TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TAVUK ETLERİNDE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* İZOLASYONU, PCR YÖNTEMİ İLE ENTEROTOKSİN TİPLENDİRİLMESİ VE *mecA*, *tetM*, *tetK*, *ermA*, *ermC* GENLERİNİN SAPTANMASI

Alireza DAFE

GIDA HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Tarık Halûk ÇELİK

2012- ANKARA

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TAVUK ETLERİNDE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* İZOLASYONU, PCR YÖNTEMİ İLE ENTEROTOKSİN TİPLENDİRİLMESİ VE *mecA*, *tetM, tetK*, *ermA*, *ermC* GENLERİNİN SAPTANMASI

Alireza DAFE

GIDA HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Tarık Halûk ÇELİK

2012- ANKARA

İÇİNDEKİLER

Kabul ve onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vii
Simgeler ve kısaltmalar	vii
Şekiller	viii
Çizelgeler	ix
1. GİRİŞ	**1**
1.1. Tarihçe	**2**
1.2. Stafilokokların Klasifikasyonu ve Genel Özellikleri	**3**
1.3. Stafilokokların Biyokimyasal Özellikleri	**7**
1.4. Stafilokokal Enzimler	**9**
1.4.1.Koagulaz	9
1.4.2. Lesitinaz	10
1.4.3. Stafilokinaz	11
1.4.4. Katalaz	11
1.4.5. hyaluronidaz	12
1.4.6. Lipaz	12
1.4.7. Deoksiribonükleaz (DNase)	12
1.4.8. Penisilinaz (ß – laktamaz)	12
1.5. Stafilokokların Virulans Faktörleri	**12**
1.5.1. *S. aureus*'da Hücre Yapısı ve Hücre Duvarı (Peptidoglikan Yapısı)	13
1.5.2. Yüzey Proteinler	13
1.5.3. Lökosidinler	14
1.5.4. Teikoik Asit	14
1.5.5. Protein A	14
1.5.6. Mikro kapsül	15

1.6. *S. aureus*'un Gelişimini ve Enterotoksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler 17
1.6.1. Ekstraselüler Faktörler 17
1.6.1.1. Sıcaklık 18
1.6.1.2. pH Değeri 18
1.6.1.3. Su Aktivitesi (a_w değeri) ve Tuz miktarı 19
1.6.2. İntraselüler faktörler 20
1.7. Stafilokokal Enterotoksinler (SE) ve Genel Özellikleri 20
1.7.1. Stafilokokal Enterotoksin A (SEA) 23
1.7.2. Stafilokokal Enterotoksin B (SEB) 23
1.7.3. Stafilokokal Enterotoksin C (SEC) 24
1.7.4. Stafilokokal Enterotoksin D (SED) 24
1.7.5. Stafilokokal Enterotoksin E (SEE) 24
1.7.6. Stafilokokal Enterotoksin G (SEG) 25
1.7.7. Stafilokokal Enterotoksin H (SEH) 25
1.7.8. Stafilokokal Enterotoksin I (SEI) 25
1.7.9. Stafilokokal Enterotoksin J (SEJ) 25
1.8. Antibiyotik Direnci Mekanizmaları ve Genetik Düzenlenmesi 26
1.8.1. Beta-laktamaz direnci 26
1.8.1.1. Penisilin direnci 27
1.8.1.2. Metisilin direnci 28
1.8.2. Non-beta-laktam antibiyotiklere direnç 30
1.8.2.1. Kinolon Direnci 30
1.8.2.2. Aminoglikozid direnci 31
1.8.2.3. Glikopeptit direnci 32
1.8.2.4.Tetrasiklin direnci 32
1.9. Stafilokokların Kontaminasyon Kaynakları ve Kanatlı Eti Ürünlerinde *Staphylococcus aureus* Bulunuşu 33
1.10. Patogenez ve Semptomlar 36
1.11. Epidemiyoloji 38
1.12. Korunma ve Kontrol 40
2. GEREÇ VE YÖNTEM 42

2.1. Gereç **42**

2.1.1. Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi Amacıyla Kullanılan Antibiyotik Diskleri 42

2.1.2. *S. aureus*'un İzolasyon, İdentifikasyonunda ve Örneklerin Analiznde Kullanılan Besiyerleri ve Test Malzemeleri 42

2.1.2.1. Baird-Parker (BP) Agar Base (Oxoid CM0275) 43

2.1.2.2. Egg Yolk Tellurite Emulsion (Oxoid SR0054) 43

2.1.2.3. Trypton Soya Agar (TSA) (Oxoid CM0131) 43

2.1.2.4. Mueller Hinton Agar (Oxoid CM337) 44

2.1.2.5. Columbia Blood Agar Base (OXOID; CM0331) 44

2.1.3. PCR'da Kullanılan Malzemeler 44

2.1.3.1. DNA Marker 44

2.1.3.2. Pozitif Suşlar 44

2.1.3.3. Primer Çiftleri 45

2.1.3.4. Lysostaphin 45

2.1.3.5. Proteinase-K (Amresco, 0706-100MG, USA) 46

2.1.3.6. Agaroz Jel (Cambrex SeaKem LE Agarose, Rockland, ABD) 46

2.1.3.7. TBE Solüsyonu (Tris-Borik Asit-EDTA) 46

2.1.3.8. Ethidium Bromide (% 0.1'lik) 46

2.2. Yöntem **47**

2.2.1. Gıda Örneklerinin Analize Hazırlanması ve Katı Besiyerlerine Ekim 47

2.2.2. Mikrokok/Stafilokokların Saptanması 47

2.2.3. *Staphylococcus*'ların ve *Micrococcus*'ların Ayrımında Kullanılan Testler ve Besiyerleri 48

2.2.3.1. GramBoyama 48

2.2.3.2. Oksidaz Test 48

2.2.3.3. Katalaz Test 49

2.2.4. Koagulaz Pozitif Staphylococcus'ların ve KNS'lerin identifikasyonunda Yapılan Testler ve kullanılan Besiyerleri 50

2.2.4.1. Lamda Koagulaz Testi 50

2.2.4.2. Tüpte Koagulaz Test 50

2.2.4.3. Deoksiribonükleaz (DNase Testi) 51
2.2.4.4. Mannitol Test 52
2.2.4.5. Hemoliz Test 53
2.2.5. *S. aureus*'un İdentifikasyonu 53
2.2.6. *S. aureus* İzolatlarının Multipleks PCR ile Moleküler Tiplendirmesi 55
2.2.6.1. DNA Ekstraksiyonu 55
2.2.6.2. *S. aureus*'un *nuc* geni tespiti 55
2.2.6.3. PCR Protokolü ve Amplifikasyonu 56
2.2.6.4. Agaroz Jel Elektroforez 56
2.2.7. Multipleks PCR ile Toksin oluşturan Genlerinin Tespiti 57
2.2.7.1. Multipleks PCR Protokolü 57
2.2.7.2. Agaroz Jel Elektroforez 57
2.2.8. Antibiyotik Dirençlilik Genlerinin PCR ile Saptanması 58
2.2.8.1. DNA Ekstraksiyonu 58
2.2.8.2. PCR Protokolü ve Amplifikasyonu 58
2.2.9. Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi 59
2.2.10. İstatistiksel Analizler 60

3. BULGULAR **61**
3.1. Mikrobiyolojik Ekim Sonuçları 61
3.1.1. Mikrokok / Stafilokok 61
3.1.2. Koagulaz Pozitif Stafilokoklar 62
3.1.3. *S. aureus* 63
3.2. Enterotoksin Oluşturma Yeteneğinin Belirlenmesi 64
3.2.1. PCR Sonuçları 66
3.3. Antibiyotik Dirençlilik Sonuçları 70

4. TARTIŞMA **73**
5. ÖZET **80**
6. SUMMARY **82**
7. KAYNAKLAR **84**
8. ÖZGEÇMİŞ **98**

ÖNSÖZ

Gelişmişliğin en önemli göstergelerinden birisi insanların tükettikleri hayvansal ürün miktarıdır. Hayvansal gıdalar arasında tavuk eti, günlük protein gereksiniminin karşılanması açısından protein miktarı ve niteliği ile ön planda tutulması gereken bir gıddır.

Dünyada son 10 yıl içinde hayvansal gıda üretiminde kanatlı eti üretiminin payı dünya nüfusunun hızla artması, sağlıklı beslenme, yeni tüketim alışkanlıkları ve ekonomik olmasına bağlı olarak hızla artmaktadır. FAO'nun 2004 yılı verilerine göre dünya tavuk eti üretimi 54.654.000 ton dur. Türkiyede kanatlı eti üretimi de dünyadaki bu gelişmelere paralel olarak hızla artarak tavuk eti üretimi yaklaşık 650.000 tona, ulaşmıştır (Anon, 2001; 2004).

Tavuk eti, Protein, vitamin, mineral ve büyüme faktörleri içeren üstün besleyici değeri yanında, mikroorganizmaların üreyip gelişebilmeleri için de uygun bir ortam oluşturmaktadır. Mikroorganizmaların bir kısımı patojen Mikroorganizma olarak hayvanların mikroflorası ve çevresel kaynaklı olarak mezbahalarda kesim işlemi sırasında çiğ etin kontaminasyonuna ve bozulmasına yol açarken etlerin parçalama, işleme, paketleme, muhafaza ve dağıtım aşamalarında çapraz kontaminasyonlarların oluşması sebebiyle son ürünü kontamine ederek insanlarda gıda infeksiyon ve intoksikasyonlarına neden olabilmektedir.

Son ürünün kalitesi ve güvenliği açısından kanatlı kesimhanelerinde patojen ve bozulmaya neden olan mikroorganizmaların kontrolü önem arz eder. Kanatlı kesimhanelerinde saatlik üretim oranının fazla olması; haşlama (tüy yumuşatma), tüy yolma, iç organ çıkarma, ve soğutma bölümlerinde mikrobiyel kontaminasyon riskinin yüksek olması, iç organ çıkarma aşamasında karın boşluğunun kontaminasyonu deri üzerinde yayılması mikrobiyel yükü özellikle *Staphylococcus aureus* artması nedeniyle kontrol güçleşebilmektedir.

ABD Hastalık Kontrol Merkezinin (Centers for Disease Control: CDC) 2011 raporuna göre ABD'de her yıl 48 milyon insan (her altı kişiden biri) gıda kaynaklı hastalıklardan etkilenmektedir (CDC, 2011). Stafilokokal gıda intoksikasyonları tüm dünyada en önemli gıda kaynaklı intoksikasyonlar arasında yer almaktadır. Stafilokokal enterotoksinlerin ısı işlemi ile tam olarak elimine edilmemesi, düşük su aktivitesi gibi çeşitli ortamlarda canlılığını ve üremesini sürdürebilmesi risk faktörlerini arttıran unsurlardır.

Bu tez çalışması, Ankara'da satışa sunulan farklı markalardan, 120 paket tavuk örneğinde *Staphylococcus aureus* varlığının saptanması ve üretilmiş olan toksinlerin tiplendirilmesi, antibiotiklere karşı dirençlilik durumları belirlenerek, saptanacak izolatlarda metisilin, tetrasiklin ve eritromisin direncini kodlayan genleri sırasıyla *(mecA*), *tet(M), tet(K), erm(A) ve erm(C) PCR* yöntemi ile tespit edilmesi amacıyla planlanmıştır.

Tez çalışmamın konusunun seçiminde, çalışmalarım boyunca ve yüksek lisans eğitimim süresince, her türlü bilgi ve desteğini benden esirgemeyen, her konuda bana yol gösteren, başta saygı değer danışman hocam Prof. Dr. T. Haluk ÇELİK olmak üzere, Bölüm başkanımız Prof. Dr. Belgin SARIMEHMETOĞLU, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürü sayın Prof. Dr. İrfan EROL'a, anabilim dalındaki değerli hocalarıma, bu çalışmada her zaman bana destek olan, Prof. Dr. Haydar ÖZDEMİR'e ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan Doç.Dr. Barış Sareyyüpoğlu'na, PCR çalışmasında bana yardımcı olan Arş. Gör. Murat ULUDAĞ'a, Prof.Dr.Özlem KÜPLÜLÜ'ye, Doç.Dr.F.Seda BİLİR ORMANCI'ya ve değerli arkadaşım Alireza HANİFEHNEZHAD'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Aynı zamanda maddi ve manevi destekleriyle beni yalnız bırakmayan ve bu günlere ulaşmamda büyük emekleri bulunan, hayatlarını ortaya koyan biyoloji uzmanı sevgili babam olmak üzere değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, her zaman teşvik ve motive eden sevgili ve değerli aileme katkılarından dolayı sonsuz teşekkürlerimi boynumun borcu olarak sunuyorum.

SİMGELER VE KISALTMALAR

Agr : Accessory gene regulator
AMGC : Aerob Mezofil Genel Canlı
Anon : Anonim
a_w : Activity of water
CRF : Coagulase Reaction Faktor
D-değeri : Decimal reduction time
Dk : Dakika
Dnase : Deoxyribonuclease
E_h : Redox potential
ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FAO : Food and Agriculture Organization
ICMSF : International Comission on Microbiological Specification For Foods
Kb : Kilo Baz
kob : Koloni oluşturan birim
log : Logaritma
MIC : Minimum Inhibitory Concentration
MI : Mililitre
MRSA : Methicillin Resistant *S. aureus*
MSSA : Methicillin Sensitive *S. aureus*
NCCLS : National Committe for Clinical Laboratory Standards
ng : Nanogram
nm : Nanometre
NRSA : Naficillin Resistant *S. aureus*
PBP : Penicilin Binding Protein
PCR : Polymerase Chain Reaction
pH : Potansiyel hidrojen
PTSAgs : Pyrogenic Toxin Superantigens
SCC*mec* : Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*
SE : Staphylococcal Enterotoxin
SEI : Staphylococcal Enterotoxin-like
Sn : Saniye
TCR : T Cell Receptor
Tnase : Termostabil nuclease
TSST : Toxic Shock Syndrome Toxin
VISA : Vancomycin Intermediate-Resistant *S. aureus*
VRSA : Vancomycin Resistant *S. aureus*
µg : Mikrogram
µl : Mikrolitre
µm : Mikrometre

ŞEKİLLER

	6
Şekil 1.1. Gram pozitif bakterilerin identifikasyon şeması	
Şekil 1.2. *S. aureus*'un tüpte aglütinasyonunun oluşumu	9
Şekil 1.3. Koagulaz pozitif stafilokoklarda pıhtı oluşumu	10
Şekil 1.4. Katalaz testi ile stafilokokların ayrımı	11
Şekil 1.5. *Staphylococcus aureus*'un yapısı	15
Şekil 2.1. Baird Parker (BP) Agar'da *S. aureus* kolonilerinin görünümü	43
Şekil 2.2.1. Gram boyamada *S. aureus*'un mikroskobik görünümü	48
Şekil 2.2.2. Oksidaz test	49
Şekil 2.2.3. Gram pozitif kokların adlandırılmalarında takip edilen yol	49
Şekil 2.2.4. Lamda katalaz testi	50
Şekil 2.2.5. *S. aureus*'un lamda aglütinasyonu	50
Şekil 2.2.6. *S. aureus*'un tüpte aglütinasyonu	51
Şekil 2.2.7. Mannitol testi	52
Şekil 2.2.8. Hemoliz testi	53
Şekil 2.2.9. Microbact Staph 12S kitinin görünümü	54
Şekil 2.2.10. Muller Hinton Agar	60
Şekil 3.1. Piliç parça etlerinde kültür tekniği ile saptanan mikrokok/stafilokok pozitif örneklerin dağılım oranı	62
Şekil 3.2. Piliç parça etlerinde kültür tekniği ile saptanan koagulaz pozitif örneklerin dağılım oranı	63
Şekil 3.3. Piliç parça etlerinde kültür tekniği ile saptanan *S. aureus* pozitif örneklerin dağılım oranı	63
Şekil 3.4. Multipleks PCR ile saptanan gen dağılımı	66
Şekil 3.5. Multipleks PCR ile *S. aureus, sea, seb, sec, sed* gen sekansları esas alınarak moleküler karakterizasyonu ve örnek tipine göre dağılımı	66
Şekil 3.6. Standart PCR ile *erm*(A), *erm*(C) genlerinin dağılımı	68
Şekil 3.7. Standart PCR ile *tet*(M), *tet*(K) genlerinin dağılımı	68
Şekil 3.8. *S. aureus* izolatlarının duyarlılık ve dirençlilik değerleri	72

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. 2000-2010 Yılları Arasında Kanatlı Eti Üretim-Tüketim Miktarları 1
Çizelge 1.2. Bazı Stafilokok Türlerinin Genel Özellikleri 6
Çizelge 1.3. *S.aureus*, *S.epidermidis* ve mikrokokların biokimyasal karakterleri 7
Çizelge 1.4. *Staphylococcus*'ların biyokimyasal özellikleri 8
Çizelge 1.5. *S. aureus* hücre duvarı özellikleri 15
Çizelge 1.6. *S. aureus* virulens faktörleri ve bu faktörlerin patogenetik mekanizmaları 16
Çizelge 1.7. *S. aureus*' un üremesi ve toksin Oluşturması için genel koşullar 18
Çizelge 1.8. *S. aureus* tarafından üretilen toksinlerin özellikleri 22
Çizelge 1.9. *S. aureus* SE oluşturma düzeyleri 35
Çizelge 1.10. Ülkelere göre stafilokokal gıda zehirlenmeleri 36
Çizelge 2.1. S. *aureus*'un toksin genlerinin primer dizilimi 45
Çizelge 2.2.1. *S. aureus*'un identifikasyonu için kullanılan testler görünümü 53
Çizelge 3.1. Tavuk etlerinde kültür tekniği ile *S. aureus* pozitif numunelerin dağılımı. 61
Çizelge 3.2. Analiz edilen tavuk parça et örneklerindeki ortalama mikroorganizma düzeyleri 64
Çizelge 3.3. Analiz edilen tavukparça et örneklerinin mikrokok/stafilokok, koagulaz pozitif stafilokok ve *S. aureus* ile kontaminasyon düzeyleri 64
Çizelge 3.4. Tavuk parça et örneklerindeki mikroorganizma düzeylerinin (log kob/g) istatistiksel olarak değerlendirilmesi 64
Çizelge 3.5. Standart PCR ile but, göğüs ve kanat örneklerinde *S. aureus*'un *nuc* geninin tespiti 65
Çizelge 3.6. But, göğüs ve kanat örneklerinden *S. aureus*'un *nuc, sea, seb, sec, sed* gen sekansları esas alınarak multipleks PCR ile moleküler karakterizasyonu 67
Çizelge 3.7. But, göğüs ve kanat örneklerinden *S. aureus*'un *nuc, erm(C), erm(A), tet(K)* ve *tet(M)* gen sekansları esas alınarak multipleks PCR ile moleküler karakterizasyonu 69
Çizelge 3.8. Standart PCR tekniği ile doğrulanan örnek sayısı 70
Çizelge 3.9. Tavuk parça etlerinden izole edilen *S. aureus* suşlarının dirençlilik tablosu 71
Çizelge 3.10. İzolatların çalışmada kullanılan antibiyotiklere dirençlilik düzeyleri 72

1.GİRİŞ

Gıda hijyeni ilk aşamada, insan tüketimi için sağlık açısından kusursuz olarak sağlıklı hammadde kullanılarak üretimden tüketime kadar gıdaların hijyenik koşullara uygun ve güvenli olarak sağlanmasıdır. Gıda güvencesi insanların aktif ve sağlıklı yaşamlarını sürdürebilmeleri için kaliteli, güvenli, yeterli, ve besin değeri yüksek gıdalara ulaşabilmeleri olarak tanımlanmıştır (FAO, 2003).

Tavuk eti, proteince zengin, yağ miktarı düşük, çiğnenmesi kolay, ekonomik olduğu ve uygun bir doymamış yağ asidi kompozisyonu sergilemesi sebebiyle bol miktarda tüketilen en önemli protein kaynaklarından biridir. Türkiye'deki üretim miktarlarına baktığımızda gelişmiş ülkelerle neredeyse aynı olmasına rağmen, tüketim durumu üretimin aksine diğer ülkelerin yaklaşık yarısı kadardır (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. 2000-2010 Yılları Arasında Kanatlı Eti Üretim-Tüketim Miktarları (BESD-BİR, 2011).

Yıllar	**Piliç eti Üretimi**	**Toplam Kantlı Eti Üretimi**	**Üretim Artışı**	**Kişi Başına Tüketim**
	(ton)	**(ton)**	**(ton)**	**(kg/yıl)**
2000	662.096	752.382	14,68	11,05
2001	592.567	673.371	-10,50	9,60
2002	620.581	705.206	4,73	10,01
2003	768.012	853.345	21,01	11,94
2004	940.889	1.045.432	22,51	14,44
2005	978.400	1.084.780	3,76	14,53
2006	945.779	1.031.779	-4,89	13,81
2007	1.012.000	1.100.000	6,61	15,23
2008	1.170.000	1.262.000	14,73	16,94
2009	1.250.000	1.340.000	6,81	17,33
2010	1.430.000	1.520.000	13,01	19,13

Staphylococcus aureus'un antibiyotiklerin henüz keşfedilmediği dönemlerde çok ağır seyreden, tedavisi güç, ölümcül infeksiyonlara neden olduğu bildirilmiştir. O dönemlerden Günümüze kadar nozokomiyal patojenler arasındaki önemi giderek artmaktadır (Kutlu, 2006).

Ayrıca, başta penisilin olmak üzere birçok antibiyotiğe direnç kazanan, metisiline dirençli stafilokok suşları, 1960'dan bu yana tüm dünyada giderek artan oranda hastane infeksiyon etkeni haline gelmiştir (Koneman ve ark., 1993).

Türkiye'de son yıllarda yapılan çalışmalara göre hastane genelinde en sık izole edilen etken, %31'lere varan oranıyla *S. aureus*'tur. Hastane infeksiyonu olarak izole edilen *S. aureus* suşları arasında metisilin direnci (MRSA) % 90'lara varmaktadır (Ersoy ve ark., 2003).

S. aureus enterotoksin (SEs) üretme yeteneğine sahip çok yaygın bir mikroorganizma olup gıda kaynaklı hastalıkların ana nedenlerinden biri olarak kabul edilmiştir. ABD'de yıllık yaklaşık 185 bin, Stafilokokal gıda zehirlenmesi vakası rapor edilmiş ve bunlardan her yıl iki ölüm vakası tahmin edilmektedir. Ekonomik olarak yıllık 1.5 milyar dolar bu zehirlenme vakalarına harcanmıştır (Normanno ve ark., 2007a).

