No	Numune/İzolat kodu	<i>mecA</i> geni	Disk difüzyon		E-test (MİK değeri)	
			Oxacillin	Cefoxitin	Oxacillin	Cefoxitin
74.	Peynir/98c		S	S	0,125	1,5
75.	Peynir/98e		S	S	0,25	2,0
76.	Peynir/99c		S	S	0,19	3,0
77.	Peynir/99d		S	S	0,50	2,0
78.	Peynir/100a		S	S	0,25	1,5
79.	Peynir/100e		S	S	0,125	2,0
80.	Peynir/114a		R	S	4,0	0,50
81.	Peynir/114b		S	S	0,094	0,50
82.	Peynir/114c		S	S	0,125	0,38
83.	Peynir/114d		S	S	0,125	0,50
84.	Peynir/114e		S	S	0,125	0,38
85.	Peynir/115a		S	S	0,094	0,38
86.	Peynir/115b		S	S	0,47	1,25
87.	Peynir/121c		S	S	0,19	2,0
88.	Peynir/121d		S	S	0,38	4,0
89.	Peynir/121e		S	S	0,38	4,0
90.	Peynir/122a		S	S	0,25	0,38
91.	Peynir/122c		S	R	0,38	12,0
92.	Peynir/122e		S	S	0,125	1,0
93.	Peynir/140b		S	S	0,125	2,0
94.	Peynir/141c		S	S	0,125	0,75
95.	Peynir/142d		R	S	4,0	3,0
96.	Peynir/195c		S	S	0,094	0,75
97.	Peynir/195e		S	S	0,064	0,50
98.	Peynir/196d		S	S	1,5	0,19
99.	Peynir/196e		S	S	0,047	1,5

EK 2. Çiğ manda sütü örneklerinde koagülaz (+) stafilokok sayısı

No	Numune türü-kodu	Koagülaz (+) stafilokok sayısı (kob/ml)	log 10 kob/ml
1.	Çiğ Süt/ 2-S1	$4,8 \times 10^{-3}$	3,681
2.	Çiğ Süt/ 3-S2	$<1,0 \times 10^{-1}$ *	-
3.	Çiğ Süt/ 4-S3	$3,6 \times 10^{-3}$	3,556
4.	Çiğ Süt/ 5-S4	$7,2 \times 10^{-2}$	2,857
5.	Çiğ Süt/ 6-S5	$<1,0 \times 10^{-1}$	-
6.	Çiğ Süt/ 7-S6	$2,6 \times 10^{-3}$	3,414
7.	Çiğ Süt/ 8-S7	$2,4 \times 10^{-3}$	3,380
8.	Çiğ Süt/ 9-S8	$8,4 \times 10^{-3}$	3,924
9.	Çiğ Süt/ 14-S9	$2,0 \times 10^{-3}$	3,301
10.	Çiğ Süt/ 15-S10	$6,0 \times 10^{-3}$	3,778
11.	Çiğ Süt/16-S11	$8,0 \times 10^{-2}$	2,903
12.	Çiğ Süt/ 17-S12	$5,8 \times 10^{-3}$	3,763
13.	Çiğ Süt/ 18-S13	$4,9 \times 10^{-3}$	3,690
14.	Çiğ Süt/ 19-S14	$1,2 \times 10^{-4}$	4,079
15.	Çiğ Süt/ 20-S15	$<1,0 \times 10^{-1}$	-
16.	Çiğ Süt/ 21-S16	$2,8 \times 10^{-4}$	4,447
17.	Çiğ Süt/ 22-S17	$1,2 \times 10^{-4}$	4,079
18.	Çiğ Süt/ 23-S18	$1,9 \times 10^{-4}$	4,278
19.	Çiğ Süt/ 24-S19	$4,0 \times 10^{-2}$	2,602
20.	Çiğ Süt/ 25-S20	$<1,0 \times 10^{-1}$	-
21.	Çiğ Süt/ 40-S21	$<1,0 \times 10^{-1}$	-
22.	Çiğ Süt/ 41-S22	$4,0 \times 10^{-3}$	3,602
23.	Çiğ Süt/ 42-S23	$5,6 \times 10^{-3}$	3,748
24.	Çiğ Süt/ 43-S24	$<1,0 \times 10^{-1}$	-
25.	Çiğ Süt/ 44-S25	$1,0 \times 10^{-4}$	4,000
26.	Çiğ Süt/ 45-S26	$6,4 \times 10^{-2}$	2,806
27.	Çiğ Süt/ 46-S27	$2,0 \times 10^{-2}$	2,301
28.	Çiğ Süt/ 51-S28	$1,5 \times 10^{-3}$	3,176
29.	Çiğ Süt/ 52-S29	$6,8 \times 10^{-2}$	2,832
30.	Çiğ Süt/ 53-S30	$1,6 \times 10^{-4}$	4,204
31.	Çiğ Süt/ 54-S31	$5,6 \times 10^{-2}$	2,748
32.	Çiğ Süt/ 55-S32	$<1,0 \times 10^{-1}$	-
33.	Çiğ Süt/ 58-S33	$2,6 \times 10^{-3}$	3,414