1.1. Tarihçe

Stafilokoklar ilk olarak 1878 yılında Robert Koch tarafından tanımlanmıştır. 1880 yılında ise Pasteur bu mikroorganizmaları sıvı besiyerinde üretmiştir. Bununla birlikte stafilokoklar 1880'de iskoçyalı bir cerrah olan Alexander Ogston tarafından insanlarda çeşitli piyojenik karakterlerdeki infeksiyonların etkeni olarak gösterilmiştir. Ogston 1882'de mikroskobik incelemede üzüm salkımı formundaki görüntülerinden dolayı bu mikroorganizmaları *Staphylococcus* (Yunanca, *staphyle*, üzüm salkımı; *Coccus*, tane anlamına gelmektedir) olarak isimlendirmiştir (Adams ve Moss, 2008).

Rosenbach, Ogston tarafından verilen *Staphylococcus* soy adını benimseyerek, 1884'de koloni pigmentasyonuna dayalı olarak iki stafilokok türünü tanımlamıştır. Sarı renkli kolonileri *Staphylococcus aureus*, beyaz renkli kolonileri ise *Staphylococcus albus* olarak isimlendirmiştir. *Staphylococcus albus* daha sonra *Staphylococcus epidermidis* olarak tanımlanmıştır (Todar, 2005; Bhatia ve Zahoor., 2007).

Stafilokokların gıda kaynaklı infeksiyonlardan sorumlu tutulması yüzyıllar öncesine dayanmaktadır. Barbar, 1914 yılında mastitisli bir hayvandan elde edilen *S. aureus* ile kontamine sütü tüketmesi sonucunda kendisinde gözlemlediği semptomlar doğrultusunda stafilokokların gıda kaynaklı intoksikasyon yapabileceğini ortaya koymuştur. Daha sonra, 1930 yılında Dack ve arkadaşları stafilokokal intoksikasyonların gıdada oluşturulan enterotoksinlerin alınması sonucunda meydana geldiğini belirtmişlerdir (Seo ve Bohach, 2007).

Evansn'ın glikozu anaerobik fermente edebilme yeteneklerini 1957 yılında belirledi. *S. aureus*, 1972'ye Kadar bilinen tek türdür ve *Staphylococcus epidermidis* ile arasındaki temel fark koagulaz üretimine dayanmaktadır. Üçüncü tür olan *S. saprophyticus* 1974'te stafilokoklara eklenmiştir. Tür sayısı 1980' de 13 ve 1984' ise 20 olmuştur. *S. intermedius* ve *S. hyicus* hariç yeni türlerin tamamı koagulaz negatiftir (Bergdoll, 1989).

1.2. Stafilokokların Klasifikasyonu ve Genel Özellikleri

Staphylococcus, ilk olarak *Micrococcaceae* familyası içerisinde ayrı bir soy olarak tanımlanmıştır. Daha önce yer aldığı *Micrococcaceae* familyası içinde *Micrococcus, Stomatococcus* ve *Planococcus* soyları bulunmaktadır. Yeni klasifikasyonda stafilokoklar *Staphylococcus* familyası içerisinde yer almaktadır. Gıda mikrobiyolojisi yönünden bu familya içerisinde yer alan en önemli patojen tür *S. aureus* olup doğada yaygın olarak bulunur. Bununla birlikte *S. intermedius* ve *S. hyicus* da enterotoksin oluşturma özelliklerinden dolayı gıda kaynaklı intoksikasyonlar açısından önemli türler olarak kabul edilmektedir (Erol, 2007). *Staphylococcaceae* familyası *Staphylococcus* soyu dışında, daha az bilinen *Gemella*, *Jeotgalicoccus*, *Macrococcu*s ve *Salinicoccus*

soylarını kapsamaktadır. *Staphylococcus* soyu içerisinde 20'den fazla stafilokok türü tanımlanmaktadır (Garrity ve ark., 2004).

Bu Gram pozitif bakteri hiç bir özel beslenmeye ve çevresel parametrlere gereksinim duymamakta, geniş bir sıcaklık derecelerinde (7˚C- 48.5˚Cve optimum olarak 30˚C-37˚C) ve pH (4.2- 9.3 optimum olarak 7- 7.5) ve tuz konsantrasyonu %15' den fazla bir ortamda üreme yeteneğie sahip olan bakteri türüdür (Bhatia ve Zahoor , 2007; Normanno ve ark., 2005). Bu özelliklerinden dolayı yaygın olarak insan ve hayvanlarda bulunarak tüm dünyada gıda kaynaklı hastalıklara neden olan bakterilerin üçüncü sırasında yer almaktadır ve fırsatçı bir patojen olan *S. aureus* insanlarda asemptomatik olarak taşınmaktadır (Normanno ve ark., 2005).

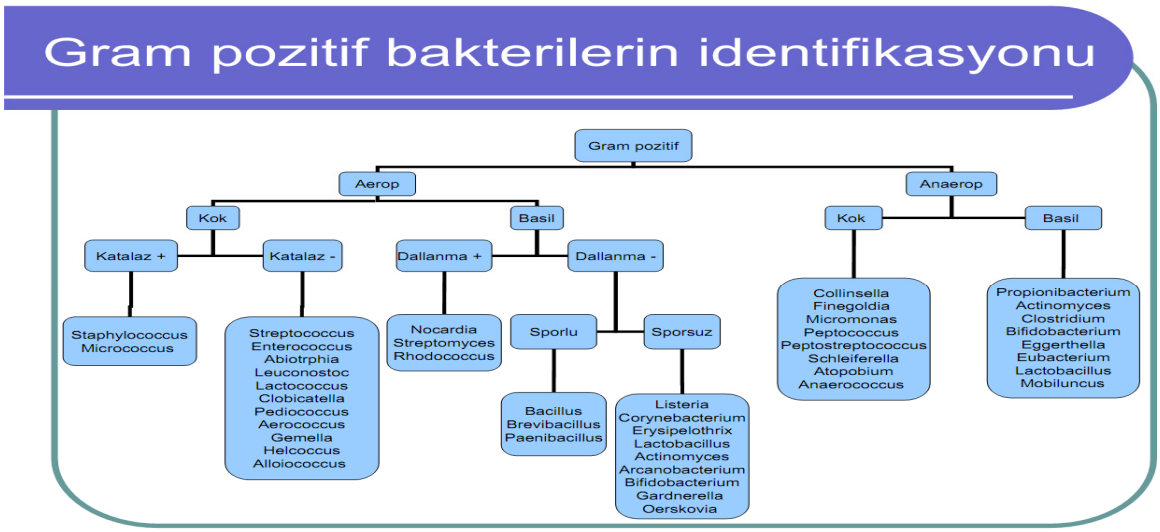
Morfolojik olarak benzer yapıda olan *Micrococcus* soyunun üyelerinden anaerobik olarak üremesi ve obligat aerobik mikrokoklardan farklı fernmentasyona sahip olamaları sebebiyle ayrılırlar. Hem Kimyasal ve biyokimyasal karakterleri açısından, hem de DNA guanin ve sitozin içerikleri ile hücre duvar yapısı bakımından iki soy birbirinden oldukça farklıdır (Baird-Parker, 1990). Stafilokokal DNA düşük oranda Guanin ve sitozin (G+C) içerir. G+C içeriği % 30-39 mol arasındadır. Bununla beraber *Micrococcus* soyu üyeleri % 68-74 mol arasında G+C içerirler (Bennermnan, 2003; Schleifer ve Kroppenstede, 1990).

S. aureus, Gram pozitif, hareketsiz, sporsuz, flagellasız, koagulaz pozitif, oksidaz negatif, katalaz pozitif, genellikle kapsülsüz, fakültatif anaerob, mannitolü aerob va anaerob koşullarda asit oluşturarak parçalayan, kanlı agarda Beta hemoliz yapma özelliğinde, novobiosine duyarlı ve mikroskobik incelemede üzüm salkımı formnunda gözlenen 0,5- 1,5µm çapında kok şeklinde bir bakteridir. Bu mikroorganizma aerob koşullarda iyi ürer (Bilgehan ve ark., 2000: Bremer ve ark., 2004; Todar, 2005). *S. aureus* koagulaz, termonükleaz, lesitinaz, katalaz ve hemolizine sahiptir. Hemoliz oluşturma özelliği değişken olarak *S. epidermidis* suşlarında da gözlenir. *S. aureus*'un diğer bir önemli kültürel karakteristiği ise altın sarısı renkteki koloni pigmentasyonudur (Bremer ve ark., 2004; Todar, 2005).

Stafilokoklarınn sınıflandırmasında koagulaz üretimi önemli biyokimyasal özelliklerdendir. Koagulaz pozitif olanlar *S. aureus, S. intermedius, S. hyicus, S. delphini*' ; koagulaz negatifler ise, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. auricularis*, *S. simulans*, *S. cohnii*, *S. cohnii subsp.1*, *S. cohnii subsp. 2*, *S. xylosus* ve *S. sciuri*'dir (Kloosw ve Wolfshohl, 1982; Duman, T., 2007; Jay, 1996). Stafilokoklar arasında koagulaz pozitif *S. aureus* ile iki koagulaz negativ *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* gıdalar için önemli olan grup ve insanlarda en sık infeksiyona neden olan stafilokoklardır (Winn ve ark., 2006; Jay, 1996).

Gram pozitif kok görünümünde olan streptokokların stafilokoklardan laboratuvarda ayrımındaki en önemli farkl, streptokokların katalaz enzimlerinin olmamasıdır (Koneman ve ark., 1992). Isıya dayanıklı TNase enzimi üretimi, genellikle gıda zehirlenmesine neden olan stafilokoklarda görülmektedir (Bergdol, 1989).

Koagulaz pozitif stafilokoklar içerisinde *S. aureus* gibi enterotoksin oluşturma özelliğinde olan ve gıda zehirlenmelerine neden olan patojen türlerinin yanı sıra *S. carnosus* ve *S. xylosus* gibi fermentasyon teknolojisinde (ör: sucuk üretimi) starter kültür olarak kullanılan türler de bulunmaktadır. Starter kültür özelliğindeki stafilokokların katalaz enzimi ile peroksit oluşturan mikroorganizmalar tarafından meydana getirilen H_2O_2 parçalanır ve bu şekilde et ürünlerinin acılaşması önlenir ya da geciktirilir. Ayrıca bu mikroorganizmalar sahip oldukları nitrataz enzimleri ile nitratı parçalayarak, renk oluşumu ve stabilitesini sağlarlar (Erol, 2007; Jay ve ark., 2005). İnsan kaynaklı *S. aureus* suşları, halk salığı açısından en etkili ve en tehlikeli suşlar olarak kabul edilmiştir (R.Capita ve ark., 2001).



Şekil 1.1. Gram pozitif bakterilerin identifikasyon şeması (Dizbay, M., 2012).

Stafilokok suşlarının %90'dan fazlası penisilinlerin çoğunu yıkan bir enzim olan, β-laktamaz'i kodlayan plazmidler içerirler. Bazı *S. aureus* suşları hücre zarlarındaki penisilini bağlayan proteinlerdeki değişiklikler nedeniyle, metisilin ve nafsilin gibi β-laktamaza dirençli penisilinlere de dirençlidirler. Bu suşlar genellikle metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) veya nafsiline dirençli *S. aureus* (NRSA) olarak bilinir (Levinson ve Jawetz., 2003).

Çizelge 1.2. Bazı Stafilokok Türlerinin Genel Özellikleri (Seo ve Bohach, 2007).

Özellikler	*S. aureus*	*S. chromogenes*	*S. hyicus*	*S. intermedius*	*S. epidermidis*
Koagulaz	+	-	+	+	-
Termostabil nükleaz	+	-	+	+	+/-
Clumping factor	+	-	-	+	-
Pigmentasyon	+	+	-	-	-
Hemoliz	+	-	-	+	+/-
Fosfataz	+	+	+	+	+/-
Lizostafin	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Az duyarlı
Hyaloronidaz	+	-	+	-	+/-
Mannitol fermentasyonu	+	+/-	-	+/-	-
Novobiosin direnci	-	-	-	-	-

1.3. Stafilokokların Biyokimyasal Özellikleri

Staphylococcus'lar glikoz, laktoz, maltoz, sukroz, trehaloz ve mannitolden aerobik ve anaerobik koşullarda gaz oluşturmaksızın asit meydana getirirler. Çoğumlukla laktik asit oluşturur. Mannitol fermentasyonu *S. aureus* için ayırt edici bir özelliktir ve bir çok karbohidratı enerji kaynağı olarak kullanabilir. Aerobik glikoz kullanımı sonucu karbondioksit ve asetat oluşturur (Bilgehan, 1990; Bremer ve ark., 2004; Todar, 2005; Bilgehan, 2002). Arabinoz, sellobioz, inositol, raffinozdan asit oluşturmazlar. Nişasta ve eskulini hidroliz etmezler. Hipurat ve arjinini hidroliz ederler. Nitratları nitrite indirgerler. Metil Red (MR) testi genellikle pozitif olup, Voges-Proskauer (VP) testi değişkendir. İndol ve H_2S oluşturmazlar. Aerobik üremeleri için aminoasitlere (adenin-tiamin) ve vitaminlere (B gurubu), anaerobik üremeleri için ise urasil, piruvat ve fermente olabilen karbon kaynaklarına ihtiyaç duyarlar. %40 safra bulunan ortamda da üreyebilirler (Ersoy ve ark., 2003). *S. aureus*'un ayırt edici özellikleri çizelge 1.3 ve 1.4'de belirtilmiştir.

Çizelge1.3. *S. aureus*, *S. epidermidis*, ve mikrokokların biokimyasal karakterleri

Biyokimyasal Test	***S. aureus***	***S. epidermidis***	**Micrococci**
Katalaz aktivitesi	+	+	+
Koagülaz üretimi	+	-	-
Termonükleaz üretimi	+	-	-
Glikozun anaerobik kullanımı	+	+	-
Mannitolün anaerobik kullanımı	+	-	-
Lysostafin duyarlılık	+	+	-

Kanlı agarda değişik tipte (α, β, γ, δ, ε) hemolizli koloniler oluştururlar. Hemoliz kültürlerin CO_2'li ortamda inkübe edilmeleri halinde daha belirgindir. 60°C' lik ısıya 30 dakika dayanabilirler. γ-radyasyonuna oldukça dirençlidirler. Proteaz, lipaz ve esteraz enzimleri vardır. (Ersoy ve ark., 2003). *S. saprophyticus, S. cohnii, S. xylosus* novobiyosine dirençli suşlardır. *S. aureus* mannitol ve trehalozdan asit oluşturması ile *S. epidermidis*' ten, novobiyosin'e duyarlı olması ile de *S. saprophyticus*' tan ayrılabilir. *S. epidermidis* trehalozdan asit oluşturmaması ve novobiosine duyarlı olması ile *S. saprophyticus*' tan ayrılabilir. *S. epidermidis*' te hücre duvarında ribitol negatif iken, glycerol pozitiftir. *S. saprophyticus*' ta ise ribitol pozitif, protein A negatiftir.

Çizelge 1.4. *Staphylococcus*' ların biyokimyasal özellikleri

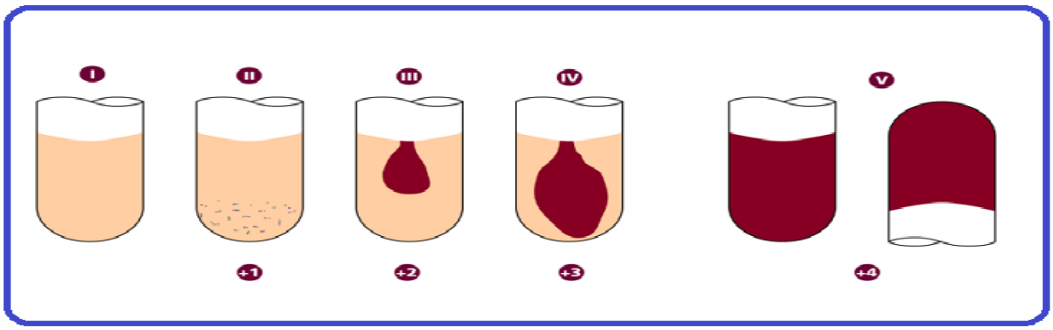
Özellikler:	***S. aureus***	***S. epidermidis***	***S. capitis***	***S. warneri***	***S. heamolyticus***	***S. hominis***	***S. auricularis***	***S. saprophyticus***	***S. hyicus***	***S. simulans***	***S. intermedius***
Pigment	**+/w**	**-**	**-**	d	d	ND	**-**	d	**-**	**-**	**-**
Aerop üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Anaerop üreme	+	+	(+)	+	(+)	**-**/ w	**-**/ w	(+)	+	+	(+)
%10NaCl'de üreme	+	w	+	+	+	w	+	+	+	+	+
%15 NaCl'de üreme	w	-	-/w	w	d	-	w	d	-w	w	d
Aseton oluşturma	+	+	d	+	d	d	d	+	**-**	w	**-**
Sukroz	+	+	(+)	+	+	(+)	d	+	+	+	+
Maltoz	+	+	**-**	(+)	+	+	(+)	+	-	w	w
D-Mannitol	+	-	+	d	d	-	-	d	-	+	d
D-Mannoz	+	(+)	+	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	+	d	+
D-Trehaloz	+	-	-	+	+	d	(+)	+	+	d	+
α-laktoz	+	ND	-	d	d	d	-	d	+	+	d
Hyaluronidaz	+/w	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND
Üreaz	+	+	-	+	-	+	-	+	d	+	+
Koagulaz	+	-	-	-	-	-	-	-	d	-	+
Hemoliz	+	-/ w	-/ w	d	(+)	-/ w	-	-	-	-/ w	d
DNase	+	-/ w	w	d	d	-/ w	-/ w	-	+	w	+
Termonükleaz	+	-/ w	-	-	-	-	-	-	d	-/w	+
Novobiosin direnç	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**+**	**-**	**-**	**-**
15˚C'de üreme	+	-w	-	d	-w	-w	-	+	+	+	+
45˚C'de üreme	+	-	-	-	+	+	-	d	-w	+	+
L-Arabinoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Cellobiose	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
Raffinoz	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
Salicine	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
D-Galaktoz	+	ND	-	d	d	d	-	-	+	-w	+
B-D-Fruktoz	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+
D-Riboz	+	ND	-	d	D	-	-	-	+	ND	d
Nitrat Redüksiyon	+	+w	d	-w	D	d	d	-	+	w	+
Alkalin Fosfataz	+	+	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	+	**w**	+
Arjinin Dehidrolaz	**+/w**	**+w**	**d**	**d**	+	**d**	**d**	**-w**	+	+	**-**
Clumping Faktör	+	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	d
Fibrinolizin	d	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	d	ND	-

+ : %90 pozitif - : %90 negatif +w : Zayıf reaksiyon pozitif d : %11-89 pozitif
w : Zayıf reaksiyon -w : Zayıf reaksiyon negatif ND : Hakkında bilgiler net değil

1.4. Stafilokokal Enzimler

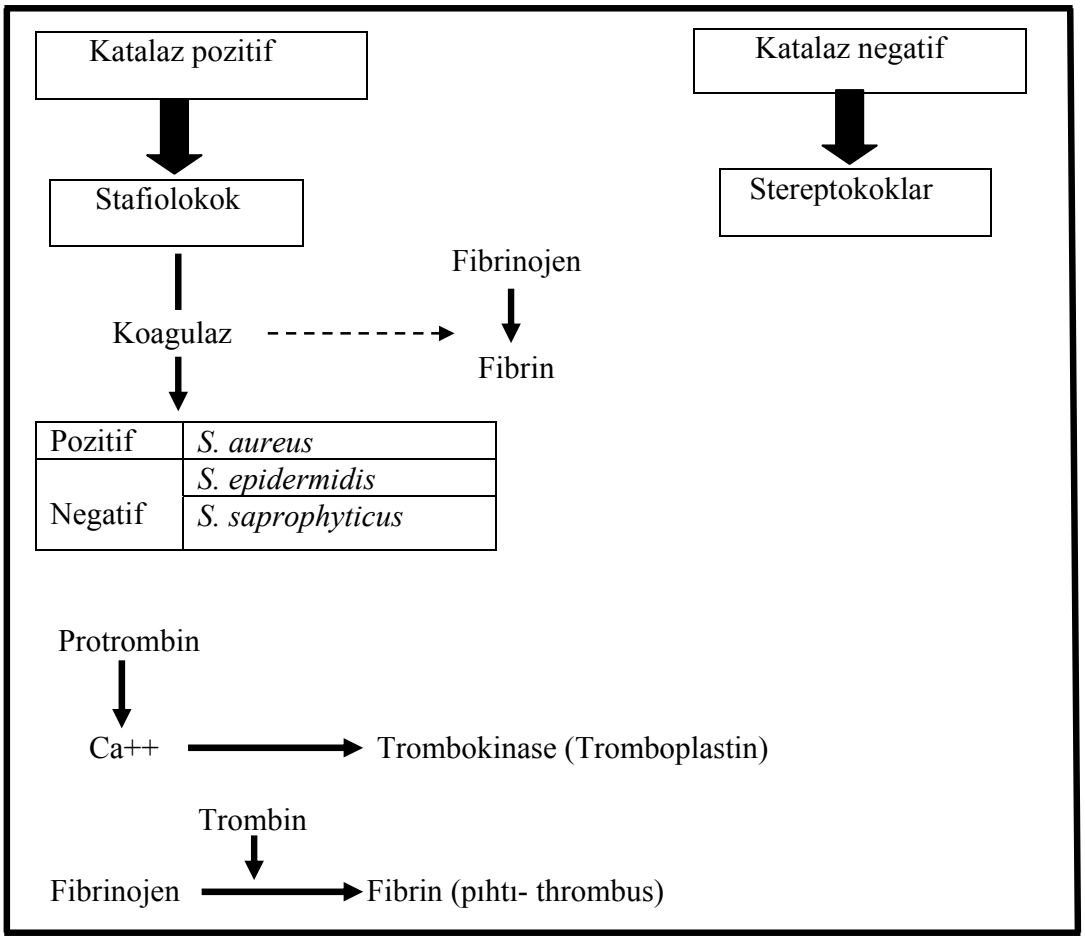
1.4.1. Koagulaz: Ekstrasellüler bir proenzimdir. Koagulaz reaktif faktör ile birleşerek aktif duruma geçer ve plazmayı pıhtılaştırır. *S. aureus*'un diğer stafilokoklardan ayrımını sağlar. Filtrelerden geçebilen, ısıya dirençli bir enzimdir. Stafilotrombin olarakda bilinen koagulaz, konakçının protrombinine bağlanarak fibrinojenin fibrine dönüşmesini sağlayan hücre dışı bir proteindir. Konakçı savunmasına karşı bakteriyi korumaktadır (Foster, 2003; Todar, 2005).

S. aureus suşları bağlı (clumping faktör olarak da bilinmektedir) ve serbest olmak üzere iki formda kuagulaza sahiptirler. Stafilokokal hücre duvarındaki bağlı koagulaz, direkt olarak fibrinojeni çözünmeyen fibrine çevirir ve stafilokokların kümelenmesine neden olur (Winn ve ark., 2006; Murray ve ark., 2002). Serbest koagulaz ise globulin plazma faktör ile reaksiyona girerek, fibrinojeni çözünmeyen fibrine dönüştürür ve stafilotrombin formunu oluşturur. Serbest koagulaz enzimin etkisini gösterebilmesi için trombine benzeyen ve bütün hayvanların plazmasında bulunmayan bir faktöre, CRF'ye (Coagulase Reaction Factor) ihtiyaç vardır. Serbest koagulaz termolabil ve ekstraselüler bir enzim olmasına rağmen, bağlı koagulaz termostabil ve hücre duvarının yüzeyine lokalize şekilde bulunmaktadır (Rao, 2006). Bu faktörlerin enzimatik aktivitesi sayesinde bakteri fibrinle kaplanarak, opsonizasyon ve fagositoza daha dirençli hale gelir (Winn ve ark., 2006; Murray ve ark., 2002).



Şekil 1.2. *S. aureus*'un tüpte aglütinasyonunun oluşumu

Serbest koagulaz protein yapısındadır ve proteolitik enzimlerle kolaylıkla inaktive edilir. Bağlı koagulaz ise stafilokokların kümeleşmelerini sağlar. Bu özelliklere sahip olan stafilokoklar, girdikleri organizmada fibrin bir zırh ile kaplanarak fagositoza karşı korunmalarının yanı sıra serumun bakterisit etkisini önlediklerinden dolayı patojenite kazanmış olurlar. Koagulaz sadece *S. aureus*'a özgü bir enzim olmayıp, *S. intermedius* ve *S. hyicus* tarafından da üretilmektedir (Rao, 2006).



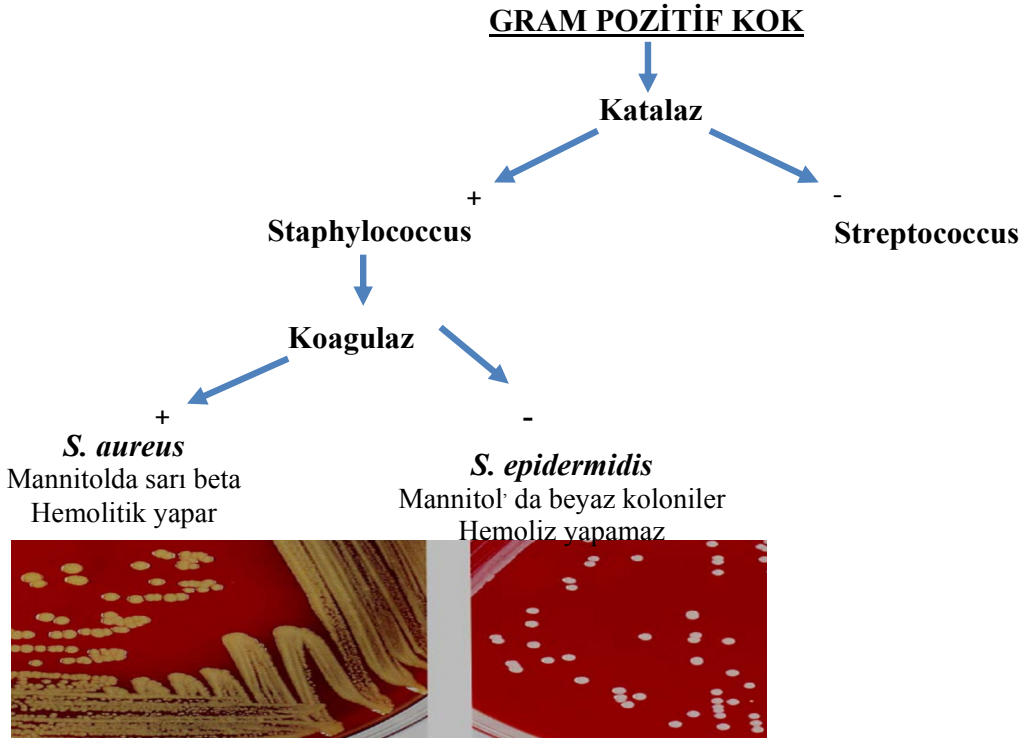
Şekil 1.3. Koagulaz pozitif stafilokoklarda pıhtı oluşumu

1.4.2. Lesitinaz: *S. aureus* lesitinaz pozitiftir. Telluriti telluriuma indirger. Tipik *S. aureus* suşları yumurta sarısı ve telluriti içeren katı besiyerinde (Baird-Parker; BP agar) üreme esnasında telluriti indirgeyerek gri-siyah renkte parlak koloniler oluştururlar.

Lesitinaz aktivitesi sonucunda bu koloniler etrafında berrak bir zon meydana gelir (Bennet ve Lancette, 1998; Adams ve Moss, 2008). Koagulaz negative olan *S. epidermidis* suşları lesitinaz aktivitesi olmadığından zonsuz siyah koloniler oluştururlar.

1.4.3. Stafilokinaz: Aynı zamanda 'Fibrinolizin' olarak da isimlendirilir. Isıya dirençlidir. Plazminojeni plazmine çevirir. Hemen hemen tüm *S. aureus* türlerince üretilen fibrinolizin, fibrin kılıfını eriterek infeksiyona yayılımını kolaylaştırır (Winn ve ark., 2006; Murray ve ark., 2002; Foster, 2003).

1.4.4. Katalaz: Bütün stafilokoklar miyeloperoksidaz sistemi tarafından düzenlenen hidrojen peroksid (H_2O_2)'i su ve oksijene dönüşümünü katalize eden katalaz enzimi üretirler. H_2O_2 bakteriyel metabolizma sırasında veya fagositoz sırasında birikebilir (Winn ve ark., 2006; Murray ve ark., 2002). Stafilokokların stereptokoklardan ayrımında kullanılır. Bakteriler bu enzim sayesinde fagositlerin içinde toksik oksijen radikalleri tarafından öldürülmeye karşı direnç kazanır. Ayrıca nötrofiller tarafından salgılanan H_2O_2'i $H_2O + 1/2\ O_2$' ye yıkımlanarak nötrofillerin öldürme yeteneğini azaltır.



Şekil 1.4. Katalaz testi ile stafilokokların ayrımı

1.4.5. Hyaluronidaz: Kronik furunkulozise neden olan *S. aureus* suşları tarafından üretilir (Foster, 2003). Hyaluronik asiti hidrolize ederek infeksiyonun yayılımını kolaylaştırır. Bu enzim "yayılma faktörü" olarak da bilinir. *S. aureus*'un dokuda yayılımını kolaylaştırır. *S. aureus,* suşlarının %90' dan fazlası bu enzimi üretirler (Winn ve ark., 2006; Murray ve ark., 2002; Schleifer ve ark., 1984).

1.4.6. Lipaz: *Sphylococcus*'ların tüm suşları ve KNS'lerin % 30'dan fazlası birkaç farklı lipaz üretirler. Bu enzim lipidleri hidrolize ederek vücutta yağdan zengin deri bölgelerinde bulunan stafilokokların canlılığını devam ettirmesini ve yüzeysel dokulara invaze olarak fronkül ve karbonkül gibi infeksiyonları oluşumasına yardımcı olan bir faktördür (Winn ve ark., 2006; Murray ve ark., 2002., Waldvogel ve ark., 2000).

1.4.7. Deoksiribonükleaz (DNase): *S. aureus*'ların % 90-96'sında bulunan ısıya dirençli bir fosfodiesterazdır. Termostabil nükleaz, *S. aureus*'un diğer stafilokoklardan ayırt edilmesinde kullanılan diğer bir faktördür. DNase enzimleri endo ve ekzonükleaz aktivitesine sahip, nükleik asitleri 3'-fosfomononükleotidlere parçalayan fosfodiesterazlardır. (Murray ve ark., 2002).

1.4.8. Penisilinaz (β-Laktamaz): Beta-laktamaz bazı Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen enzimdir. Bu enzim penisilin gurubu antibiyotiklerdeki β-laktam halkasının hidroksil gurubunu parçalayarak antibiyotik etkisiz hale getirilir. Bunun sonucunda bakteriler hücre duvarı sentezini inhibe eden β-laktam gurubu antibiyotiklere karşı dirençli hale gelirler. Bu enzimin salgılanmasını sağlayan genler, plasmid ve transpozonlarla aktarılır (Bilgehan, 2009).

1.5. *Staphylococcus*'ların Virulans Faktörleri

S. aureus virulensi en yüksek olan stafilokok türüdür. Stafilokokların virulensinde rol oynayan faktörler hücre duvarı yapıları, kapsül, yüzey proteinleri, toksinleri ve enzimleridir. *S. aureus* suşları, etkenin konakçı hücrelerinde kolonize olmasına katkı da bulunan hemolizinler, nükleazlar, proteazlar, lipazlar, hyaluronidaz ve kolajenaz enzimlerini ve sitotoksinleri üretebilirler. Bu komponentlerin ana görevi, lokal konakçı

dokularını mikroorganizmanın üreyebilmesi için uygun hale getirmektir (Dinges ve ark., 2000).

Ayrıca Stafilokoklar protein A, mikrokapsül, bağlı koagualaz gibi yüzeylerine bağlı; toksinler, serbest koagulaz, lökosidinler gibi hücre dışına salgılanan virulens faktörlerine sahiptirler (Foster 2003).

1.5.1. *S. aureus*'da Hücre yapısı ve Hücre duvarı (peptidoglikan yapısı)

Bakteri genomu profajlar, plazmidler ve 2800 baz çiftli sirküler bir kromozomdan oluşur. Antibiyotik direnci ve bakteri virulensinden sorumlu olan genler bu kromozom veya ekstrakromozomal yapılar üzerinde bulunabilirler (Lowy, FD 1998).

Hücre duvarı Peptidoglikan- Teikoik asit kompleksi ve Protein-A (SpA) temel elemanlarını taşır. Peptidoglikan, hücre duvarının esas yapısını oluşturur, mikroorganizmaya şeklini verir ve dayanıklılığını sağlar. Lökosit güçünü sağlayıp, fagositozu önler. Yapısının temel taşı glikan zincirleridir. 1,4-β glikozid bağlarıyla bağlanan N-asetil glukozamin ve N-asetil muramik asit birimlerinin sıralanmaları ile oluşan disakkarit glikan zincirlerinden oluşmaktadır. Peptidoglikan zincirleri birbirlerine oligoglisin köprüleri ile bağlanmıştır (Lowy 1998).

Stafilokoklar için vücudun önemli savunma mekanizmalarından biri olan lizozim enziminin hedefi, hücre duvarındaki peptidoglikan tabakasıdır. Bu tabakayı oluşturan pentaglisin köprülerinin lizostafin enzimine özgül bir duyarlılık paterni olduğu için, bu enzim stafilokok gruplarını tanımlamak amacıyla da kullanılmaktadır (Waldvogel ve ark., 2000).

1.5.2. Yüzey proteinleri

Protein A, elastin, kollajen, fibronektin bağlayan proteinler ve "clumping factor" kimyasal yapıları benzeyen stafilokok yüzey proteinleridir. Bu proteinler stafilokokların konak dokularında kolonize olmasında en önemli faktörlerdir (Win ve ark., 2006; Murray ve ark., 2002).

1.5.3. Lökosidinler

S. aureus tarafından oluşturulan bu toksin spesifik olarak polimorfonükleer hücreleri etkilemektedir. "Panton- Valentine"toksin olarak da bilinir. Stafilokokal infeksiyonlarına karşı konakçı savunması için önemli bir mekanizma olan fagositoza engel olmaktadır (Hirsh ve ark., 2004). *S. aureus*'un virulens faktörleri ve bu faktörlerin patogenetik mekanizmaları çizelge 1.6'da gösterilmiştir.

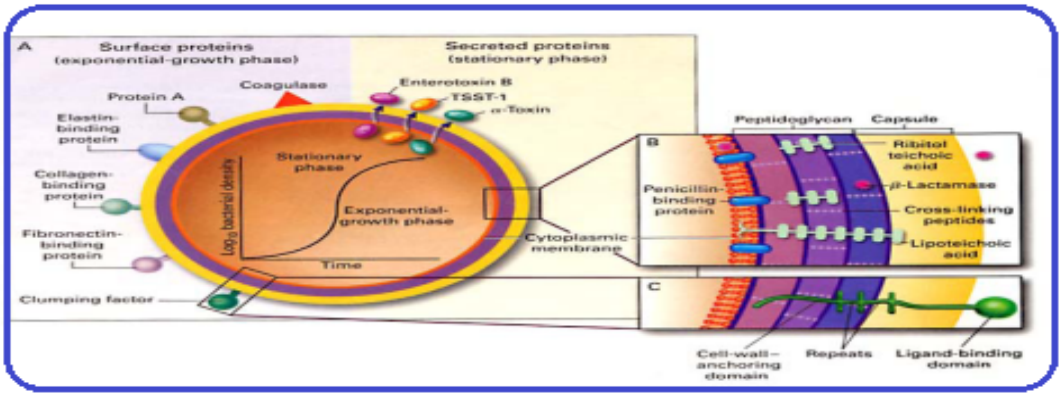
1.5.4. Teikoik asit

S. aureus hücre duvarının diğer önemli bileşeni olan teikoik asit fosfodiester bağlarıyla bağlı ribitol veya gliserol birimlerinden oluşan ve suda çözünebilen bir polimerdir. Stafilokoklarda her iki tür teikoik asitde bulunur (Ribitol teikoik asit ve gliserol teikoik asit). Sadece Gram (+) bakterilerin hücre duvarında bulunan bu yapı hücre yüzerine negatif yük vererek çeşitli metal iyonlarının, katyonların lokalizasyonunda ve otolitik enzimlerin aktivasyonunda rol oynamaktadır (Wilkinson, 1997). Stafilokokal hücre duvarları Lizozim'e karşı dirençli, lizostafin'e ise duyarlıdır (Bhatia ve Zahoor., 2007). Teikoik asitlerin bir kısmı peptidoglikan yapıya N-asetilmüramikasitin C6 hidroksil gurubuna kovalent bağlarla bağlıdır ve "duvar teikoik asitleri" adını alırlar. Bir kısm ise hücre membranında bulunan lipitlerle kovalent bağlar yapmıştırlar. Bunlarda "membran teikoik asitleri" olarak adlandırılır. Teikoik asitler Stafilokokların türe özgü antijenleridir. Ribitol teikoik asit *S. aureus*' a özgüdür (Kingsbury ve Wagner., 1992). Kalınlığı, bakteri türüne göre değişmekle birlikte 19-12 nm arasındadır. Hücre duvarının teikoik asitleri *S. aureus*'ta N-asetil glokozamin ribitol fosfat üniti iken *S. epidermidis*' te poligliserol fosfattır (Winn ve ark., 2006). Teikoik asitler hücre duvarını stabilize eder, hücre membrane ile hücre duvarının bütünlüğünü sağlar.

1.5.5. Protein A

Bu protein peptidoglikan tabakaya kovalan olarak bağlıdır. En önemli özelliği bazı immunglobulinlerin (IgG_1, IgG_2, $IgG_{4)}$ Fc reseptörleri ile birleşebilmesidir. Bu nedenle üreme sırasında ortama salınan serbest protein A, immünglobulinlerin Fc reseptörlerine bağlanarak antikora bağlı fagositozdan bakterinin zarar görmesini engeller. SpA

yüzeyseldir ve hemen kapsülün altında, hücre duvarında yer alırlar (Levinson ve ark., 2000). Molekül ağırlığı 13 kDa kadar olan SpA'nın antifagositik, kemotaktik ve mitojenik özellikleri vardır. (Murray ve ark., 2002).



Şekil. 1.5. *Staphylococcus aureus*'un yapısı

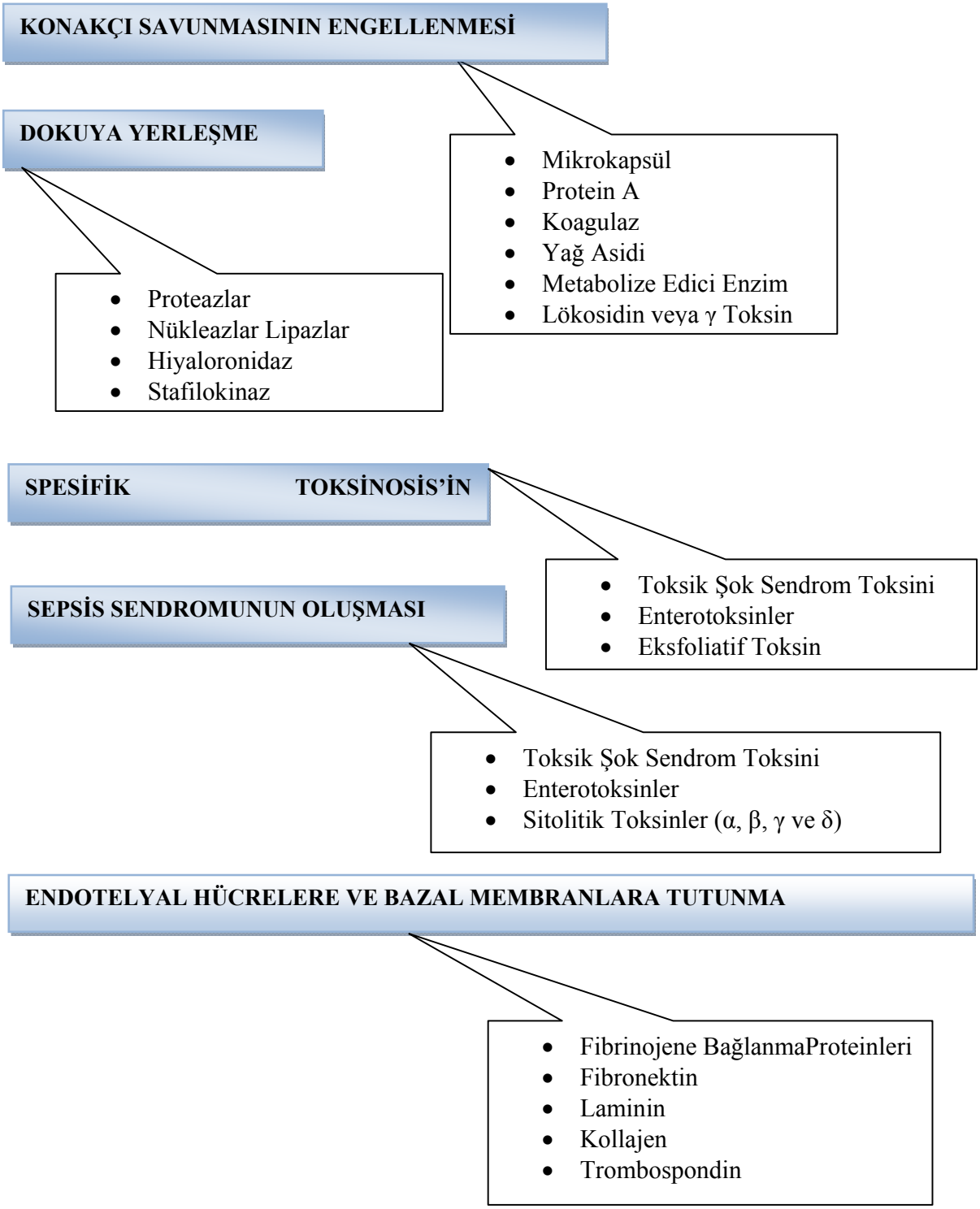
1.5.6. Mikrokapsül

Bazı bakterilerde hücre duvarının etrafında polisakkarit yapıda kapsül bulunmaktadır. Stafilokoklarda diğer bakterilerdekine benzer ışık mikroskobu ile görülebilen bir kapsül yoktur. Ancak antikorlarla işaretlendikten sonra elektron mikroskobu ile görülebilen mikrokapsül vardır. Mikrokapsülün fonksiyonu tam olarak belirlenmemiştir. Hücre dışı ortamda ve komplementin yokluğunda fagositozu engelleyebildiği bildirilmiştir (Foster 2003).

Çizelge 1.5. *S. aureus* hücre duvarı özellikleri

Özellikler	***Staphylococcus aureus***
Hücre duvarı (Ribitol)	+
Hücre duvarı (Gliserol)	-
Hücre duvarı (Protein-A)	+
Hücre duvarı (Alfa toksin)	+

Çizelge 1.6. *S. aureus* virulens faktörleri ve bu faktörlerin patogenetik mekanizmaları (Gordon, 1998).



1.6. *S. aureus*'un Gelişimini ve Enterotoksin Oluşumunu Etkileyen Faktörler

1.6.1. Ekstraselüler Faktörler

S. aureus, diğer mikroorganizmalar gibi gelişmek için uygun sıcaklık dereceleri, besin maddeleri, nem, PH ve zaman gibi parametrelere gereksinim duymaktadr. Bu mikroorganizmanın gelişimi için tiamin ve nikotinik asit gibi B-grubu vitaminlerin yanı sıra kullanılan bir çok aminoaside de (valin, sistin, arginin, fenilalanin) gereksinim duyulmaktadır. Bu maddelerin azalması veya yokluğu bakterinin gelişmesini baskılayan faktörler arasındadır (Bremer ve ark., 2004; Todar, 2005: Anon, 2001: Jay ve ark., 2005).

S. aureus, gıdalarda başlangıçtaki sayısı yüksek olmadığı durumlarda iyi gelişemez çünkü rekabetçi özelliği zayıf bir bakteri olup, gıdalardaki yarışmacı mikrofloraya oldukça duyarlıdır. Bu mikroorganizmanın fermente gıdalarda laktik asit bakterileri tarafından üretilen laktik asit, hidrojen peroksit ve bakteriyosinler *S. aureus*'un gelişimini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu nedenle, uygulanan değişik işlemler ile normal florası inhibe edilen gıdalar stafilokokal intoksikasyonlar açısından büyük risk taşımakradır Bu kapsamda peynir üretiminde starter kültür kullanılmasına önem verilmelidir (Anon, 2002; Le Loir ve ark., 2003; Bremer ve ark., 2004; Erol, 2007).