*; $<1,0 \times 10^{-1}$ = Tespit limitinin altında

EK 2. Devamı

No	Numune türü-kodu	Koagülaz (+) stafillokok sayısı (kob/ml)	log 10 kob/ml
34.	Çiğ Süt/ 59-S34	$<1,0 \times 10^{-1}$	-
35.	Çiğ Süt/ 60-S35	$<1,0 \times 10^{-1}$	-
36.	Çiğ Süt/ 61-S36	$<1,0 \times 10^{-1}$	-
37.	Çiğ Süt/ 62-S37	$8,2 \times 10^{-3}$	3,913
38.	Çiğ Süt/ 63-S38	$8,8 \times 10^{-3}$	3,944
39.	Çiğ Süt/ 64-S39	$2,0 \times 10^{-3}$	3,301
40.	Çiğ Süt/ 74-S40	$<1,0 \times 10^{-1}$	-
41.	Çiğ Süt/ 75-S41	$6,6 \times 10^{-2}$	2,819
42.	Çiğ Süt/ 76-S42	$<1,0 \times 10^{-1}$	-
43.	Çiğ Süt/ 77-S43	$<1,0 \times 10^{-1}$	-
44.	Çiğ Süt/ 78-S44	$4,0 \times 10^{-2}$	2,602
45.	Çiğ Süt/ 79-S45	$<1,0 \times 10^{-1}$	-
46.	Çiğ Süt/ 80-S46	$<1,0 \times 10^{-1}$	-
47.	Çiğ Süt/ 81-S47	$<1,0 \times 10^{-1}$	-
48.	Çiğ Süt/ 82-S48	$<1,0 \times 10^{-1}$	-
49.	Çiğ Süt/ 83-S49	$<1,0 \times 10^{-1}$	-
50.	Çiğ Süt/ 84-S50	$5,3 \times 10^{-3}$	3,724
51.	Çiğ Süt/ 85-S51	$<1,0 \times 10^{-1}$	-
52.	Çiğ Süt/ 86-S52	$1,7 \times 10^{-4}$	4,230
53.	Çiğ Süt/ 87-S53	$1,3 \times 10^{-4}$	4,113
54.	Çiğ Süt/ 88-S54	$4,8 \times 10^{-2}$	2,681
55.	Çiğ Süt/ 89-S55	$8,0 \times 10^{-3}$	3,903
56.	Çiğ Süt/ 90-S56	$2,0 \times 10^{-3}$	2,301
57.	Çiğ Süt/ 91-S57	$5,7 \times 10^{-3}$	3,755
58.	Çiğ Süt/ 92-S58	$2,6 \times 10^{-3}$	3,414
59.	Çiğ Süt/ 93-S59	$2,6 \times 10^{-3}$	3,414
60.	Çiğ Süt/ 94-S60	$1,1 \times 10^{-3}$	3,041
61.	Çiğ Süt/ 95-S61	$1,2 \times 10^{-3}$	3,079
62.	Çiğ Süt/ 104-S62	$2,4 \times 10^{-4}$	4,380
63.	Çiğ Süt/105-S63	$8,0 \times 10^{-3}$	3,903
64.	Çiğ Süt/ 106-S64	$<1,0 \times 10^{-1}$	-
65.	Çiğ Süt/ 107-S65	$5,1 \times 10^{-4}$	4,707
66.	Çiğ Süt/ 108-S66	$<1,0 \times 10^{-1}$	-
67.	Çiğ Süt/ 109-S67	$2,1 \times 10^{-4}$	4,322

EK 2. Devamı

No	Numune türü-kodu	Koagulaz (+) stafilokok sayısı (kob/ml)	log 10 kob/ml
68.	Çiğ Süt/ 110-S68	$4,0 \times 10^{-3}$	3,602
69.	Çiğ Süt/ 111-S69	$7,0 \times 10^{-4}$	4,845
70.	Çiğ Süt/ 112-S70	$1,9 \times 10^{-5}$	5,278
71.	Çiğ Süt/ 113-S71	$1,2 \times 10^{-5}$	5,079
72.	Çiğ Süt/ 130-S72	$3,2 \times 10^{-4}$	4,505
73.	Çiğ Süt/ 131-S73	$8,8 \times 10^{-4}$	4,944
74.	Çiğ Süt/ 132-S74	$3,2 \times 10^{-4}$	4,505
75.	Çiğ Süt/ 133-S75	$8,0 \times 10^{-4}$	4,903
76.	Çiğ Süt/ 134-S76	$1,5 \times 10^{-5}$	5,176
77.	Çiğ Süt/ 135-S77	$<1,0 \times 10^{-1}$	-
78.	Çiğ Süt/ 136-S78	$<1,0 \times 10^{-1}$	-
79.	Çiğ Süt/ 137-S79	$<1,0 \times 10^{-1}$	-
80.	Çiğ Süt/ 156-S80	$<1,0 \times 10^{-1}$	-
81.	Çiğ Süt/ 157-S81	$<1,0 \times 10^{-1}$	-
82.	Çiğ Süt/ 158-S82	$<1,0 \times 10^{-1}$	-
83.	Çiğ Süt/ 159-S83	$<1,0 \times 10^{-1}$	-
84.	Çiğ Süt/ 160-S84	$<1,0 \times 10^{-1}$	-
85.	Çiğ Süt/ 161-S85	$<1,0 \times 10^{-1}$	-
86.	Çiğ Süt/ 162-S86	$<1,0 \times 10^{-1}$	-
87.	Çiğ Süt/ 163-S87	$<1,0 \times 10^{-1}$	-
88.	Çiğ Süt/ 164-S88	$<1,0 \times 10^{-1}$	-
89.	Çiğ Süt/ 183-S89	$6,0 \times 10^{-2}$	2,778
90.	Çiğ Süt/ 184-S90	$8,0 \times 10^{-2}$	2,903
91.	Çiğ Süt/ 185-S91	$8,0 \times 10^{-2}$	2,903
92.	Çiğ Süt/ 186-S92	$1,2 \times 10^{-3}$	3,079
93.	Çiğ Süt/ 187-S93	$8,0 \times 10^{-2}$	2,903
94.	Çiğ Süt/ 188-S94	$1,4 \times 10^{-3}$	3,146
95.	Çiğ Süt/ 189-S95	$<1,0 \times 10^{-1}$	-
96.	Çiğ Süt/ 190-S96	$7,2 \times 10^{-2}$	2,857
97.	Çiğ Süt/ 191-S97	$4,8 \times 10^{-2}$	2,681
98.	Çiğ Süt/ 192-S98	$<1,0 \times 10^{-1}$	-
99.	Çiğ Süt/ 193-S99	$1,6 \times 10^{-2}$	2,204
100.	Çiğ Süt/ 194-S100	$2,8 \times 10^{-2}$	2,447