Bu çerçevede öncelikle *Enterococcus*, *Lactococcus* ve *Leuconostoc* önemli baskılayıcı bakteriler olarak değerlendirilir. Yine Gram negatif mikroorganizmalardan *E. coli*, *Pseudomonas*, *serratia*, *Aeromonas* ve *Aerobacter*, *S. aureus*'un gelişimi üzerine baskılayıcı etki gösterir. Bu nedenle uygulanan değişik işlemler ile normal florası inhibe edilen gıdalar stafilokokal intoksikasyonlar açısından büyük risk taşımaktadır (Anon, 2002; Erol2007; Le Loir ve ark., 2003; Bremer ve ark., 2004).

1.6.1.1. Sıcaklık

S. aureus hücreleri, ısıya enterotoksinlerden çok daha duyarlı olup, ısı uygulaması ile bu hücrelerin çoğu inaktive edilmektedir. Genellikle 6.7-47.8 ˚C'ler arasında, optimal 35-37 ˚C arasında üreme göstermekle birlikte, 10-46 ˚C'ler arasında enterotoksin oluşturur. Toksin oluşumu için optimal sıcaklık 40-45˚C'ler arası olup, 25-30 ˚C'de de toksin oluşturabildiği saptanmıştır. (Jay ve ark., 2005; Adams ve Moss., 2008). Uygulanan ısı işleminin 60-70 ˚C olması durumunda desimal redüksiyon zamanı (decimal reduction time; D-değeri) 41.2-3.5 saniye, Z değeri ise 6.5 ˚C dir. Buna karşın *S. aureus,* dondurma ve donmuş muhafazaya (-20 ˚C) dayanıklıdır.

1.6.1.2. pH değeri

Stafilokoklar için optimal pH değeri 6.0-7.1 olmakla birlikte, suşların çoğu 4.4-10 arsındaki pH değerlerinde üreyebilmektedir. Enterotoksin üretiminin aerobik ortamda anaerobik ortama göre daha kısa bir sürede gerçekleştiği belirtilmektedir (Anon, 2001; Le Loir ve ark., 2003; Erol, 2007: Jay ve ark., 2005; Adams ve Moss., 2008).

Çizelge 1.7. *S. aureus*' un üremesi ve toksin Oluşturması için genel koşullar

	Üreme		Toksin oluşturma	
	Optimum	Spektrum	Optimum	Spektrum
Sıcaklık(˚C)	37	6.7-47.8	40-45	10-47.8
pH	6.7	4-10	6-7	4.5-9.8
a_w	0.98	0.83-0.99	0.98	0.86-> 0.99
% NaCl	0	0-20	0	0-10
Atmosfer	Aerob	Aerob-anaerob	Aerob	Aerob-anaerob

1.6.1.3. Su aktivitesi (a_w değeri) ve Tuz miktarı

S. aureus'un gelişimi tuz konsantrasyonu, sıcaklık, pH, eH ve a_w gibi faktörlere bağlıdır. Ortamdaki tuz miktarının % 7-10 olduğu durumlarda üreyebilmektedir. Hatta bazı suşları % 20'ye kadar tuz içeren ortamlarda bile üreme özelliği gösterebilmektedir. En çok %10 tuz konsatrasyonunda toksin oluşturabilmektedir. Genellikle gelişebildiği ve toksin oluşturabildiği minimal a_w değerleri sırasıyla 0.83 ve 0.86 olarak bildirilmektedir. Ayrıca ozmotolerant özellikte olan *S. aureus,* düşük a_w değerlerinde üreyebilen en önemli patojen bakterilerden biridir. *S. aureus,* sporsuz patojen bakteriler içerisinde özellikle kuru çevresel koşullarda uzun süre canlı kalabilme özelliğine sahiptir (Adams ve Moss., 2008 ; Erol, 2007).

S. aureus % 10 NaCl içeren ve pH 5.4 olan ortamda toksin oluştururken, NaCl düzeyi %12 olduğunda toksin oluşturamadığı gözlenmiştir. *S. aureus*'un gelişmesinin pH 4.8 ve % 5 NaCl içeren sıvı besiyerlerinde inhibe olduğu tespit edilmiştir. % 10 NaCl içeren ve pH'sı 6.9 olan bir ortamda enterotoksin B'yi oluşturduğu, ancak % 4 NaCl içeren ve pH'nın 5.1 olduğu bir ortamda ise oluşturamadığı bulunmuştur. Genel olarak, ortamdaki tuz konsantrasyonu arttığında gelişmesi için gerekli olan minimum pH değerinin yükseldiği ifade edilmektedir (Le Loir ve ark., 2003; Jay ve ark., 2005).

Qi ve Miller, düşük su aktivitesi değerine sahip besi yerine prolin ilave edilmesiyle SEB oluşumunun stimüle edildiğini ancak glisin, betain ve karnitin ilavelerinde bu etkenin görülmediğini bildirmişlerdir. Demir, inorganik fosfat, karbondioksit veya bikarbonat içeren besiyerleri seconder metabolitlerin oluşumunu artırmaktadır. Magnezyumun SEC, demirin ise SEB oluşumunu yüksek düzeyde etkilediği bildirilmiştir. Belay ve Rasooly, anaerobik koşulların S. *aureus*'un gelişimi ve SEA oluşumu üzerine etkilerini araştırdıkları bir çalışmada, stafilokokal hücre yoğunluğunun aerobik koşullarda anaerobik koşullara göre 9-17 kat daha fazla olduğunu bulunmuş ve SE oluşumunun gelişmeye bağlı olduğunu gösterilmiştir. Anaerobik ortamda yavaş gelişme az toksin oluşumuna neden olurken, her iki koşulda da SEA inkubasyonun 120 dakikasından sonra belirlenebilmiştir (Baley ve Rasooly, 2002).

Yine Qi ve Miller'in düşük a_w değerinin SEA ve SEB biyosentezi üzerine etkisini araştırdıkları bir çalışmada, SEB oluşumunun düşük a_w değerine SEA oluşumundan daha duyarlı olduğunu ortaya koymuşlardır (Qi ve Miller, 2000).

Laktobasiller tarafından üretilen veya gıdalara ilave edilen hidrojen peroksit *S. aureus*'un üremesini inhibe etmektedir. Başka bir çalışmada *S. aureus*'un üremesi üzerine özellikle laktik asit olmak üzere sitrik asit, asetik asit, pirüvik asit ve propiyonik asitin inhibe ettiği saptanmıştır.

1.6.2. İntraselüler faktörler

SEA, hücrenin logaritmik fazın ilk döneminde, SEB, SEC ve SED ise geç logaritmik faz veya erken duraklama fazında oluşturulur (Erol ve İşeri, 2004).

Enterotoksin, makrofaj ve yardımcı T hücrelerinden, sırasıyla büyük miktarda interlökin-1 (IL-1) ve interlökin-2 (IL-2) salınmasını uyarmak üzere sindirim kanalında bir süper antijen olarak davranır. Isıya dayanıklı olduğu için genellikle kısa süreli pişirmede tahrip olmaz. Kusma ve kansız ishale sebep olur (Levinson ve Jawetz., 2003).

Bütün SE'lerin % 32-82 düzeyinde nükleotid ve % 21-82 düzeyinde amino asit sekans benzerliğine sahip oldukları bildirilmiştir. Buna göre SEA, SEE ve SED % 52-83 düzeyinde amino asit benzerliğinden dolayı bir gurup oluştururken, SEB ve SEC % 62-64 düzeyindeki amino asit benzerliği ile başka bir grup oluşturmaktadır (Munson ve ark., 1998; Zhang ve ark., 1998).

1.7. Stafilokokal Enterotoksinler (SE) ve Genel özellikleri

S. aureus tarafından oluşturulan toksinler sindirim sisteminde etkisini gösterdiği için bunlara "enterotoksin" denilmiştir. *Staphylococcus aureus* değişik türde toksinler üretmektedir. Bunlar stafilokokal enterotoksinler olarak alfabetik sıralamaya göre: SEA-SEB- SEC (SEC1- SEC2- SEC3)-SED-SEE- SEG → SEI → SER-SET şeklinde tanımlanmaktadır. Bu grupta yer alan enterotoksinler kusma etkeni olarak kanıtlanmıştır. Başka bir grup ise Stafilokoklal enterotoksin benzeri protein (SE*l*) olarak (SE*l*J, SE*l*K,

Se*l*M→SE*l*P, SE*l*U, SE*l*U2, ve SE*l*V) sınıflandırılmaktadır. Bütütn *S. aureus* suşlarının % 30-50'si bu toksinleri üretmektedir (Murray ve ark., 2002; Angeles ve ark., 2010).

SE'ler çok değişik türde bulunmalarına rağmen, gıda zehirlenmesi ve salgınların % 95'i klasik enterotoksinler (A, B, C, D, E) vasıtasıyla meydana gelmektedir. Gıda kaynaklı hastalıklarla en fazla ilişkili olanı enterotoksin A olmak üzere bunu SEB ve SED tipleri izler (Angeles va ark., 2010; Erol., 2007). Çok az miktarda alınan 10 ng- 1µg düzeyindeki stafilokokal enterotoksinler gıda zehirlenmesi semptomlarının ortaya çıkması için yeterlidir. (Peliser ve ark., 2009).

Stafilokokal Enterotoksinler (SE) tekli polipeptid zincirlerden oluşurlar ve molekül ağırlıkları 27-34 kDa arasında değişir. Bu enterotoksinler başta *S. aureus* olmak üzere, *S. intermedius*, *S. hyicus, S. xylosus* ve *S. epidermidis* gibi bu grupta yer alan diğer türler tarafından da üretilebilmektedir (Bhatia A, ve ark., 2007; Balaban ve Rasooly, 2000). Bütün üreme fazları boyunca üretilebilen ancak temel olarak eksponensiyel üreme fazı ortasında veya sonunda üretilebilen proteinlerdir (Balaban ve Rasooly, 2000).

Stafilokokal Enterotoksinler, yapısında fazla miktarlarda aspartik asit, glutamic asit, lizin ve tirozin bulundurmaktadırlar. Enterotoksinler suda kolay çözünürler ve izoelektrik nokta pH değeri 7.0-8.6'dır. SE'ler proteolitik enzimlere (pepsin, tripsin, kimotripsin, kimozin, Rennın, Papain vb.) düşük pH değerlerine ve relatif yüksek ısıya (100 ˚C'de 30 dakika) dirençlidir (Angeles ve ark., 2010). SEA bakteriofajik genler, SEB ve SEC kromozomal genler, ve SED ise plazmidal genler tarafından kodlanmaktadır. (Normanno ve ark., 2005; Normanno ve ark., 2007b; Dinges et al., 2000).

Çizelge 1.8. *S. aureus* tarafından üretilen toksinlerin özellikleri (Gordon, 1998).

Toksin	Moleküler ağırlığı(kDa)	Kusturma etkisi	Kristal yapı çözülmesi	Gen	Accessory genetic element
SEA	27.1	evet	evet	*sea*	Φsa3ms, Φsa3mw, Φ252B, ΦNM3, Φmu50a
SEB	28.4	evet	evet	*seb*	pZA 10, SaPI3
SEC	27.5-27.6	evet	evet	*sec*	SaPIn1, SaPIm1, SaPImw2, SaPIbov1
SED	26.9	evet	evet	*sed*	pIB485-like
SEE	26.4	evet	hayır	*see*	ΦSa[b]
SEG	27.0	evet	evet	*seg*	*egc*1 (**v**Saβ I); *egc*2 (*v*Saβ III(; *egc*3; *egc*4
SEH	25.1	evet	evet	*seh*	MGEmw2/mssa476 *seh*/Δ*seo*
SEI	24.9	zayıf	evet	*sei*	*egc*1 (*v* Saβ I); *egc2* (*v*Saβ III); *egc*3
Se*l*J	28.5	nd	hayır	*selj*	pIB485-like; pF5
Se*l*K	26.0	nd	evet	*selk*	ΦSams,ΦSa3mw,SaPI1, SaPI3, SaPIbov1, SaP15
Se*l*L	26.0	hayır[a]	hayır	*sell*	SaPIn1, SaPIm1, SaPImw2, SaPIbov1
Se*l*M	24.8	nd	hayır	*selm*	*egc*1 (*v*Saβ I); *egc*2 (*v*Saβ III)
Se*l*N	26.1	nd	hayır	*seln*	*egc*1 (*v*Saβ I); *egc*2 (*v*Saβ III);*egc*3;*egc*4
Se*l*O	26.7	nd	hayır	*selo*	*egc*1 (*v*SaβI); *egc*2 (*v*SaβIII); *egc*3; *egc*4
Se*l*P	27.0	nd[a]	hayır	*selp*	MGEmw2/mssa476 *seh*/Δ*seo*
Se*l*Q	25.0	hayır	hayır	*selq*	ΦN315, Φmu3A
SER	27.0	evet	hayır	*ser*	pIB485-like; pF5
SES	26.2	evet	hayır	*ses*	pF5
SET	22.6	zayıf	hayır	*set*	pF5
SE*l*U	27.1	nd	hayır	*selu*	*egc2* (*v*SaβIII); *egc3*
SE*l*U2 (SEW)	nd	nd	hayır	*selu2*	*egc4*
SE*l*V	nd	nd	hayır	*selv*	*egc4*

Nd; not determined= belirlenmemiştir. a; tavşan da kusturma etkisi gösterilmiştir
B; profajlarda yer alması var sayılır.

SEB'nin pH 7.3'te 60 ˚C de 16 saat süre ile ısı işlemi uygulanmasına rağmen, biyolojik olarak aktif olduğu gözlenmiştir. Yine SEC'nin serolojik yapısında 60 ˚C de 30 dakika süre ile ısı işlemi uygulanması sonucunda her hangi bir değişiklik saptanmamıştır. SE'lerin dayanıklı bir yapıya sahip olmalarında molekül yapılarında bulunan disülfit bağının rol oynayabileceği düşünülmektedir (Jay ve ark., 2005).

1.7.1. Stafilokokal Enterotoksin A (SEA):

Stafilokokal gıda zehirlenmelerinde en sık rastlanan enterotoksindir. SEA'yı kodlayan *entA* geni bir bakteriofajın üzerinde bulunmaktadır. Bu fajın sirkülarizasyon ve karşılıklı gen aktarımı sonucunda bakteri kromozomuna dahil olduğu ve *entA* geninin faj bağlanma bölgesine yakın bir yerde lokalize olduğu saptanmıştır. Bu genin 771 baz çiftinden oluştuğu ve 257 aminoasit rezidüsünden oluşan enterotoksin A prekürsörünü kodladığı belirtilmiştir. Bu yapıda 24-rezidülük hidrofobik bir N-terminal sekansı, 27KDa moleküler ağırlığa sahip olan SEA'yı oluşturmaktadır (Balaban ve Rasooly ,2000). SEA, *S.aureus*'un logaritmik fazın ilk döneminde sentezlendiğinden çevre şartları optimal olmasa dahi intoksikasyon yapacak düzeye ulaşabilmektedir. Bu nedenle SEA, stafilokokal gıda zehirlenmelerinde en sık sorumlu tutulan toksindir. (Seo ve Bohach, 2007).

1.7.2. Stafilokokal Enterotoksin B (SEB):

Stafilokoklar tarafından üretilen bir tür enterotoksin olarak tanımlanmaktadır. Bu toksin nispeten sağlam ve dayanıklı bir bileşim ve yapıya sahiptir. Yüksek sıcaklığa orta derecede dayanıklıdır. 100 ˚C de bir kaç dakika dayanıklı olabilir (Gleason ve ark., 2011).

SEB, *S. aureus*'da koromozomal olarak lokalize olan *entB* geni tarafından kodlanmaktadır. Bu genin kodlama bölgesi yaklaşık 900 nükleotid içermektedir. Bu gen diğer bakteri suşlarında ise 750 kb'lık bir plazmid ile taşınmaktadır (Balaban ve Rasooly., 2000). SEB ile SEC1 arasında % 68 düzeyinde bir aminoasit benzerliği bulunmuştur (Jay ve ark., 2005).

1.7.3. Stafilokokal Enterotoksin C (SEC):

Antijenik olarak SEC1, SEC2, SEC3 olmak üzere 3 farklı alt tipi bulunmaktadır. SEC3, SEC1 ve SEC2 ile serolojik ve kimyasal olarak ilişkili olmasına rağmen, tam anlamıyla bu toksinlerle benzerlik göstermemektedir. *entC3* geni 801 baz çiftinden oluşmakta ve 27-rezidülük sinyal peptidini içeren 267 aminoasitlik prekürsör proteini kodlamaktadır. SEC3 ile SEC1 arasında % 98 düzeyinde bir nükleotid sekans benzerliği saptanmıştır (Jay ve ark., 2005). SEC3 ile SEC2 ve SEC1 arasında sırasıyla 4 ve 9 aminoasitlik bir fark olduğu belirtilmiştir. *entC2* geni 801 bp'lik olup, 267 aminoasitlik prekürsör proteini kodlar. Olgun SEC2, 239 aminoasitten oluşmaktadır (Balaban ve Rasooly., 2000; Can, 2011).

1.7.4. Stafilokokal Enterotoksin D (SED):

Gıda zehirlenmelerinde sıklıkla izole edilen ikinci önemli toksindir. SED'yi kodlayan *entD* geni 27,6- kb'lık penisilinaz plazmidi üzerinde lokalize olup, 30 aminoasitlik sinyal peptidi içeren 258 aminoasitlik prekürsör proteini kodlamaktadır (Jay ve ark.,2005; Seo ve Bohach,2007). 228 aminoasitlik olgun polipeptit diğer SE'lerle sekans benzerliği göstermektedir. SED süperantijeni Zn^{+2} varlığında MHC sınıf II moleküllerine yüksek düzeyde affinite göstermektedir (Zhang ve ark., 1998; Balaban ve Rasooly., 2000).

1.7.5. Stafilokokal Enterotoksin E (SEE):

Enterotoksin E geni *(entE)* 26 kDa moleküler ağırlığa sahip olan proteini kodlar. Sekans analizleri sonucunda SEE, SED ve SEA'nın birbirleriyle yakın ilişkili olduğu bulunmuştur. SEE, SEA ile yüksek düzeyde (%81) sekans benzerliği göstermektedir (Balaban ve Rasooly,2000). SEE, stafilokokal gıda zehirlenmelerine nadiren neden olmaktadır (Seo ve Bohach, 2007).

1.7.6. Stafilokokal Enterotoksin G (SEG):

SpeA, SEB, SEC ve SSA'ya (stereptokokal süperantijen A) en çok benzeyen toksindir. *entG* geni 258 aminoasitlik prekürsör proteini kodlamaktadır (Balaban ve Rasooly, 2000).

1.7.7. Stafilokokal Enterotoksin H (SEH):

27300 Da moleküler ağırlığında yeni bulunan bir enterotoksin olarak tanımlanmıştır. Toksin oluşturan aminoasit sekansının amino (NH_2-) ucu kendine özgü olup, diğer enterotoksinlerle arasında herhangi bir çapraz reaksiyon saptanmamıştır (Balaban ve Rasooly., 2000; Seo ve Bohach., 2007).

1.7.8. Stafilokokal Enterotoksin I (SEI):

entI geni 242 aminoasitlik prekürsör proteini kodlamaktadır diğer SE'ler ile en az benzerliği olan toksindir (Balaban ve Rasooly, 2000).

1.7.9. Stafilokokal Enterotoksin J (SEIJ)

Enterotoksin D'yi kodlayan plasmid üzerindeki bir açık okuma bölgesinin kodladığı bulunmuştur. Enterotoksin D ve J'nin açık okuma bölgelerinin birbirine zıt yönlerde transkripte olduğu ve 895 nükleotid içeren intergenik bir bölge sayesinde ayrıldığı saptanmıştır. 269 aminoasitten oluştuğu tahmin edilen SEJ proteininin SEA, SEE ve SED ile önemli Düzeyde (% 64-66) sekans benzerliği bulunmuştur. Moleküler düzeyde yapılan çalışmalar sonucunda, *entJ* determinantının SED'yi kodlayan bütün plazmidlerde bulunabileceği düşünülmektedir (Zhang ve ark., 1998; Seo ve Bohach., 2007).

1.8. Antibiyotik Direnci Mekanizmaları ve Genetik Düzenlenmesi

İlk antibiyotik 1929 yılında *Penicillium* küfü ile kontamine agar plağında, stafilokokların üremesinin inhibe olduğunu gözleyen Sir Alexander Fleming tarafından keşfedilmiştir (Tanır ve Göl, 1999). Ancak teknik zorluklar nedeniyle ilacın klinik kullanıma girmesi 1940'ları bulmuştur. Antibiyotik tarım-hayvancılık ve insanlarda aşırı ve bilinçsiz kullanımı, bütün dünyada mikroorganiznalar üzerinde büyük bir selektif baskı oluşturmaktadır. Antibiytotik çağı başlandığından beri yeni bir antibiyotik klinik kullanıma girdiğinde bazı türler duyarlı, bazılar doğal olarak dirençlidirler. Ancak zamanla duyarlı türlerde mutasyonla veya yeni genlerin kazanılması ile direnç geliştirmekte ve bu direncin giderek yaygınlaştığı görülmektedir (Ryan 2004; Campanaud, 2006; Hausler, 2006).

Nishijima ve Kurokawa (2002), değişik cilt infeksiyonlarından izole ettikleri *S. aureus*'ların çeşitli antimikrobiyel ajanlara karşı duyarlılıklarını incelediklerinde, izolatlarda penisilin, sefalosporin ve klindamisin direncinin % 20-30 arasında olduğunu saptamışlardır. Metisilin direnci izolatların % 21'inde tespit edilmiştir. Gentamisin, eritromisin ve roksitromisin direnci sırasıyla % 55.2; % 39.6; % 39,1 olarak yüksek düzeyde bulunmuştur. Sonuç olarak, cilt infeksiyonlarından izole edilen çoklu antibiyotik direnci gösteren *S. aureus*'ların insidensinin arttığı belirtilmektedir.

S. aureus' larda direnç olayı iki ana başlıkta toplanmaktadır.

1. Beta-laktam antibiyotiklere direnç
2. Non-beta-laktam antibiyotiklere direnç

1.8.1 Beta-laktamaz direnci

Beta-laktamaz enzimi ilk kez 1929 yılında Fleming adlı bir araştırıcı tarafından fark edilmiştir. Bu araştırmacı bazı bakterilerin penisilinler tarafından inhhibe olmadığını gözlemiştir. Beta-laktam antibiyotikler, bakteri hücre duvarının ana yapısını oluşturan peptidoglikan sentezi sırasında rol alan transpeptidaz enzimine bağlanarak ve

bakteri hücre duvarı sentezini inhibe ederek antibakteriyel etkilerini gösterirler (Hartstein ve ark., 2004).