EK 3. Manda kaymağı örneklerinde koagülaz (+) stafilokok sayısı

No	Numune türü-kodu	Koagülaz (+) stafilokok sayısı (kob/ml)	log 10 kob/ml
1.	Kaymak/ 26-K1	$<2.0 \times 10^{-2}$ *	-
2.	Kaymak/ 27-K2	$5,6 \times 10^{-2}$	2,748
3.	Kaymak/ 28-K3	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
4.	Kaymak/ 29-K4	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
5.	Kaymak/ 30-K5	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
6.	Kaymak/ 31-K6	$2,0 \times 10^{-2}$	2,301
7.	Kaymak/ 32-K7	$2,0 \times 10^{-2}$	2,301
8.	Kaymak/ 33-K8	$6,0 \times 10^{-2}$	2,778
9.	Kaymak/ 47-K9	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
10.	Kaymak/ 48-K10	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
11.	Kaymak/ 49-K11	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
12.	Kaymak/ 50-K12	$6,0 \times 10^{-2}$	2,778
13.	Kaymak/ 101-K13	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
14.	Kaymak/ 102-K14	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
15.	Kaymak/ 103-K15	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
16.	Kaymak/ 123-K16	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
17.	Kaymak/ 124-K17	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
18.	Kaymak/ 125-K18	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
19.	Kaymak/ 126-K19	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
20.	Kaymak/ 127-K20	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
21.	Kaymak/ 128-K21	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
22.	Kaymak/ 129-K22	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
23.	Kaymak/ 148-K23	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
24.	Kaymak/ 149-K24	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
25.	Kaymak/ 150-K25	$<2.0 \times 10^{-2}$	-

*; $<2.0 \times 10^{-2}$ = Tespit limitinin altında

EK 3. Devamı

No	Numune türü-kodu	Koagülaz (+) stafilokok sayısı (kob/ml)	log 10 kob/ml
1.	Kaymak/ 151-K26	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
2.	Kaymak/ 152-K27	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
3.	Kaymak/ 153-K28	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
4.	Kaymak/ 154-K29	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
5.	Kaymak/ 155-K30	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
6.	Kaymak/ 174-K31	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
7.	Kaymak/ 175-K32	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
8.	Kaymak/ 176-K33	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
9.	Kaymak/ 177-K34	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
10.	Kaymak/ 178-K35	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
11.	Kaymak/ 179-K36	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
12.	Kaymak/ 180-K37	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
13.	Kaymak/ 181-K38	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
14.	Kaymak/ 182-K39	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
15.	Kaymak/ 197-K40	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
16.	Kaymak/ 198-K41	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
17.	Kaymak/ 199-K42	$2,0 \times 10^{-2}$	2,301
18.	Kaymak/ 200-K43	$2,0 \times 10^{-2}$	2,301
19.	Kaymak/ 201-K44	$2,0 \times 10^{-2}$	2,301
20.	Kaymak/ 202-K45	$2,0 \times 10^{-2}$	2,301
21.	Kaymak/ 203-K46	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
22.	Kaymak/ 204-K47	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
23.	Kaymak/ 205-K48	$2,0 \times 10^{-2}$	2,301
24.	Kaymak/ 206-K49	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
25.	Kaymak/ 207-K50	$<2.0 \times 10^{-2}$	-