S. aureus'ta beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç genellikle penisilin bağlayan proteinlerde (PBP; penicillin binding protein) oluşan değişiklikler ve β-laktamaz ezimleri ile gerçekleşmektedir. Klinikte en sık gözlenen direnç β-laktamaz enzinmleri ile antinbiyotiğin inaktive edilmesi şeklinde olmaktadır. PBP'lerdeki değişiklikler kromozomal mutasyonlar sonucunda ortaya çıkmakta ve buna bağlı olarak, PBP'nin beta laktam antibiyotiğe afinitesi azalmakta ya da düşük afiniteli yeni PBP' ler sentezlenmektedir (Sundsfjord ve ark., 2004; Zetola ve ark., 2005; Vanderhaeghen ve ark., 2010).

1.8.1.1. Penisilin direnci

Penisilinin tedaviye girdiğinden itibaren *S. aureus* suşlarında beta-laktamaza bağlı penisilin direnci hızla artmıştır. *S. aureus*'un penisiline karşı dirençli olduğu ilk olarak 1941 yılında bulunmuştur. Penisilinaz oluşturarak penisiline direnç kazanmış olan *S. aureu*s suşları 1950'li yılların sorun yaratan bakterileri olmuştur. 1960 yılında penisilinaza dayanıklı semisentetik bir penisilin olan metisilinin kullanıma girmesiyle birlikte bir yıl içinde metisiline dirençli *S. aureu*s (MRSA) suşları Avrupa'da saptanmaya başlamıştır (Lowy, 2003; Hartstein AI ve ark., 2004).

Penisilin direnci plazmidlere bağlı bir direnç olup, bu plazmidlerin duyarlı bakterilere aktarılması sonucunda bu bakterinin penisilinaz üretebilme yeteneği kazanmasıdır (Pesavento ve ark., 2007).

Günümüzde penisilinaz üreten *S. aureus* suşları % 80-90 düzeyindedir. Beta-laktamaz geni büyük bir plasmid içinde bulunan aktarılabilen elementin bir parçasıdır. Bu elementin içinde gentamisin ve eritromisin gibi başka antimikrobiyal direnç genleri de taşınabilir (Ünal 2004; Chambers ve ark., 2005).

Stafilokoklarda penisilin direncinin β-laktamaz enzimini kodlayan *blaZ* geni varlığında oluştuğu belirtilmektedir. *blaZ* geni, antirepresörü olan *blaR1* ve represörü

olan *blaI* regulator genlerinin kontrolündedir. Bu enzim β-laktam halkasının hidrolizasyonu sonucunda β-laktam gurubu antibiyotikleri inaktive eden ekstrasellüler bir enzim olup, stafilokoklar tarafından bu antibiyotiklere maruz kalındığında sentezlenmektedir (Zetola ve ark., 2005).

1.8.1.2. Metisilin direnci

Metisiline duyarlı (MSSA) izolatlarında beş adet penisilin bağlayan protein (PBP) bulunmaktadır. MRSA izolatlarında ise bunlara ek olarak "PBP2a" olarak adlandırılan ve 78 kDa ağırlıkta olan farklı bir PBP vardır. PBP2a, diğerlerinden farklı olarak beta laktam yapısındaki antibiyotiklere karşı oldukça düşük afinite gösterir. Stfilokokal β-laktamaz enzimi hidrolizine dirençli penisilin grubu antibiyotikler içerisinde ilk olarak metisilin elde edilerek, 1959 yılında klinik kullanıma girmiştir. Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA; methicillin resistant *S. aureus*) ilk defa 1961 yılında İngiltere'de klinik izolatlarda saptanmış ve 1970'li yıllarda da Amerika da epidemik boyutları araştırılmaya başlanmıştır (Wettstein ve ark., 2008; Klevens ve ark., 2007).

MRSA'lar yaygın olarak kullanılan aminoglikozitler, makrolidler, florokinolonlar, kloramfenikol ve tetrasiklin gibi antimikrobiyel ajanlara karşı da çoğunlukla dirençli bulunmaktadır (Lee, 2003; Lowy 2003; Normanno ve ark., 2007b).

Stafilokoklarda metisilin direnç mekanizması, *mecA* geni tarafından kodlanan PBP2a veya PBP2 sentezi yoluyla oluşur ve MRSA kökenlerinin tümü bu gene sahiptir. (Zetola ve ark., 2005).

Metisilin dirençli *S. aureus* suşları gıda güvenliği için potansiyel bir tehdit oluşturmaktadır. Bu suşların metisiline direncini sağlayan özellikle 2.1- kb'lık ekzojen DNA parçası olan ve horizontal olarak transfer edilebilen metisilin direnç geni *mecA* (Methicillin-resistant gene *mecA*)' yı kazannmaları ile oluşnmaktadır. *mecA* geni PBP'2a'yı kodlamaktadır. Ayrıca Metisilin direnci kromozomal olarak lokalize olan *mecA* geni varlığında oluşmaktadır. Bu PBP, normal stafilokok suşlarında bulunan PBP-1.2 ve 3'ten farklıdır. Bu enzim sefalosporinler ve karbapenemler de dahil olmak üzere

tüm β-laktam antibiyotiklere düşük afinitesi nedeniyle, bu antibiyotiklerin varlığında aktivitesini devam ettirmekte ve bakteri hücre duvarının peptidoglikan çapraz bağlarını bağlayarak bakterinin parçalanmasını engellemektedir (Souso ve Lencastre 2004; Lee, 2003; Normanno ve ark., 2007b; Shimamura ve Murata, 2008; Zetola ve ark., 2005; Vanderhaeghen ve ark., 2010; Normanno ve ark., 2007b).

Günümüzde MRSA infeksiyonlarının tedavisinde en sık kullanılan ilaçlar vankomisin ve teikoplanin olmak üzere glikopeptid gurubu antibiyotiklerdir. Glikopeptidlerin yanı sıra linezolid, daptomisin ve tigesiklin gibi yeni antibiyotikler de kullanılmaktadır. MRSA'da, metisiline duyarlı *S. aureus*'ta (MSSA; methicillin-sensitive *S. aureus*) bulunmayan ve stafilokokal kaset kromozom *mec* (SCC; staphylococcus cassette chromosome *mec*) olarak isimlendirilen bir direnç adası bulunmaktadır. Duyarlı bir *S. aureus* suşunun SCC*mec* adasına sahip olmasıyla MRSA' ya dönüştüğü belirtilmiştir (Zetola ve ark., 2005).

SCC*mec*, 21-67 kb büyüklüğünde mobil genetik eleman olup, rekombinaz genleri (*ccrA*, *ccrB*, *ccrC*) ile *mec* gen kompleksini (*mecA* geni ve regülatörleri) içermektedir. *mecA* geni ve bunu regüle eden *mecI* genleri birlikte *mecA* gen kompleksini (*mecI-mecR1*, *mecA*) oluşturmaktadır (Sundsfjord ve ark., 2004).

mecI ve *mecR1* genlerinin, *mecA* promoter bölgesinin hemen üzerinde lokalize oldukları belirlenmiştir. Bu genlerin, β-laktamaz enzimini kodlayan *blaZ* geninin regülatörleri olan *blaR1* ve *blaI* genleri ile homolog yapıda oldukları saptanmıştır. *mecI* geni *mecA* transkripsiyonunu baskılayan *MecI* proteinini, *mecR1* ise membrana bağlı sinyal transdüksiyon proteini olan *MecR1*'I kodlamaktadır (Lee, 2006). Bu genlerin kontrolünde *mecA* geninin β-laktam antibiyotiklere yanıt vermesi, bakteri penisiline maruz kaldığında *blaR1* ve *blaI* genlerinin *blaZ* genini regüle etmesine benzer şekilde meydana geldiği belirlenmiştir (Lowy, 1998; Lowy, 2003).

Metisilin dirnencinin fenotipik olarak ekspresyonu değişkenlik göstermektedir. *mecA* veya *mecI* genlerinin promoter bölgesindeki mutasyon ya da delesyonların konstitütif *mec* ekspresyonuna neden olduğu saptanmıştır. Bazı *S. aureus* suşlarının

mecA genini taşımalarına rağmen, metisilin direncini eksprese edemedikleri ve fenotipik olarak metisiline duyarlı oldukları bulunmuştur. Bu suşlarda *mecI*'nın *mecA* transkripsiyonunu baskıladığı ve çoğu β-laktam antibiyotiğin *mecR1*'I aktive edememesine bağlı olarak, MIC<8 mg/L düzeyinde metisiline duyarlılık şekillendiği tespit edilmiştir. *mecA* geni taşımalarına rağmen, metisiline duyarlı olan bu suşlar pre-MRSA olarak tanımlanmaktadır (Lowy, 2003; Lee, 2006).

Metisilin direncinin düzenlenmesinde, *mecA* gen kompleksi dışında *fem* (factor essential for resistance to methicillin resistancne) genlerinin de rol oynadığı bildirilmiştir. Bu genler peptidoglikan zincirlerinin çapraz bağlanmasında görev alarak metisilin direncinin ekspresyonuna katkı sağlamakla birlikte, metisiline duyarlı ve dirençli suşlarda bulunabilmektedirler (Can, 2011; Lowy, 1998; Lowy,2003).

1.8.2. Non-beta-laktam antibiyotiklere direnç

1.8.2.1. Kinolon Direnci

Ofloksasin, siprofloksasin, enoksasin, fleroksasin, pefloksasin gibi ilk olarak kullanıma giren kinolon türevlerinin antimikrobiyel etkinlikleri stafilokoklara ve Gram negatif bakteriler üzerinde saptanmıştır (Küçükateş ve ark., 2003).

Florokinolonların *S. aureus*'un neden olduğu infeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılmasından sonra, özellikle MRSA suşlarında kinolon direnci hızlı bir şekilde ortaya çıkmıştır (Kaatz ve ark, 1993; Ito ve ark., 1994). Kinolonlar DNA replikasyonunda rol oynayan DNA giraz ve topoizomeraz IV enzimlerini inhibe ederek antibakteriyel etkilerini göstermektedirler (Lowy, 2003).

S. aureus'ta *gyrA*, *norA* ve *flg* olmak üzere kinolon direncinden sorumlu üç gen bulunmaktadır. *GryA* geninin sekans analizi sonucunda, bu gendeki mutasyonların *S. aureus*' ta kinolon direncine neden olabileceği belirtilmiştir. *norA* geni plazmid aracılığı ile taşınmakta olup kinolon efflux proteini olan *norA*'yı kodlamaktadır. *norA*'nın

promotor bölgesindeki mutasyonların bu genin transkripsiyonunu arttırdığı ve sonuçta kinolonlara direnç geliştiği düşünülmektedir(Can, 2011, Ito ve ark., 1994; Lowy, 2003;).

Klinik kullanıma giren ilk kinolon olan nalidiksik asit sadece Gram negatif enterik bakterilere etkilidir, *S. aureus* üzerine etkinliği yoktur. İkinci kuşak kinolonların da stafilokoklara etkinliği orta derecededir. Özellikle siprofloksasin ve ofloksasinin klinik kullanıma ilk girdiği yıllarda *S. aureus*'a karşı çok iyi etkinlik gözlenmiş ancak kısa sürede kinolon direnci gelişmiştir (Ulusoy ve ark., 2003).

1.8.2.2. Aminoglikozid direnci

Aminoglikozidler Streptomyces ve Micromonospora cinsi toprak bakterilerinden elde edilen antibiyotiklerdir ve metisiline duyarlı stafilokoklara genellikle etkilidirler. Aminoglikozidler, Gram pozitif koklara bağlı gelişen infeksiyonların tedavisinde beta laktam antibiyotikler ve vankomisin gibi diğer bazı antibiyotiklerle sinerjik etkilerinden yararlanmak amacıyla kombine tedavide kullanılırlar (Topçu, 2002).

Aminoglikozidler önemli antimikrobiyel ajanlar olup, sıklıkla glikopeptid ve β-laktamlarla birlikte alfa-hemolitik stereptokok, stafilokok ve enterokokların neden olduğu invaziv karakterdeki infeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. (Sundsfjord ve ark., 2004).

Aminoglikozidler hücre duvarındaki porin kanallarından girerek 23S rRNA'nın 30S alt birimine geri dönüşümsüz olarak bağlandığı için translasyonu bozarlar. Bu antibiyotiklere karşı direnç ribosomal, enzimatik ve permeabiliteye bağlı olmak üzere 3 şekilde ortaya çıkmaktadır. *S. aureus*'ta ribozomal ve permeabiliteye bağlı direnç nadiren oluşmasına karşın, en sık enzimatik direnç gözlenmektedir. Plazmid ve transpozonlar tarafından kodlanan asitiltransferaz, nükleotidiltransferaz ve fosforiltransferaz enzimleri ile antibiyotiğin yapısı değiştirilerek inaktivasyonu gerçekleştirilmektedir (Sundsfjord ve ark., 2004).

1.8.2.3. Glikopeptit direnci

Metisilin dirençli stafilokoklar çoğunlukla aminoglikozitlere ve flourokinolonlara dirençli bulunduğundan, infeksiyonlarının tedavisinde glikopeptid antibiyotikler kullanılır. Metisilin direncinin artmasına paralel olarak özellikle vankomisinin kullanımı da bu nedenle artmıştır (Bannerman, 2003; Climo ve ark., 2003). Glikopeptid antibiyotikleri (vankomisin ve teikoplanin) hücre duvarındaki D-Ala-D-Ala rezidülerine bağlanıp peptidoglikan sentezini bloke ederek antibakteriyel etkilerini göstermektedirler. (Sudsfjord ve ark., 2004).

Gram negatif bakterilerin lipid membranından penetre olamadıkları için bu mikroorganizmalar üzerinde etkili değillerdir, sadece gram pozitif bakterilere etkilidirler (Ünal ve Akhan, 1996).

Vankomisine karşı gelişen stafilokokal direnç ilk olarak klinikte izole edilen *Staphylococcus haemolyticus* suşunda bildirilmiştir. İlk defa Japonya'da 1997 yılında izole edilen vankomisine orta düzeyde dirençli *S. aureus*'un (VISA; vancomycin intermediate-resistant *S. aureus*) daha sonra diğer ülkelerde de varlığı rapor edilmiştir (Lowy, 1998; Lowy, 2003; Pesaveto ve ark., 2007).

1.8.2.4. Tetrasiklin direnci

Tetrasiklinler çoğunlukla oral olarak direkt yeme katılarak ya da aerosol olarak kullanılmakta ve böylece geniş kullanım nedeniyle pek çok bakteride tetrasiklin gurubuna karşı direnç gelişimi söz konusudur. Tetrasikline direnç sağlayan en az 15 farklı gen vardır *tet*(A), *tet*(B), *tet*(C-Q). Bunlardan *tet*(M) farklı bakterilerde olmak üzere (streptokok, pnömokok, *Campylobacter, G. vaginalis*, fuzobakteriler, Mycoplasma...) çok yaygındır.

Tetrasiklinler, ribozomun 30S subunitine bağlanarak aminoaçil-tRNA'yı bloke ederek protein sentezini inhibe ederler. Stafilokoklar için bakteriyostatik ilaçlardır. *tet(M)* geni minosiklin ve doksisikline kromozomal direnci kodladığı için klinik açıdan

önemlidir. Direnç gelişimini azaltmak için stafilokok infeksiyonlarında tek başına kullanılmamalıdır (Yıldız ve Aygen, 2002).

Tetrasikline karşı direnç aşağıdaki mekanizmalar ile sağlanır:

1. **Hücre içi ilaç birikimi azalması** (azalmış giriş veya artmış çıkış): Gram negatif bakterilerde direnç kazanılmasının en sık mekanizması olup, plazmid veya transpozon aracılıklıdır. Tetrasiklinlerin bakteriye girişi bozulup hücre içinde ilaç birikimi azalabilir. Gram pozitif bakterilerde de bu mekanizma ile direnç kazanılabilir.

2. **Hedef duyarlılığı azalması:** Gram pozitif bakterilerde ribozomal değişiklik sonucunda antibiyotiğin hedefe bağlanması azalır (Öztürk, R., 2002).

1.9. Stafilokokların Kontaminasyon Kaynakları ve Kanatli Eti Ürünlerinde *Staphylococcus aureus* Bulunuşu

Stafilokokal Gıda zehirlenmeleri (SFP) yeterli miktarlarda bir veya birden fazla enterotoksin içeren gıda maddesinin tüketimi sonucunda meydana gelmektedir. SFP semptomları hızlı bir saldırı şeklinde 2-8 saat içinde bireysel duyarlılığa, alınan toksin dozuna ve türüne bağlı olarak, mide bulantısı, sert ve şiddetli kusma, karın krampları ve diyare ile görülmektedir (Angeles ve ark., 2010).

Stafilokoklar ubiquiter özellikte mikroorganizmalar olup proteince zengin ve asitliği düşük gıdalarda kolaylıkla gelişmektedir (Le Loir ve ark., 2003; Bremer ve ark., 2004; Normanno ve ark; Angeles ve ark., 2010).

Bu bakteri, jambon gibi tuzlu gıdalarda üreyebilmektedir. Bu koşullarda üremesinin en önemli nedeni *S. aureus*'un düşük su aktivitelerde canlılığını koruyabilmesi ve üreme özelliğine sahip olabilmesidir (Marıa Angeles Argudın ve ark., 2010; Normanno ve ark., 2005: Normanno ve ark., 2007a).

Bu tür gıdalarda Stafilokokal tüm zehirlenme vakalarının yaklaşık %24 civarinde sorumlu olduğu belirtilmiştir (Normanno ve ark., 2005: Normanno ve ark., 2007a).

Etken sağlıklı insanların % 30-50'sinin burun mukozasından izole edilebilir. Bu kapsamda gıda işletmelerinde çalışan kişilerin çıplak elle gıdalara dokunması ve gıdalara karşı hapşırıp-öksürmeleri sonucunda kontaminasyon şekillenebilmektedir (Bremer ve ark., 2004 Jorgensen ve ark., 2005a; Jorgensen ve ark., 2005b).

Tayvan'da 356 okul çocuğunun etkilendiği bir gıda zehirlenmesi vakasında, enterotoksijenik satafilokoklar etken olarak gösterilmiş ve enterotoksin A ve B'yi üretebildikleri saptanmıştır. Plus Field Gel Electerophoresis (PFGE) ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile yapılan araştırmalarda salata ve tavuk etinden oluşan yemeklerin gıda işletmelerinde çalışanlar tarafından kontamine edildiği bildirilmiştir (Wei ve Chiou, 2002).

Brezilya'da Minas peyniri ve çiğ süt tüketiminden sonra oluşan iki gıda zehirlenmesi olgusunda, toplam 378 kişi etkilenmiştir. Minas peynirini gıda işletmelerinde çalışanların, çiğ sütü ise mastitisli hayvanların kontamine ettiği bildirilmiştir (Simeao ve ark., 2002).

Fueyo ve ark. (2005) tarafından İspanya'da yapılan bir çalışmada, sağlıklı çalışanların burun mukozalarından ve peynir, krema, dondurma, kek, çiğ et ile ısı işlemi görmüş elle hazırlanmış gıdalardan izole ettikleri 269 *S. aureus* suşunu, enterotoksin oluşturma yetenekleri yönünden incelemişlerdir. Bunlardan 57 izolatın SEA, SEB, SEC, SED'den bir veya daha fazlasını üretebildikleri, 10 izolatın sadece TSST-1'i, 10 izolatın ise hem toksinleri hem de TSST-1'i beraber üretebildiği saptanmıştır. SEA ve SEC'nin en sıklıkla gözlenen toksinler olduğu bildirilmiştir. Burun mukozalarından elde edilen izolatların %23.9'u, elle hazırlanmış gıdalardan elde edilenlerin ise % 26'sının stafilokokal enterotoksin oluşturabildiği saptanmıştır.

Kıtai ve ark. (2005), Japonya'da 145 değişik markette satışa sunulan 444 piliç parça etinde *S. aureus*'ların varlığı ve enterotoksijenitesi üzerine yaptıkları bir

çalışmada, 292 örnekten *S. aureus* izole etmişlerdir. İzolatların %57.1'inin kanatlı, %22.1'inin ise insan orijinli olduğunu ve 360 izolatın 78' inin enterotoksijenik olduğunu bildirmişlerdir. 50 izolatın B tipi, 14 izolatın A tipi, 8 izolatın C tipi, 2 izolatın ise D tipi toksin oluşturmasının yanı sıra, 2 izolatın A ve B tiplerini beraber ve 2 izolatın ise A ve C tiplerini beraber oluşturduğu bildirilmiştir.

Erol ve Usca (1996), 50 adet donmuş piliç karkas örneğinde, koagulaz pozitif stafilokokların varlığı ve kontaminasyon düzeyi ile enterotoksin oluşturabilme yeteneklerinin belirlenmesi üzerine yaptıkları bir çalışmada, 33örnekten ortalama $1,3x10^3$ kob/g düzeyinde koagulaz pozitif stafilokok saptanmıştır. Örneklerin 49'unda ortalama $5,8x10^4$ kob/g düzeyinde mikrokok/stafilokok izole etmişlerdir. Koagulaz pozitif izolatlardan 7'sinin enterotoksijenik olduğunu ve A, B, C, D tipi toksinlerin birini veya birkaçını beraber oluşturabildiklerini bildirmişlerdir.

Normanno ve ark. (2005), Haziran 2000- Temmuz 2002 yılları arasında İtalya'da üretilen ve perakende satışa sunulan 9869 hayvan orijinli gıda numunesi ve gıda ile temasta olan yüzeylerden 1515 svap örneği alarak toplam 11384 örnekte koagulaz pozitif *S. aueus* varlığını ve enterotoksin oluşturma yeteneğini incelenmişlerdir. Bunlardan 1971 (17.3%) izolatta koagulaz pozitif Stafilokok saptanmıştır. Bu izolatlardan 537'si *S. aureus* olarak tanımlanmıştır. Bunlardan 298 izolatın yani % 55.5' nin bir yada birden fazla enterotoksin oluşturabilmektedir. Bu araştırma sonucu çizelge 1.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.9. *S. aureus* SE oluşturma düzeyleri (Normanno ve ark., 2005).

SEs	İzolat sayısı	%
SEA	79	26.5
SEB	8	2.7
SEC	101	33.9
SED	40	13.4
SEA+SEB	5	1.7
SEA+SEC	1	0.3
SEA+SED	61	20.5
SEB+SEC	1	0.3
SEC+SED	2	0.7
Total	298	100

Stafilokokal intoksikasyonlarda sıklıkla sorumlu tutulan gıdalar ülkelerin tüketim alışkanlıklarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. 1969-1990 yılları arasında İngiltere'de bildirilen stafilokokal gıda zehirlenmelerinin % 53'ünün kontamine et ürünleri (özellikle jambon), % 22'sinin kanatlı eti, % 8' inin süt ürünleri, % 7'sinin balık ve kabuklu deniz ürünleri, % 3.5'inin ise yumurta sonucu ortaya çıktığı belirtilmektedir. Yine Fransa'da 1999-2000 yılları arasında meydana gelen stafilokokal intoksikasyonların % 32'sinden süt ürünleri (özellikle peynir), % 22'sinden et, % 15' inden sosis-sucuk gibi et ürünleri ,% 11'inden balık ve diğer deniz ürünleri, % 11' inden yumurta ve yumurta içeren ürünler, % 9.5'inden ise kanatlı etleri sorumlu tutulmuştur. Amerika' da ise 1975-1982 yıllarını kapsayan dönemde stafilokokal intoksikasyonların % 36'sının kırmızı et, % 12.3'ünün salata, % 11.3'ünün kanatlı eti, % 5.1'inin pastacılık ürünleri ve sadece % 1.4'ünün süt ürünleri ile deniz ürünlerinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Bhatia ve Zahoor, 2007).

Çizelge 1.10. Ülkelere Göre Stafilokokal Gıda Zehirlenmeleri (Bhatia ve ark., 2007).

Gıda türü	Et ve jambon	Kanatlı eti	Süt ürünleri	Balık ve deniz ürünleri	Yumurta	Salata	Pasta	Sosis
İngiltere	%53	%22	%8	%7	%3.5	-	-	-
Fransa	%22	%9.5	%32	%11	%11	-	-	%15
ABD	%36	%11.3	%1.4		-	%12.3	%5.1	-

1.10. Patogenez ve Semptomlar

Gastrointestinal semptomların zehirli gıdanın tüketilmesinden 1-6 saat sonra görülmesine rağmen, nörolojik ve hematolojik semptomlar gibi diğer semptomların ortaya çıkması için daha uzun bir süre gerekmektedir (Bhatia ve Zahoors., 2007). Bu bakteriden oluşan infeksiyonlar nadiren ölüme yol açabilir. A.B.D' de stafilokokal gıda zehirlemelerinden dolayı her yıl iki kişinin ölümü tahmin edilnmektedir (Normanno ve ark., 2007b).

Bu bakteri yüzeysel yaralara, apselere ve gıda zehirlenmelerine neden olmakla birlikte, pnömoni, yara infeksiyonlar, hayatı tehdit edecek ciddi septisemiler, menenjit, endokardit, toksik şok sendrom, flebit, üriner sistemi infeksiyonları ile osteomiyelite bile yol açabilmektedir. (Charlier ve ark., 2009; Boer E.d., 2009; Bhatia ve Zahoors., 2007; Lee 2003; Le Loir ve ark., 2003; Husbey ve ark., 2007).

İngiltere'de yapılan bir çalışmada gıda kaynaklı zehirlenmelerde gıdalardaki kontaminasyon oranlarına bakılmıştır. En sık kontamine olan gıdalardan et ve ürünleri (jambon ve piliç) kontaminasyon oranının % 75 olduğu saptanmıştır. Balık ve kabuklu deniz ürünleri % 7, süt ürünleri % 8 oranına ulaşmıştır. Kuvyt'te yapılan bir çalışmada ise gıda sektöründe çalışanların ellerinden izole edilen *S. aureus*'ların çoğunlukla B tipi enterotoksin üretilerek burundan izole edilenler örneklerde ise belirgin olarak A ve B tipi sırasıyla (%28 ve %28,5) ardından C ve D tipleri (%16,4 ve %3,5) olarak saptanmıştır (Bhatia ve Zahoor., 2007).

S. aureus tarafından sentezlenen patojeniteden sorumlu virulens faktörleri;

1) Konak dokuya invazyonunu sağlayan yüzey proteinleri,

2) Fagositik aktiviteyi inhibe eden yüzey faktörleri (kapsül, protein A),

3) Dokularda yayılmasını sağlayan invazinler (lökosidin, kinazlar, hyaluronidaz),

4) Fagositlerde canlılığını sürdürmesini sağlayan biyokimyasal faktörler (karotenoidler, Katalaz üretimi),

5) Hücre membranına zarar veren toksinleri (hemolizinler, lökotoksin, lökosidin),

6) Konak dokuya zarar verek semptomların ortaya çıkmasına neden olan ekzotoksinler

7) Immunolojik faktörler (Protein A, koagulaz, clumping faktör),

8) Antibiyotik direnci (Todar, 2005; Bhatia ve Zahoor, 2007).

SE' ler abdominal viserada yer alan hücresel reseptörleri uyararak kusma refleksini başlatmaktadır. Stafilokokal intoksikasyonda ortaya çıkan gastrointestinal semptomların

çoğunlukla yangısal medyatörlerin (histamine, lökotrien) serbest bırakılması ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (Munson ve ark., 1998; Lowy, 1998; Adams ve Moss, 2008).

1.11. Epidemiyoloji

Yapılan epidemiyolojik çalışmalar sonucunda, gıda kaynaklı intoksikasyolarda enterotoksijenik stafilokokların önemli derecede rol oynadığı, kontamine süt ve ürünlerinin sorumlu tutulan gıdalar arasında ilk sırada yer aldığı bulunmuştur. Peynirin sorumlu tutulduğu salgınların genellikle pastörizasyon sonrası personel kaynaklı bir kontaminasyondan ortaya çıktığı bulunmuştur. Bu durumunda yarışmacı mikrofloranın yokluğuna bağlı olarak, uygun olmayan muhafaza koşullarında stafilokokların hızla gelişerek, enterotoksin oluşturmaları sonucunda meydana geldiği bildirilmiştir (Bachmann ve Spahr, 1995; De Buyser ve ark., 2001; Normanno ve ark., 2005; Morandi ve ark., 2007).

Amerika'da 1983-1987 yılları arasında meydana gelen bakteriyel gıda zehirlenmesi olgularının % 7.8'ine stafilokok türlerinin neden olduğu bildirilmiştir. Aynı dönemde İngiltere'deki toplam 2815 salgının % 1,9'unun stafilokokal intoksikasyon şeklinde ortaya çıktığı rapor edilmiştir (Adams ve Moss, 2008).

Japonya'nın Kansai bölgesinde 2000 yılının temmuz ayı başlarında stafilokokal gıda intoksikasyonuna bağlı büyük bir salgın yaşanmıştır. Japonya'nın 8 farklı bölgesinde meydana gelen 13,420 kadar vakanın sıklıkla kontamine süt ürünlerinin tüketilmesi sonucunda olduğu bildirilmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda, süt ürünlerinin kontaminasyonundan bileşiminde bulunan yağsız süt tozu sorumlu tutulmuştur. Yağsız süt tozunda yaklaşık 3.7 ng/g düzeyinde SEA tespit edilmiştir. Bu salgında kişi başına SEA alımının tahmini olarak 20-100 ng arasında olabileceği bildirilmiştir. Yağsız süt tozunun üretimi sırasında süte 130 ˚C'de 2-4 sn süre ile pastörizasyon uygulanmasına rağmen, stafilokokların süttee yıkımlandığı, ancak SEA'nın aktivitesini koruyarak intoksikasyona neden olduğu belirtilmiştir (Asao ve ark., 2003).

Avustralya'nın kuzeydoğusunda yer alan Queensland eyaletinde 23 mart 2000 tarihinde düzenlenen bir kulüp partisinde 200 kişiden yaklaşık 50 kişide stafilokokal intoksikasyon görülmüştür. Salgında etkilenen kişiler arasaında 18 tane yaşlı insanda önceden hazırlanan soğuk piliç eti, salata ve tatlı tüketimi ile 5 saat içinde kusma, diyare ve karın ağrısı gözlenmiştir. Alınan dışkı ve kusmak örneklerinde stafilokokal enterotoksin tespit edilirken, hastaneye yatırılan 2 yaşlı kadının alınan dışkı örneklerinde ise koagulaz pozitif stafilokok önemsiz düzeyde bulunmuştur.

Salgında sorumlu tutulan gıda örnekleri alınarak, Queensland eyaletindeki gıda mikrobiyoloji laboratuvarında analize alınmıştır. Mikrobiyolojik yönden yapılan analiz sonuçlarına göre, piliç eti, salata, makarna ve jambonda $>2,5x10^6$ kob/g düzeyinde koagulaz pozitif stafilokok bulunmuştur. Bununla birlikte, aynı örneklerde stafilokokal enterotoksin tespit edilerek, salgında en önemli kontaminasyon kaynağının piliç eti olduğu bildirilmiştir. Moleküler düzeyde yapılan analizler sonucunda, insan ve gıda örneklerinden izole edilen stafilokok izolatları arasında genetik yakınlık olduğu saptanmıştır. Gıda ile temas halinde olan kişilerin çiğ ve pişmiş piliç eti arasında çapraz kontaminasyona yol açmaları ve piliç etinin pişirildikten sonra uygun olmayan sıcaklık derecesinde (5-60 ˚C) uzun süre muhafaza edilmesinin bakteriyel gelişmeyi hızlandırarak salgının ortaya çıkmasına neden olduğu belirtilmiştir (Cowell ve ark., 2002).

Kuveyt'te çeşitli resturanlarda çalışan ve gıda ile temas halinde olan kişilerden alınan svap örnekleri *S. aureus* ve koagulaz negative stafilokokların varlığı yönünden analiz edilmiş ve bu kişilerin stafilokokal intoksikasyon açısından olası bir risk oluşturup oluşturmadığı incelenmiştir. Personelin el ve burun mukozasından alınan svap örneklerinden 32 *S. aureus* ve 142 koagulaz negatif stafilokok olmak üzere, toplam 174 stafilokok izolatı elde edilmiştir.

S. aureus'un % 12.5, koagulaz negative stafilokokların % 8 düzeyinde SEA, AEB ve SEC' yi tek başına ya da birlikte sentezledikleri ve izolatların en çok SEB'yi ürettikleri bulunmuştur. İzolatların % 7'sinde TSST-1 tespit edilmiştir. Bu çalışmanın

sonucunda, *S. aureus* dışında bazı koagulaz negative stafilokoklarında enterotoksijenik olduğu ve gıda zehirlenmesi olgularında bunun dikkate alınması gerektiği belirtilmiştir (Udo ve ark., 1999).

Brezilya'da 1999 yılı Şubat ve Mayıs aylarında iki tane gıda kaynaklı salgının meydana geldiği bildirilmiştir. İlk salgında 50 kişinin etkilendiği ve intoksikasyona ilişkin semptomların (diyare, kusma, baş dönmesi, titreme ve baş ağırısı) kontamine peyniri tüketen kişilerde 2 saat içinde görüldüğü belirtilmiştir. İkinci salgında etkilenen 328 kişide kontamine çiğ süt tüketimine bağlı olarak diyare ve kusma görülmüştür. Yapılan mikrobiyolojik analizler sonucunda, peynirden *S. aureus* ve çiğ sütten koagulaz negatif stafilokoklar izole edilmiştir. Kontamine peynirlerde SEA, SEB ve SEC saptanırken, çiğ sütte SEC ve SED bulunmuştur. Bunun sonucunda, ilk salgından sorumlu tutulan peynirin gıda ile temas halinde olan kişiler tarafından kontamine edildiği, çiğ sütün kontaminasyonunda ise mastitisin rol aynadığı bildirilmiştir (Do Carmo ve ark., 2002).

1.12. Korunma ve Kontrol

Stafilokokal intoksikasyonların asıl oluşum nedenleri arasında gıdaların yetersiz pişirilmesi ve soğutulması ile yetersiz personel hijyeni bulunmaktadır. Özellikle ısı işlemi görmüş gıdaların insanlar tarafından kontaminasyonunu takiben uzun süre ortam sıcaklığında tutlması sonucunda stafilokoklar hızlı gelişerek toksin oluşturmakta ve toksin içeren gıdaların tüketilmesine bağlı olarak intoksikasyon meydana gelmektedir. Stafilokokal intoksikasyonlardan korunma ve kontrolde aşağıda belirtilen noktalara dikkat edilmelidir (Bremer ve ark., 2004; Rilla ve ark., 2004; Bhatia ve Zahoor, 2007; Erol 2007).

1) Gıdalarla temas edecek yüzeyler ile alet ve ekipmanın temizlik ve dezinfeksiyonu etkin bir şekilde yapılmalsı aynı zamanda Personel hijyenine yönelik etkin ve titiz uygulamalar ile stafilokokların insanlardan gıdalara bulaşması önlenmelidir.

2) Stafilokokal intoksikasyonları önlemek için gıdaların uygun koşullarda muhafaza edilmesi önem taşımaktadır .Isı işlemi görmüş ürünlerin rekontaminasyonu önlenmeli ve soğuk muhafazası (<6.7^0 C) sağlanmalıdır.

3) *S. aureus* rekabetçi özelliği zayıf bir bakteri olup, gıdada başlangıçtaki sayısı yüksek olmadığı durumlarda iyi gelişemez. Fermente gıdaların mikrofloralarında bulunan laktik asit bakterilerinin ve oluşturdukları latik asit, hidrojen peroksit ve bakteriyosin *S. aureus*'un gelişmesini baskılar.

4) Stafilokokal intoksikasyonlarda sıklıkla sorumlu tutulan gıdalar arasında kontamine süt ve süt ürünleri bulunmakta olup, bu kapsamda öncelikle süt veren hayvanlarda meme sağlığına ve sağım hijyenine özen gösterilmelidir.

5) Süt pastörize edilerek kullanılmalı ve pastörizasyon sonrası kontaminasynolar önlenmelidir. Özellikle pastörize sütten üretilen peynirlerin pastörizasyon sonrası enterotoksijenik *S. aureus* ile kontamine olmasının yarışmacı mikrofloranın yokluğuna bağlı olarak stafilokokal intoksikasyonlar açısından daha büyük risk oluşturduğu belirtilmektedir.

6) Kasaplık büyük ve küçük baş hayvanlar ile özellikle kanatlı hayvan kesimi, parçalanması ve etlerin ürünlerine işlenmesinde her türlü hijyenik ve teknolojik koşulların uygunluğu sağlanmalıdır

7) Gıda işletmelerinde Tehlike Analizleri, iyi Üretim ve Hijyen Uygulamalarına yönelik Gıda Güvenliği Sistemleri esas alınmalıdır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. GEREÇ

Bu çalışma kapsamında, 2011 yılının Şubat ve Ekim ayları arasında değişik firmalar tarafından Ankara'da paketlenmiş olarak tüketime sunulan, 40 paket tavuk kanat, 40 paket tavuk but, 40 paket tavuk göğüs olmak üzere toplam 120 paket tavuk eti örneği gereç olarak kullanılmıştır.

2.1.1.Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi Amacıyla Kullanılan Antibiyotik Diskleri

İzolatların antibiyotik direncini tespit etmek amacıyla Kirby-Bauer disk difüzyon tekniği ile NCCLS 2011 önerileri dikkate alınarak Mueller Hinton Agar'da (Oxoid CM0337) gentamicin (30 µg, Oxoid CT0072B), oxacillin (1 µg, Oxoid CT0159B), ampisillin (10 µg, Oxoid CT0003B), imipenem (10 µg, Oxoid CT0455B), teicoplanin (30 µg, Oxoid CT0647B), tetracycline (30 µg, Oxoid CT0054B), erythromycin (30 µg, Oxoid CT 0021B), vancomycin (30 µg, Oxoid, CT0058B), Amoxicilline (30 µg, Oxoid CT02223), oxytetracycline (30 µg, Oxoid CT0041B), Ciprofloxacin (5 µg, Oxoid CT0425B), Cephalothin (30 µg, Oxoid CT0010B), Ceftriaxone (30 µg, Oxoid CT0417B), Streptomycin (25 µg, Oxoid CT0048B) antibiyotik diskleri kullanılarak belirlendi.

2.1.2. *S.aureus*'un İzolasyon, İdentifikasyonunda ve Örneklerin Analiznde Kullanılan Besiyerleri ve Test Malzemeleri

Mikrobiyolojik analizlerde Baird-Parker Agar Base (Oxoid; CM0275), Brain Heart Infusion Broth (Oxoid; CM 0225), Tryptone Soya Agar (Oxoid; CM0131), Peptone Water (Oxoid; CM0009), Egg Yolk-Tellurite Emulsion (Oxoid; SR0054), Mannitol Salt Agar (Oxoid; CM0085), DNase Agar (Oxoid; CM0321), Mueller Hinton Agar (oxoid; CM337), tüpte koagulaz testi için Lyophilized Coagulase Rabbit Plasma with EDTA (Oxoid; R21060), Columbia Blood Agar (oxoid; CM0331) kullanıldı. Çalışmada *S. aureus*'un identifikasyonu Microbact 12S Staphylococcal Identification System (Oxoid MB1561) test kiti kullanılarak yapıldı.

2.1.2.1. Baird-Parker (BP) Agar Base (OXOID; CM0275)

Bu hazır besiyerinden 63 g alınarak 1000 ml distile suda çözündürüldü, pH değeri 6.8 ± 0.2'ye ayarlandıktan sonra sıcak su banyosunda tamamen eritildi. 121 ^{0}C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildikten sonra 50 ˚C ye'kadar soğutuldu ve üzerine 50 ml Egg-Yolk Tellürit Emülsiyon (Oxoid SR0054) ilave edilerek karıştırıldı. Besiyeri steril petrilere 12-13 ml miktarında dökülerek hazırlandı (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Baird Parker (BP) Agarda *S. aureus* Kolonilerinin Görünümü

2.1.2.2. Egg Yolk Tellurite Emulsion (OXOID; SR0054)

Yumurta sarısı emülsiyonu Potasyum tellürit içermektedir. Kullanıma hazır sıvı şekilde 100 ml' lik formdadır.

2.1.2.3. Trypton Soya Agar (TSA) (OXOID; CM0131)

Bu hazır besiyerinden 40 g alınarak 1000 ml distile suda çözündürülerek, pH değeri 7.3 ± 0.2'ye ayarlandıktan sonra sıcak su banyosunda tamamen eritildi. 16x150 mm'lik tüplere aktarılarak 121 0C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildikten sonra yatık şeklinde hazırlandı.

2.1.2.4. Mueller Hinton Agar (OXOID; CM337)

Hazır besiyerinden 36 g alınarak 1000 ml distile suda çözündürülerek, pH değeri 7.3 ± 0.2'ye ayarlandıktan sonra sıcak su banyosunda tamamen eritildi. 16x150 mm'lik tüplere aktarılarak 121˚C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildikten sonra 50˚C'ye kadar soğutuldu ve besi yeri steril petrilere yaklaşık 4 mm kalınlıkta dökülerek hazırlandı.

2.1.2.5. Columbia Blood Agar Base (OXOID; CM0331)

Hazır besiyerinden 39 g alınarak 1 litre distile suda çözdürüldü. Besiyerinin pH değeri kontrol edilerek (7.3±0.2, 25 °C'de) ayarlandı ve sıcak su banyosunda homojen olacak şekilde eritildi. Otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edildikten sonra 50 °C'ye kadar soğutuldu ve üzerine 70 ml steril defibrine koyun kanı eklenerek toplam hacimde % 7'lik kan içerecek şeklinde hazırlandı. Besi yeri steril petrilere dökülerek 4°C'de muhafaza edildi.

2.1.3. PCR'da Kullanılan Malzemeleri

Taq DNA Polymerase (Promega M3005, Madison, ABD)	500 U (5 U/ µl)
PCR Buffer with KCL (Fermentas Lot 00073162)	10X
$MgCl_2$ (DR.ZEYDANLI K.No: D2MG-15 Lot:1201S6)	25 mM
dNTP s (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	10 mM
(DR.ZEYDANLI K.No: DZ010-25 Lot: 0903M10-01)	

2.1.3.1. DNA Marker

DNA Ladder Plus (BIORON)	100 bp

2.1.3.2. Pozitif Suşlar

Bu çalışmada *S. aureus*'un izolasyon, identifikasyon ve PCR analizlerinde *S. aureus* ATCC 13565 (*sea* geni için), *S. aureus* ATCC 14458 (*seb* geni için), *S. aureus* ATCC

19095 (*sec* geni için), ve *S. aureus* 90-S-1025 (*sed* geni için), *Staphylococcus aureus* SR27 (*mecA* geni için), *erm(*A), *erm*(C), *tet*(M) ve *tet*(K) genleri içeren stafilokok izolatlarına ait DNA'lar kullanılmıştır.

2.1.3.3. Primer Çiftleri

Çizelge 2.1'de *S. aureus*'a ait primer genleri ve dizinleri gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. S. *aureus*'un toksin genlerinin primer dizilimi (Mehrotra ve ark., 2000).

Primerler	Primer dizisi (5' – 3')	Size (bp)	Gen	Kaynak Makale
***nuc* F** ***nuc* R**	AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT	270	*nuc*	Brakstad ve ark., 1992
***sea* F** ***sea* R**	CGG CAC TTT TTT CTC TTC GC GGT TAT CAA TGT GCG GGT GG	102	*sea*	Mehrotra ve ark., 2000
***seb* F** ***seb* R**	CCA AAT AGT GAC GAG TTA GG GTA TGG TGG TGT AAC TGA GC	164	*seb*	Mehrotra ve ark., 2000
***sec* F** ***sec* R**	CAC ACT TTT AGA ATC AAC CG AGA TGA AGT AGT TGA TGT GTA TGG	451	*sec*	Mehrotra ve ark., 2000
***sed* F** ***sed* R**	ATT GGT ATT TTT TTT CGT TC CCA ATA ATA GGA GAA AAT AAA A	278	*sed*	Mehrotra ve ark., 2000
16s rRNA F **16s rRNA R**	AAC TCT GTT ATT AGG GAA GAA CA CCA CCT TCC TCC GGT TTG TCA CC	750	*16s rRNA*	Maese ve ark., 2002
***erm*(C) F** ***erm*(C) R**	AAT CGT CAA TTC CTG CAT GT TAA TCG TGG AAT ACG GGT TTG	299	*erm(C)*	Strommenger ve ark., 2003
***erm*(A) F** ***erm*(A) R**	AAG CGG TAA ACC CCT CTGA TTC GCA AAT CCC TTC TCA AC	190	*erm(A)*	Strommenger ve ark., 2003
***mecA* F** ***mecA* R**	CCT AGT AAA GCT CCG GAA CTA GTC CAT TCG GTC CA	314	*mecA*	Choi ve ark., 2003.
***tet*(K) F** ***tet*(K) R**	GTA GCG ACA ATA GGT AAT AGT GTA GTG ACA ATA AAC CTC CTA	360	*tet(K)*	Strommenger ve ark., 2003
***tet*(M) F** ***tet*(M) R**	AGT GGA GCG ATT ACA GAA CAT ATG TCC TGG CGT GTC TA	158	*tet(M)*	Strommenger ve ark., 2003

2.1.3.4. Lysostaphin (Sigma, L7386-1MG, USA): Şişe üzerine 1ml distile su konuldu.

Elde edilen solüsyon 1000 µg/ml düzeyinde olduğu için bu solüsyondan 100 µl alınarak 900 µl distile su konur ise 100 µg/ml elde edilmiş olur. Kullanıncaya kadar -20 ˚C' de bekletildi.