EK 4. Manda peyniri örneklerinde koagülaz (+) stafilokok sayısı

No	Numune türü-kodu	Koagülaz (+) stafilokok sayısı (kob/ml)	log 10 kob/ml
1.	Peynir/ 34-P1	$3,2 \times 10^{-2}$	2,505
2.	Peynir/ 35-P2	$1,4 \times 10^{-4}$	4,146
3.	Peynir/ 36-P3	$8,0 \times 10^{-3}$	3,903
4.	Peynir/ 37-P4	$<2.0 \times 10^{-2}$ *	-
5.	Peynir/ 38-P5	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
6.	Peynir/ 39-P6	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
7.	Peynir/ 65-P7	$1,6 \times 10^{-2}$	2,204
8.	Peynir/ 66-P8	$5,6 \times 10^{-2}$	2,748
9.	Peynir/ 67-P9	$3,7 \times 10^{-4}$	4,568
10.	Peynir/ 68-P10	$2,0 \times 10^{-2}$	2,301
11.	Peynir/ 69-P11	$2,0 \times 10^{-2}$	2,301
12.	Peynir/ 70-P12	$1,1 \times 10^{-4}$	4,041
13.	Peynir/ 71-P13	$5,3 \times 10^{-3}$	3,724
14.	Peynir/ 72-P14	$2,6 \times 10^{-3}$	3,414
15.	Peynir/ 73-P15	$1,3 \times 10^{-4}$	4,113
16.	Peynir/ 96-P16	$1,3 \times 10^{-6}$	6,113
17.	Peynir/ 97-P17	$9,6 \times 10^{-5}$	5,819
18.	Peynir/ 98-P18	$1,2 \times 10^{-6}$	6,079
19.	Peynir/ 99-P19	$1,1 \times 10^{-6}$	6,041
20.	Peynir/ 100-P20	$4,8 \times 10^{-5}$	5,681
21.	Peynir/ 114-P21	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
22.	Peynir/ 115-P22	$4,0 \times 10^{-4}$	4,602
23.	Peynir/ 116-P23	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
24.	Peynir/ 117-P24	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
25.	Peynir/ 118-P25	$<2.0 \times 10^{-2}$	-

*; $<2.0 \times 10^{-2}$ = Tespit limitinin altında

EK 4. Devamı

No	Numune türü-kodu	Koagulaz (+) stafilokok sayısı (kob/ml)	log 10 kob/ml
1.	Peynir/ 119-P26	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
2.	Peynir/ 120-P27	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
3.	Peynir/ 121-P28	$1,7 \times 10^{-5}$	5,230
4.	Peynir/ 122-P29	$5,2 \times 10^{-5}$	5,716
5.	Peynir/ 138-P30	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
6.	Peynir/ 139-P31	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
7.	Peynir/ 140-P32	$4,0 \times 10^{-5}$	5,602
8.	Peynir/ 141-P33	$3,6 \times 10^{-5}$	5,556
9.	Peynir/ 142-P34	$2,0 \times 10^{-5}$	5,301
10.	Peynir/ 143-P35	$1,2 \times 10^{-5}$	5,079
11.	Peynir/ 144-P36	$8,0 \times 10^{-5}$	5,903
12.	Peynir/ 145-P37	$1,1 \times 10^{-6}$	6,041
13.	Peynir/ 146-P38	$2,0 \times 10^{-5}$	5,301
14.	Peynir/ 147-P39	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
15.	Peynir/ 165-P40	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
16.	Peynir/ 166-P41	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
17.	Peynir/ 167-P42	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
18.	Peynir/ 168-P43	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
19.	Peynir/ 169-P44	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
20.	Peynir/ 170-P45	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
21.	Peynir/ 171-P46	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
22.	Peynir/ 172-P47	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
23.	Peynir/ 173-P48	$<2.0 \times 10^{-2}$	-
24.	Peynir/ 195-P49	$4,8 \times 10^{-4}$	4,681
25.	Peynir/ 196-P50	$8,0 \times 10^{-4}$	4,903

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Erdem SAKA

Doğum Yeri: Ayancık

Doğum Tarihi: 17.01.1982

Medeni Hali: Evli

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Samsun Veteriner Sağlık Meslek Lisesi	1998-2000
Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2001-2003
Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2003-2006
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2010-2017

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

Van/Erciş İlçe Gıda Tarım ve Hay. Müd.	2003-2009
Samsun/Bafra İlçe Gıda Tarım ve Hay. Müd.	2009-2012
Samsun İl Gıda Tarım ve Hay. Müd.	2012-2016
Samsun Veteriner Kontrol Ens. Müd.	2016-.....

İletişim Bilgileri

Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü

Yeşildere Mahallesi, Atatürk Bulvarı Alaçam Cad. 55200 Atakum/Samsun

E-posta:

erdem.saka@gthb.gov.tr

veteriner.dem@hotmail.com

Telefon:

(0362) 437 08 36 - 177