2.1.3.5. Proteinase-K (Amresco, 0706-100MG, USA): 10 mg Proteinase K alınarak 100 ml distile su içerisinde çözündürüldü. Elde edilen solüsyon 100 µg/ml olarak değerlendirildi ve -20°C'de çalışma sonuna kadar bekletildi.

2.1.3.6. Agaroz Jel (Cambrex SeaKem LE Agarose, Rockland, ABD): Agaroz jel (% 1,5'lık) hazırlamak için, agaroz (Cambrex SeaKem LE Agarose, Rockland, ABD) 0.9 g tartılarak 60 ml 1X TBE içeridinde 95 ºC su banyosunda homojen hale gelecek şekilde çözdürüldü ve yaklaşık 50 ºC'ye soğutuldu. İçerisine 60 µl ethidium bromide eklendi ve elektroforez küvetine (MINICELL EC 370 M) döküldü.

2.1.3.7. TBE Solüsyonu (Tris-Borik Asit-EDTA)

TBE 10 X Solüsyonu (DZ. TBE 10- 1, Lot No: 0803S7)

Tris	0.89 M
Borik asit	0.89 M
EDTA	0.02 M

Elektroforez tankının içine konulacak elektrolit sıvısı olarak genelde TAE (Tris-asetikasit-EDTA) ve TBE (Tris-borik asit-EDTA) solüsyonları kullanılmaktadır. Stok TBE solusyonu 10X olduğu için 10 ml alarak 90 ml distile suda sulandırıldı ve 1X TBE olacak şekilde hazırlandı.

2.1.3.8. Ethidium Bromide (% 0.1'lik)

Ethidium Bromide (AppliChem A 1152 GmbH, Darmstadt, Almanya)

Ethidium Bromide 10 mg/ml

Ethidium Bromide (AppliChemA115 GmbH, Darmstadt, Almanya) stok solüsyonundan 1:9 oranında sulandırarak 1µg/ ml konsantrasyonda kullanıldı.

2.2. Yöntem

Ankara'da farklı markalardan satışa sunulan tavuk but, kanat ve göğüs paketleri örnek alınarak, soğuk zincir altında ve aseptik koşullar altında laboratuvara getirildikten hemen sonra mikrobiyolojik ekimler yapıldı.

2.2.1. Gıda Örneklerinin Analize Hazırlanması ve Katı Besiyerlerinde Ekim

Tavuk et paketleri marketten alınıp soğuk zincir altında laboratuvara getirildikten hemen sonra *Staphylococcus aureus* yönünden analiz edildi. Her bir tavuk örneğinden aseptik koşullarda homojen olarak 25'er gram tartılıp filtreli steril stomacher poşetlerine konuldu. Örneklerin üzerine 225'er ml % 0.1'lik steril peptonlu su (Oxoid, CM 0009) ilave edilerek, karışım stomacher'de (Lab Blender 400, Sewart-England) 2 dk süre ile homojenize edildi. Bu homojenat ($10^{-1,}$ lik dilüsyon) ve 16x150 mm'lik steril tüplerde 9'ar ml olarak hazırlanan peptonlu su kullanılarak 10^{-4}'e kadar desimal dilüsyonlar hazırlandı. Her dilüsyondan yayma plak tekniği kullanılarak 0.1 ml Baird-parker agara (Oxoid CM0275, Egg Yolk Tellurite Emulsion Oxoid SR0054) ekimler yapıldı ve plaklar 37 ^{0}C'de 24-48 saat süre ile aerob ortamda inkübasyona bırakıldı.

2.2.2. Mikrokok/Stafilokokların Saptanması

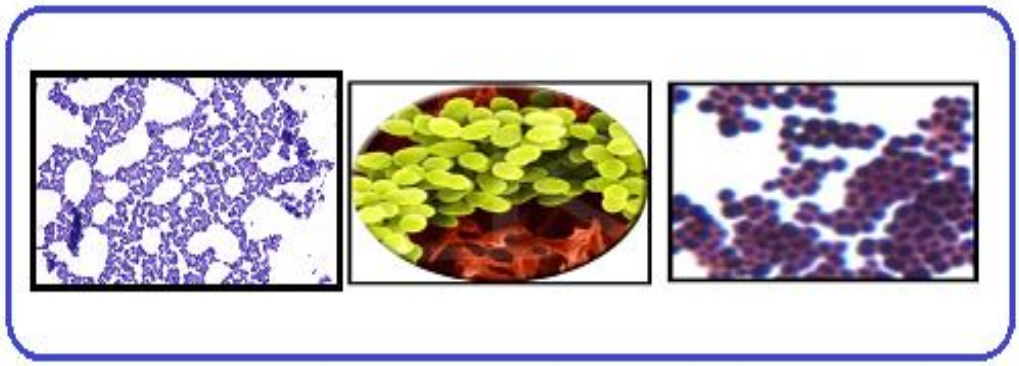
İnkübasyon sonunda siyah, parlak, konveks, 1-1.5 mm çapında, etrafında dar beyaz bir kuşak ve bunu çevreleyen berrak zon oluşturan lesitinaz pozitif koloniler ile kahverengi ya da siyah renkte küçük zonsuz koloniler mikrokok/stafilokok olarak değerlendirildi (Bennett ve Lancette, 1998). Bunlardan 5 adede kadar koloni seçildi. *S. aureus* şüpheli kolonilerden biyokimyasal testler yapıldı. Buna göre Gram boyama, Katalaz (% 3 H_2O_2), Mannitol testi, Dnase, oksidaz ve Koagulaz testleri yapılarak identifiye edildi. Elde edilen izolatlar Microbact Staph 12S testi için 16x150 mm'lik tüplerde Tryptone soya Agar (Oxoid CM0131) yatık besiyerlerine alınarak 37 $^{\circ}$C'de 24-48 saat aerob ortamda inkübe edildikten sonra buzdolabına kaldırıldı. Microbact Staph 12S kiti

(Oxoid, MB1561) sonucundan elde edilen izolatlar *S. aureus* olarak tespit edildikten sonra PCR analizi ile genlerinin tespiti yapıldı.

2.2.3. *Staphylococcus*'ların ve *Micrococcus*'ların Ayrımında Kullanılan Testler ve Besiyerleri

2.2.3.1. Gram Boyama:

Lam üzerine bir damla % 0.9'luk NaCl çözeltisinden alınarak şüpheli koloniler öze yardımıyla fizyolojik tuzlu su içerisinde homojen bir şekilde dağıtıldı. Daha sonra alevin üzerinde pensle tutularak kurutuldu ve bakteriler tespit edildi. Preparatlar kristal viyole ile 1-2 dakika boyandıktan sonra saf su ile yıkandı. Bir dakika lugol çözeltisi uygulamasını takiben önce % 96'lık alkol ile dekolore edilerek sonra saf su ile yıkandı. Yıkanan preparatlar sulu karbon fuksin çözeltisi ile 10-20 saniye boyandıktan sonra tekrar saf su ile yıkanıp kurutuldu. Bu şekilde Gram boyaması yapılan preparatlar mikroskobun (Nikon Alphaphot-2, Japonya) immersiyon objektifinde incelendi ve mavimenekşe renkli, yuvarlak çubukçuk formunda görülen mikroorganizmalar Gram pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 2.2.1).



Şekil 2.2.1. Gram Boyamada *S. aureus*'un mikroskobik görünümü

2.2.3.2. Oksidaz Testi

N, N, dimetil p-fenilendiamin dihidrokloridin %1' lik çözeltisi hazırlanarak Whatman NO, 1 kurutma kağıdına emdirildi. Bu kurutma kağıdının üzerine, *Staphylococcus*

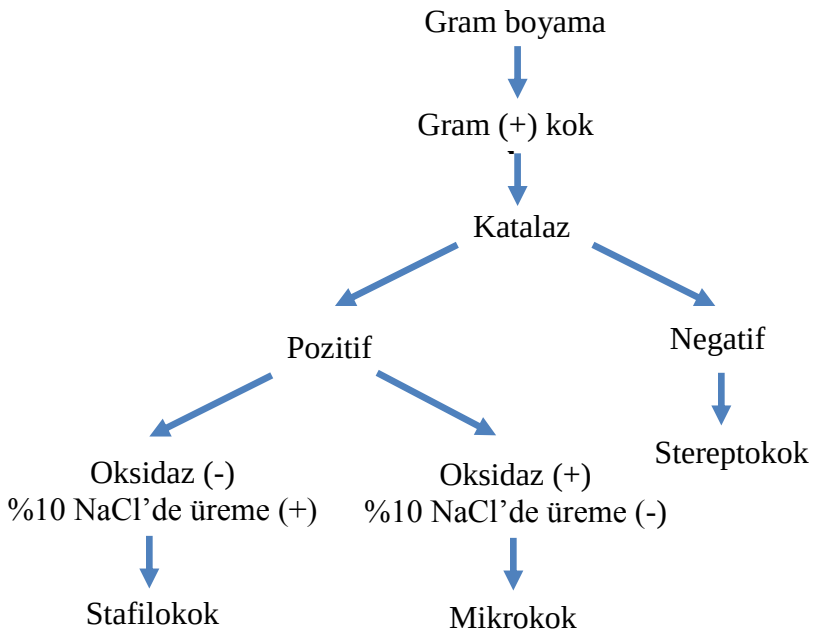
kolonileri öze ile alınarak reaksiyona sokuldu. 5-10 saniye içinde renk oluşturmayan koloniler oksidaz negatif, mavi renk oluşturan koloniler oksidaz pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 2.2.2).



Şekil 2.2.2. Oksidaz testi

2.2.3.3. Katalaz Testi

Bir lam üzerine, % 3'lük H_2O_2 solüsyonundan alınarak üzerine öze yardımı ile şüpheli *S.aureus* kolonisinden konulup karıştırıldı. 2-3 saniye içerisinde köpürme şeklindeki gaz kabarcıkları halinde görünebilmesi pozitif olarak değerlendirilen koloniler *Staphylococcu*s olarak tanımlanmıştır (Winn ve ark., 2006).



Şekil 2.2.3. Gram pozitif kokların adlandırılmalarında takip edilen yol

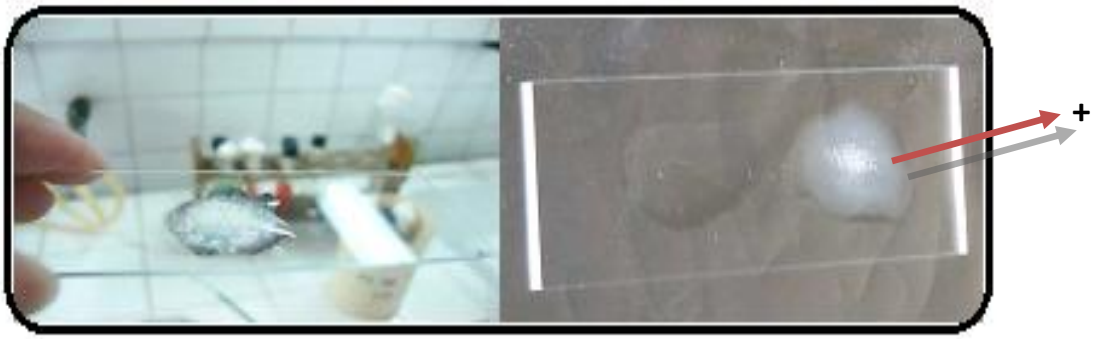


Şekil 2.2.4. Lamda katalaz testi

2.2.4. Koagulaz Pozitif Stafilokok'ların ve KNS'lerin İdentifikasyonunda Yapılan Testler ve kullanılan Besiyerleri

2.2.4.1. Lamda Koagulaz Testi:

Temiz bir lam üzerine bir damla SF (Serum fizyolojik) koyulduktan sonra test edilecek suşların kanlı agardaki 18-24 saat inkübe olan kültürlerinden platin öze ile alınan kolonilerden ilave edilip SF'de homojenize olması sağlandı. Sonrasında bir damla Coagulase Plasma Whit EDTA (Oxoid R21060) damlatılarak özeyle dairevi bir hareketle karıştırılıp 10-15 sn içinde kümeleşmenin görülmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 2.2.5).



Şekil 2.2.5. *S. aureus*'un lamda aglütinasyonu

2.2.4.2. Tüpte Koagulaz Testi

Lesetinaz pozitif koloniler 16x150 mm'lik tüplerde Tryptone Soya Agar (Oxoid, CM0131) yatık besiyerlerinde pasajlanarak 37^0C'de 18-24 saat aerob koşullarda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda yatık besi yerleri daha sonra tüpte koagulaz

testi yapılmak üzere buzdolabına kaldırıldı. Koagulaz pozitif stafilokokların saptanması, Benet ve Lancette (1998) tarafından belirtilen yönteme göre yapıldı. Bu amaçla yatık agar üzerinden alınan koloniler, içerisinde 4-5 ml Brain Heart Infusion Broth (Oxoid, CM0225) buluan tüplerde süspanse edilerek, broth kültürü 37 ^{0}C' de 18-24 saat aerob koşullarda inkübasyona bırakıldı. Liyofilize EDTA'lı tavşan plazması (Lyophilized Coagulase Rabbit Plasma with EDTA, Oxoid, R21060) 5ml steril distile su ile sulandırıldıktan sonra, steril koagulasyon tüplerine 0,5'er ml konularak paylaştırıldı. Daha sonra plazmaların üzerine kültür süspansyonundan 0.3 ml ilave edilip, 37^{0}C'de aerob koşullarda inkübasyona bırakıldı. İlk 6 saat boyunca 30 dk aralıklarla tüplerde koagulasyon kontrol edildi ve koagulasyon gözlenmeyen tüpler 24 saat tekrar inkübasyona bırakıldı. Testin sonucunda koagulasyonun olmadığı, kültür süspansiyonunun başlangiçtaki gibi homojen olduğu tüpler negatif, belirgin pıhtı oluşumu gözlenen tüpler ise pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 2.2.6.).



Şekil 2.2.6. *S. aureus*'un tüpte aglütinasyonu

2.2.4.3. Deoksiribonükleaz (DNase Testi): Patojenik ve apatojenik *Staphylococcus* suşlarının ayrımı için DNase testinden de yararlanılmaktadır. Ayrıca Stafiloklarda DNase üretimi koagulazdan sonra patojeniteyi belirleyen en önemli bir kriter olarak kabul edilmiştir. Enzim niteliğindeki bu madde DNA'yı hidrolize eder. *S. aureus* izolatları DNA bulunan besiyerinde DNase enzimi vasıtası ile ortamda bulunan DNA'yı hidrolize ederler ve besiyerinde renk değişimine neden olurlar. Bu test ile izolatlarda

Dnase enziminin varlığı belirlendi. Yatık agar üzerinden alınan koloniler, içerisinde 4-5 ml Brain Heart Infusion Broth (Oxoid, CM0225) buluan tüplerde süspanse edilerek, broth kültürü 37 ˚C'de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda Dnase agarda üreyen kolonilerin üzeri 1N HCL asit ile kaplanıp koyu zeminde incelendi. Birkaç dakika içinde kolonilerin etrafında berrak bir zonun oluşması pozitif, opak bir alanın oluşması ise negatif olarak değerlendirildi (Anon, 2010b; Koneman ve ark., 1992).

2.2.4.4. Mannitol Testi: Çoğu *Staphylococcus* türü, mannitol'ü aerobik olarak hidrolize ettiği halde anaerobik olarak fermente etmezler. *S. aureus*'un büyük bir çoğunluğu mannitol'ü hem aerop hem de anaerop olarak fermente eder. Özellikle, mannitol'ün anaerobik fermantasyonu *S.aureus*'un diğer türlerden ayırt etmekte sıklıkla kullanılmaktadır. Test edilecek izolatın BHIB (Brain Heart Infusion Broth)'daki 18-24 saatlik kültüründen mannitol bulunan tüplere 1ml ilave edildi. 37˚C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında besiyerinde gözlenen renk değişikliğine göre sonuçlar değerlendirildi. Besiyerinde sarı renk değişikliği pozitif olarak kabul edildi (Koneman ve ark., 1992). (Şekil 2.2.7).

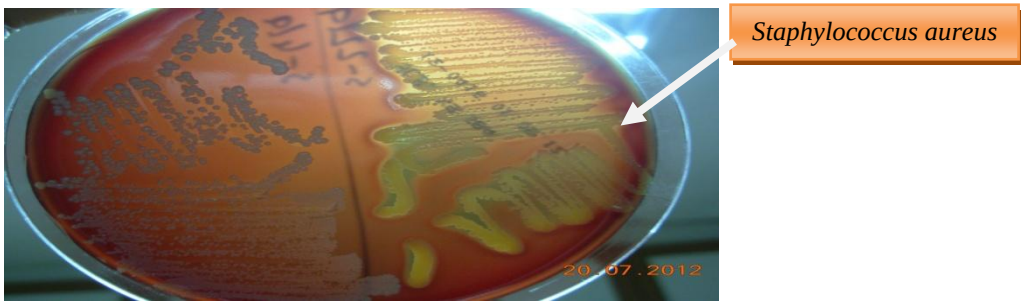


Şekil 2.2.7. Mannitol Testi

2.2.4.5. Hemoliz Testi

Test edilecek izolatın BHIB' deki 18-24 saatlik taze kültürlerinden bir öze dolusu alınıp, kanlı agara ekilmiştir. 37˚C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonucunda hemoliz oluşturanlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Tham ve ark., 1997).

pH 7.3± 0.2'e ayarlandıktan sonra toz halindeki Blood-Agar besiyerinden 40 gr tartılıp 1000 ml distile su içinde çözülmüştür. 121˚C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Otoklavdan çıkan besiyerleri 40-45 ^{0}C' ye kadar soğutulduktan sonra % 5 oranında kan ilave edilerek karıştırıldıktan sonra steril plaklara dökülmüştür (Şekil 2.2.8).



Şekil 2.2.8. *S. aureus* kolonilerin kanlı agar besiyerinde görünümü

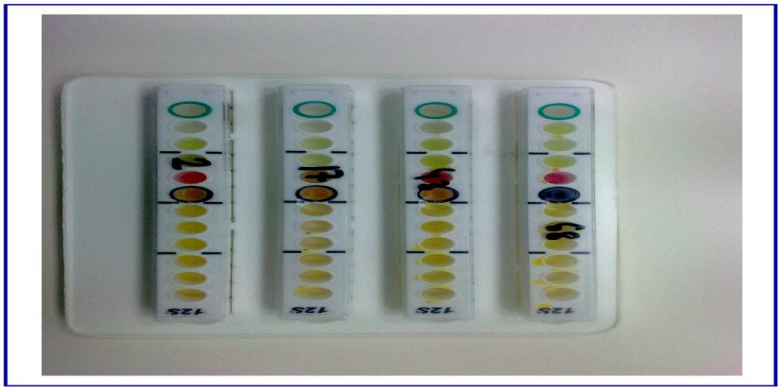
Çizelge 2.2.1. *S. aureus*'un identifikasyonu için kullanılan testler

Etken	Gram boyama	Katalaz	Mannitol	Dnase agar	Koagulaz	Oksidaz
S. aureus	+	+	+	+	+	-

2.2.5. *S. aureus*'un İdentifikasyonu

S. aureus'un identifikasyonu Microbact 12S Staphylococcal Identification System (Oxoid, MB1561) test kiti kullanılarak, kitte belirtilen yönteme uygun olarak yapılmıştır (Rhoden ve Miller, 1995; Bascomb ve Manafi, 1998). Yatık agar üzerinden alınan koloniler, içerisinde 4-5 ml Brain Heart Infusion Broth (Oxoid, CM0225) bulunan tüplerde süspanse edilerek, broth kültürü 37^{0}C' de 18-24 saat aerob koşullarda inkübasyona bırakıldı. Broth kültürlerinden bir öze dolusu alınarak Baird Parker Agar'a

(BP, Oxoid, CM0275; Egg Yolk Tellurite-Emulsion, Oxoid,SR0054) çizme yöntemi ile ekim yapılarak 37^0 C'de 24-48 saat aerob koşullarda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda üreyen stafilokok kolonilerinden 2-5 koloni (çaplarına göre değişir) alınarak, kitin içerisinde mevcut olan 3 ml'lik Staphylococcal Suspending Media (Oxoid, 1494) içerisinde suspense edildi ve homojen bir karışım olması için iyice karıştırıldı. Daha sonra test stripleri ambalajindan çıkarılarak üzerlerindeki kapatıcı açıldı ve uygun etiketleme yapıldı. Her bir test stribi 12 reaksiyonun gerçekleşmesine uygun olarak 12 kuyucuk içermektedir. Steril bir pipet yardımıyla her bir kuyucuğa kültür süspansiyonundan 100 µl konuldu ve ayrıca 7 nolu kuyucuğa (strip üzerinde siyah halka ile işaretlenmiş kuyucuk) 2 damla steril mineral oil (Oxoid, MB1093A) eklenerek, kapatıcı tekrar kapatıldı. Ekim yapılmış olan stripler 37^0C'de 18-24 saat aerob koşullarda inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda, striplerin üzerindeki kapatıcı açıldı. 12 nolu kuyucuğa (strip üzerinde yeşil halka ile işaretlenmiş kuyucuk) 1damla Fast Blue Reagent (Oxoid, MB1588A) eklenerek, 5-10 s içinde oluşan erik moru rengi pozitif olarak değerlendirildi. Arginin sonuçları 24 saat sonunda yorumlanmadığı taktirde tekrar inkübasyona bırakılarak daha sonra okundu (Şekil 2.2.9).



Şekil 2.2.9. Microbact Staph 12S kitinin görünümü

Kit içeriğinde yer alan rapor formlarında bulunan renk skalası kullanılarak tüm kuyucuklardaki reaksiyonlar pozitif ya da negatif olarak değerlendirilip forma yazıldı. Tüm sonuçlar rapor formuna yazıldıktan sonra, üçlü reaksiyonların olduğu her bir blokta pozitif reaksiyonlara karşılık gelen rakamlar toplanarak not edildi ve elde edilen 5

basamaklı kod bilgisayarda Microbact Computer Aided Identification Software programına (Oxoid, MB1244A) girilerek değerlendirildi.

2.2.6. *S. aureus* İzolatlarının Multipleks PCR ile Moleküler Tiplendirmesi

İzolatların PCR ile analizinde kullanması amacıyla DNA ekstraksiyonu işlemi yapıldı ve PCR koşulları optimize edildi. İlk aşamada *S. aureus*' ların *nuc* geni Brakstad ve ark (1992), tarafından önerilen yönteme göre tespit edildi. İkinci aşamada ise multipleks PCR kullanılarak Mehrotra ve ark (2000), tarafından önerilen *sea, seb, sec, sed* gen sekansları esas alınarak toksin genleri yönünden moleküler karakterizasyonu yapıldı. Kullanılan primer çiftleri Çizelge 2.1.'de gösterilmiştir.

2.2.6.1. DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu için, Tryptone Soya Agar (Oxoid, CM0131) yatık besi yerlerinde pasajlanarak +4 ˚C de muhafaza edilen izolatlar Brain Heart Infusion Broth (Oxoid, CM0225) bulunan tüplerde süspense edilerek 37 ˚C de 18-24 saat aerob koşullarda inkübasyona bırakıldı. Broth kültüründen 0.1 ml eppendorf tüpüne alınarak 16 000 g'de 30 sn satrifüj (Eppendorf Centrifuge 5417R) edildi. 50 µl lizostafin (Sigma-Aldrich, L7386) (100µg/ml) içerisinde süspense edildi ve bu süspansiyon 37 ˚C de 10dk inkübasyona bırakıldı. Hücre süspansiyonuna 50 µl proteinaz K (Amresco, AI0706-100) (100 µg/ml) ve 150 µl buffer solüsyonu (10 mM Tris-Hcl pH 8.3) ilave edilerek, tekrar 37 ˚C de 10 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra kaynar su banyosunda 5 dk tutuldu ve bu işlemin sonunda hemen buz üzerine alınarak örnekDNA olarak -20 ˚C de muhafaza edildi (Ünal ve ark., 1992).

2.2.6.2. *S. aureus*'un *nuc* geni tespiti

S. aureus'a spesifik olan *nuc* geni Braksatd ve ark (1992), tarafından önerilen standart PCR yöntemi ile tespit edilmiştir.

2.2.6.3. PCR Protokolü ve Amplifikasyonu: Standart PCR, 50 µl hacimde Master mix hazırlanarak gerçekleştirildi. PCR tüplerinde 1.8 µl 10 x PCR buffer Whit KCL (Fermentas Lot 00073162), 1.5µl (25mM) $MgCl_2$ (DR.ZEYDANLI K.No: D2MG-15 Lot:1201S6) 1.25µl dNTP karışımı (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (BIORON), 0.30 µl Taq DNA polimeraz (DR.ZEYDANLI K.No: DZTQ-5 Lot: 1201S3) ve 0.30µl her bir *nuc* primerden ilave ederek hazırlanan karışım vortekslendi. Elde edilen Master mix'den 50'şer µl alınıp Thermowell tüplere (Corning 3749, Thermowell Gold PCR Tubes, 0.8 ml, USA) konulmuş ve üzerine 5µl template DNA ilave edilmiştir. Elde edilen toplam 50 µl hacimdeki PCR karışımı yeniden vortekslenerek üzerine buharlaşmanın önlenmesi amacıyla steril mineral yağ (Sigma M5904) ilave edildi. Amplifikasyon, Thermal Cyclerde (Biometra Personal Cycler) 94°C'de 1 dk denatürasyon, 55 °C'de 0,5 dk primer bağlanması (annealing) ve 72 °C'de 1,5 dk primer uzaması (extention) aşamalarını kapsayan 37 siklus ve sonunda 72°C'de 3,5 dk ilave ekstensiyon işlemlerinden oluşmuştur. Elde edilen amplikonlar agaroz jel elektroforez aşamasına kadar 4°C'de muhafaza edildi.

2.2.6.4. Agaroz Jel Elekteroforez: *nuc* geninin saptanması amacıyla, her bir örneğe ait 10 µl amplikon 2 µl boya (6xLoading Dye; Fermentas R 0611) ile boyandı. 1 µl/ml (% 0.1'lik) oranında Ethidium bromide (AppliChem A 1152 GmbH, Darmstadt, Almanya) içeren %1.5'lik agaroz jel (Cambrex SeaKem LE Agarose, Rockland, ABD) hazırlanarak TBE solüsyonu yardımıyla elekteroforez işlemi için hazırlandı. Daha sonra DNA marker, 10'ar µl hacimde ve 2 µl 6x Loading Dye ile boyanan pozitif kontrol(ATCC 25923) negatif kontrol (Aynı miktarda steril distile su, templaet DNA yerine Master mix'e eklenir), örneklere ait amplikonlar jeldeki kuyucuklara yüklenerek (Biometra - Max-System B15359) 100 voltta, 1 Amper'de (Biometra Power Pak P25) 1 saat süreyle elektroforez işlemi yapıldı. Bu işlem sonunda, pozitif kontrol ve DNA Marker yardımıyla elde edilen spesifik DNA bantları UV-görüntüleyici Transilluminator (Biometra T11 UV 9511011) ve jel görüntüleme sistemleri ile (Syngene Ingenus, Cambridge, İngiltere) belirlenerek değerlendirildi.

2.2.7. Multipleks PCR ile Toksin oluşturan Genlerinin Tespiti

2.2.7.1. Multipleks PCR Protokolü:

Multiplex PCR, 50 µl hacimde Master mix hazırlanarak gerçekleştirildi. PCR tüplerinde 8 µl 10 x PCR buffer Whit KCL (Fermentas Lot 00073162), 7.5 µl (25mM) $MgCl_2$ (DR.ZEYDANLI K.No: D2MG-15 Lot:1201S6), 5 µl dNTP karışımı (dATP,dCTP, dGTP, dTTP), (19 mM 250 µl K.No:DZ010-25 lot:1203S2), 1,25 µl Taq DNA polimeraz (DR.ZEYDANLI K.No: DZTQ-5 Lot: 1201S3), 0.30 µl her bir primerden (*nuc, sea, seb, sec*), ve 0.60 µl (*sed*) primerinden karışımlar hazırlandı. Vortekslenen karışımdan 50'şer µl alınarak Thermowell tüplere konulmuş ve üzerine 10 µl template DNA eklendi. Toplamda 60 µl olarak hazırlanan PCR karışımı tekrar vortekslenmiş ve üzerine buharlaşmanın önlenmesi amacıyla steril mineral yağ (Sigma M5904) ilave edilmiştir. Tüpler Thermal Cycler'a (Biometra Personal Cycler) yerleştirilmiş ve 94 °C'de 5 dakika ön denatürasyon, 94 °C'de 2 dk denatürasyon, 57 °C'de 2 dk primer bağlanması (annealing) ve 72 °C'de 1 dk primer uzaması (extention) aşamalarını kapsayan 35 siklus ve sonunda 72 °C'de 7 dk ilave ekstensiyon işlemlerinden oluştu. Elde edilen amplikonlar agaroz jel elektroforez aşamasına kadar 4°C'de muhafaza edildi.

2.2.7.2. Agaroz Jel Elektroforez

Her bir örneğe ait amplikondan 10 µl alınarak 2 µl 6x Loading Dye (Fermentas R 0611) ile boyandı. 1 µl/ml (% 0.1'lik) oranında Ethidium bromide (AppliChem A 1152 GmbH, Darmstadt, Almanya) içeren %1.5'lik agaroz jel (Cambrex SeaKem LE Agarose, Rockland, ABD) hazırlanarak üzerine yine TBE solüsyonu konularak jelin üstü tamamen kapatıldı. Daha sonra 10'ar µl hacimde ve 2 µl 6X Loading Dye ile boyanan pozitif kontroller *S. aureus* ATCC 25923 (*nuc* geni için), *S. aureus* ATCC 13565 (*sea* geni için), *S. aureus* ATCC 14458 (*seb* geni için), *S. aureus* ATCC19095 (*sec* geni için), 90-S-1025 (*sed* geni için), suşlarına ait amplikonlar, negatif control (steril distile su), DNA marker (BIORON) ve örneklere ait amplikonlar jeldeki kuyucuklara yüklenerek (Biometra Agagel- Max-System B15359) 100 voltta, 1Amper'de (Biometra Power Pak

P25) 1 saat süreyle elekteroforez işlemine tutuldu. Bu işlem sonunda, elde edilen spesifik DNA bantları UV-görüntüleyici (Biometra T11 UV 9511011) ve jel görüntüleme sistemlerinde (Syngene Ingenus, Cambridge, İngiltere) değerlendirildi.

2.2.8. Antibiyotik Dirençlilik Genlerinin PCR ile Saptanması

Ardiç ve ark. (2005), tarafından önerilen *mecA*, *tet*(K), *tet(*M), *erm*(A) ve *erm*(C) gen sekansları esas alınarak moleküler karakterizasyon yapıldı.

2.2.8.1. DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu için, Tryptone Soya Agar (Oxoid, CM0131) yatık besi yerlerinde pasajlanarak +4 ˚C de muhafaza edilen izolatlar Brain Heart Infusion Broth (Oxoid, CM0225) bulunan tüplerde süspense edilerek 37 ˚C de 18-24 saat aerob koşullarda inkübasyona bırakıldı. Broth kültüründen 0.1 ml eppendorf tüpüne alınarak 16 000 g'de 30 sn satrifüj (Hettich, Mikro200) edildi. 50 µl lizostafin (Sigma-Aldrich, L7386) (100µg/ml) içerisinde süspense edildi ve bu süspansiyon 37 ˚C de 10 dk inkübasyona bırakıldı. Hücre süspansiyonuna 50µl proteinaz K (Amresco, AI0706-100) (100 µg/ml) ve 150 µl buffer solüsyonu (10 mM Tris-Hcl pH 8,3) ilave edilerek, tekrar 37 ˚C de 10 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra kaynar su banyosunda 5 dk tutuldu ve bu işlemin sonunda hemen buz üzerine alınarak örnek DNA olarak -20 ˚C de muhafıza edildi (Ünal et al. 1992).

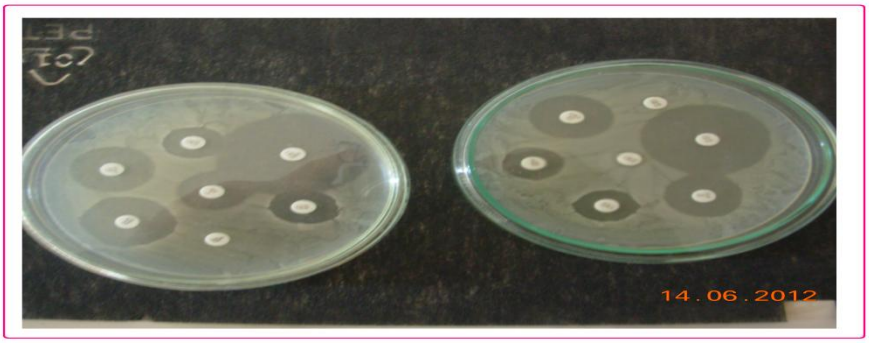
2.2.8.2. PCR Protokolü ve Amplifikasyonu: Standart PCR, 25 µl hacimde Master mix hazırlanarak gerçekleşti. PCR tüplerinde 2.5 µl 10x PCR buffer, 3 µl $MgCl_2$, 0.5 µl dNTP karışımı (dATP,dCTP,dGTP,dTTP), 0.25 µl 5U *Tag* DNA Polimeraz, 10 µM konsantrasyondaki her bir primerden 1µl) ilave edilerek hazırlandı. Vortekslenen karışımdan 20'şer µl alınıp Thermowell tüplere (Corning 3749, Thermowell Gold PCR Tubes, 0.8 ml, USA) konulmuş ve üzerine 5µl template DNA ilave edildi. Elde edilen toplam 25 µl hacimdeki PCR karışımı üzerine buharlaşmanın önlenmesi amacıyla steril mineral yağ (Sigma M5904) ilave edilmiştir. Daha sonra amplifikasyon, Thermal

Cycler'a (Biometra Personal Cycler) 95 ˚C de 1 dk ön denatürasyon, 95 ˚C de 2 dk denatürasyon, 54 ˚C de 1 dk primer bağlanması ve 54˚C de 1 dk primer uzama aşamalarını kapsayan 30 siklus ve sonunda 72 ˚C de 7 dk ilave ekstensiyon işlemlerinden oluşmuştur. Bu işlemler sonunda amplifikasyon ürünleri bir sonraki aşamaya kadar -20 ˚C de tutuldu.

Her bir örneğe ait amplikondan 10 µl alınarak 2 µl 6X Loading Dye (Fermentas R 0611) ile boyanmıştır. 1 µl/ml (% 0.1'lik) oranında Ethidium bromide (AppliChem A 1152 GmbH, Darmstadt, Almanya) içeren %1.5'lik agaroz jel (Cambrex SeaKem LE Agarose, Rockland, ABD) hazırlanarak üzerine yine TBE solüsyonu konularak jelin üstü tamamen kapatıldı. Daha sonra 10'ar µl hacimde ve 2 µl 6X Loading Dye ile boyanan (Methicillin resistant *S. aureus* SR27), ve pozitif kontrol aolarak *erm*(A), *erm*(C), *tet*(K) ve *tet*(M) genlerini içeren stafilokok izolatlarına ait DNA lar kullanılmıştir. DNA Marker (BIORON) ve örneklere ait amplikonlar jeldeki kuyucuklara yüklenerek elekteroforezde (Biometra Agagel- Max-System B15359) 100 voltta, 1Amper'de (Biometra Power Pak P25) 1 saat süreyle elekteroforez işlemine tutuldu. Bu işlem sonunda, elde edilen spesifik DNA bantları UV-görüntüleyici (Biometra T11 UV 9511011), jel görüntüleme sistemlerinde (Syngene Ingenus, Cambridge, İngiltere) pozitif kontroller ve DNA Marker yardımıyla belirlenmiştir.

2.2.9. Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi

İzolatların antibiyotik direnci disk difüzyon yöntemi ile belirlendi. Bu işlem, NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards 2011) tarafından bildirilen yöntem esas alınarak, Mueller Hinton Agar'da antibiyotik diskleri kullanılarak belirlendi.



Şekil 2.2.10. Müller hinton agar (Oxoid CM0337)

Direkt koloni süspansiyon metoduna göre, yatık agar üzerinden alınan koloniler, içerisinde 4-5 ml Brain Heart Infusion Broth bulunan tüplerde suspense edilerek, broth kültürü 35 ˚C de, turbiditesi 0,5 McFarland ($2x10^8$ kob/ml) standardına gelinceye kadar inkübasyona bırakıldı. Türbidite kontrolü NanoDrop spektrofotometrede (NanoDrop ND-100, Delaware, ABD) yapıldı. Broth kültürünün turbiditesi ayarlandıktan sonra, steril pamuk svap broth içerisinde daldırılıp, tüp çeperinde süzdürülerek Muller-Hinton agar yüzeyine inoculum svap tekniği ile yayıldı. Antibiyotik diskleri agar yüzeyi ile tamamen temas edecek biçimde Muller-Hinton agar yüzeyine yerleştirilerek 35 ˚C de 16-18 saat (oksasilin, metisilin ve vankomisin direncinin belirlenmesi için 24 saat) inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda disklerin etrafında oluşan inhibisyon zonlarının çapı NCCLS'ye göre değerlendirildi (Şekil 2.2.10).

2.2.10. İstatistiksel Analizler

Önemlilik testlerine geçmeden önce veri setinin normal dağılıma uygunluğuna Kolmogorov Smirnov, varyansların homojenliğine ise Levene testi ile bakıldı. Elde edilen ölçümler bakımından gruplar arası farklılığın önem kontrolü tek yönlü varyans analizi ile yapıldı. Çoklu karşılaştırma testi olarak Tukey testi kullanıldı. Tüm istatistik analizler için minimum %5 hata payı kullanıldı. Verilerin analizinde SPSS 14.1 Ref. paket programından yararlanıldı.

3. BULGULAR

Bu Çalışma kapsamında, 2011 yılının Şubat ve Ekim ayları arasında Ankara'da farklı marketlerde ve farklı markalardan satışa sunulan toplam 120 paket tavuk örneği (40 paket but, 40 paket göğüs, 40 paket kanat) materyal olarak kullanılmış ve mikrokok/stafilokok, koagulaz pozitif stafilokok ve *S. aureus* düzeyleri belirlenmiştir. API test kiti ve klasik kültür tekniği ile 40 but örneğinin 7'sinde (% 17.5), 40 göğüs örneğinin 4'ünde (% 10), ve 40 kanat örneğinin 11'inde (% 27.5) olmak üzere toplam tavuk parça eti olarak 120 örneğin 22'sinde (% 18.33) *S. aureus* izole ve identifiye edilmiştir. *S. aureus* olarak identifiye edilen izolatların enterotoksin oluşturma yetenekleri (*sea, seb, sec, sed*) ve izolatların Metisilin, Tetrasiklin ve Eritromisin direnci belirlenmek üzere *mecA*- *tet*(K), *tet*(M), *erm*(A) ve *erm*(C) gen sekansları esas alınarak PCR işlemi yapılmıştır. Sonuç olarak *S. aureus* olarak tespit edilen suşların, 14 farklı antibiyotiğe karşı disk difüzyon yöntemi kullanılarak dirençlilik durumları belirlenmiştir.

Çizelge 3.1. Tavuk parça etlerinde kültür tekniği ile *S. aureus* pozitif numunelerin dağılımı.

Örnek	İnceleme yapılan örnek sayısı	Pozitif örnek sayısı	%
But	40	7	17.5
Göğüs	40	4	10
Kanat	40	11	27.5
Toplam	120	22	18.33

3.1. Mikrobiyolojik Ekim Sonuçları

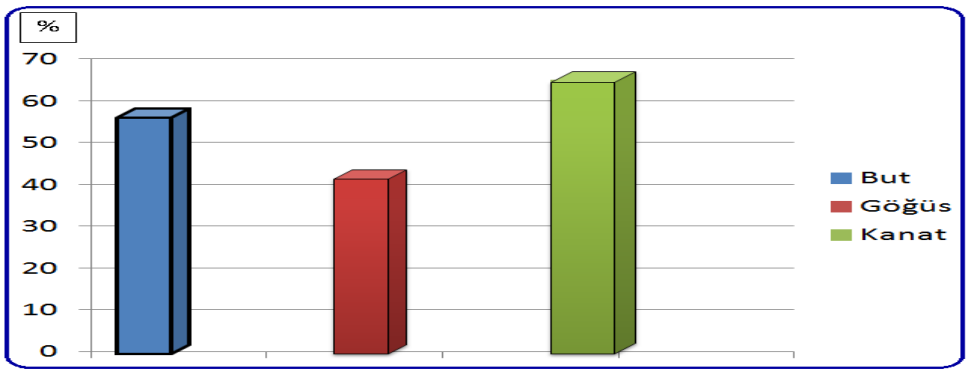
3.1.1. Mikrokok/ Stafilokok

Yapılan analizler sonucunda, incelenmiş olan 120 paket tavuk parça eti örneğinin 66'sında (% 55) minimum 2.95, maksimum 4.64 ve ortalama olarak 3.64 log kob/g düzeyinde mikrokok/stafilokok saptanmıştır (Şekil 3.1).

But örneklerinin 23'ünde (% 57,5) minimum 3.04, maksimum 4.36 ve ortalama olarak 3.6 log kob/g düzeyinde mikrokok stafilokok saptanmıştır.

Göğüs örneklerinin 17'sinde (% 42.5) minimum 2.95, maksimum 4.46 ve ortalama olarak 3.66 log kob/g düzeyinde mikrokok stafilokok bulunmuştur.

Kanat örneklerinin 26'sında (% 65) minimum 3.14, maksimum 4.64 ve ortalama olarak 3.85 log kob/g düzeyinde mikrokok/stafilokok bulunmuştur.



Şekil 3.1. Piliç parça etlerinde kültür tekniği ile saptanan Mikrokok/Stafilokok pozitif örneklerin dağılım oranı

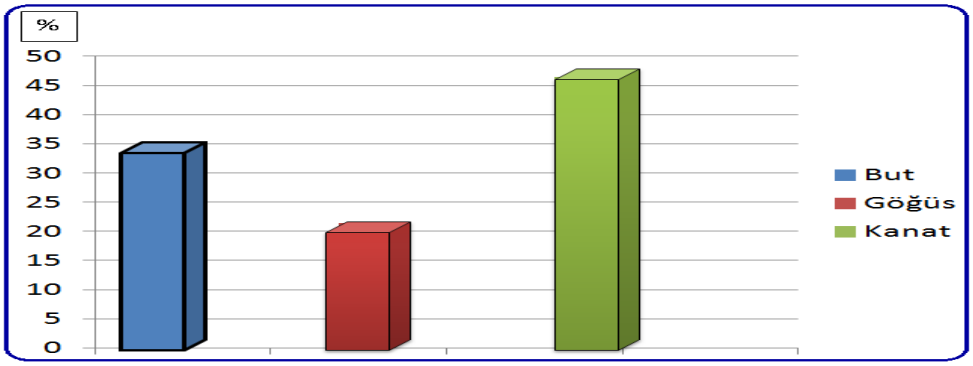
3.1.2. Koagulaz Pozitif Stafilokok

Yapılan analizler sonucunda, incelenmiş olan 120 paket, tavuk parça et örneğinin 42'sinde (% 35) minimum 3.14 maksimum 4.43 ve ortalama olarak 3.71 log kob/g düzeyinde koagulaz pozitif stafilokok saptanmıştır (Şekil 3.2).

But örneklerinin 14'ünde (% 35) minimum 3.30, maksimum 4.07 ve ortalam olarak 3.57 log kob/g düzeyinde koagulaz pozitif stafilokok tespit edilmiştir.

Göğüs örneklerinin 9'unda (% 22.5) minimum 3.3, maksimum 4.07 ve ortalama olarak 3.66 log kob/g Düzeyinde koagulaz pozitif stafilokok bulunmuştur.

Kanat örneklerinin 19'unda (% 47,5) minimum 3.14, maksimum 4.43 ve ortalama olarak 3.84 log kob/g düzeyinde koagulaz pozitif stafilokok saptanmıştır.



Şekil 3.2. Piliç parça etlerinde kültür tekniği ile saptanan koagulaz pozitif örneklerin dağılım oranı

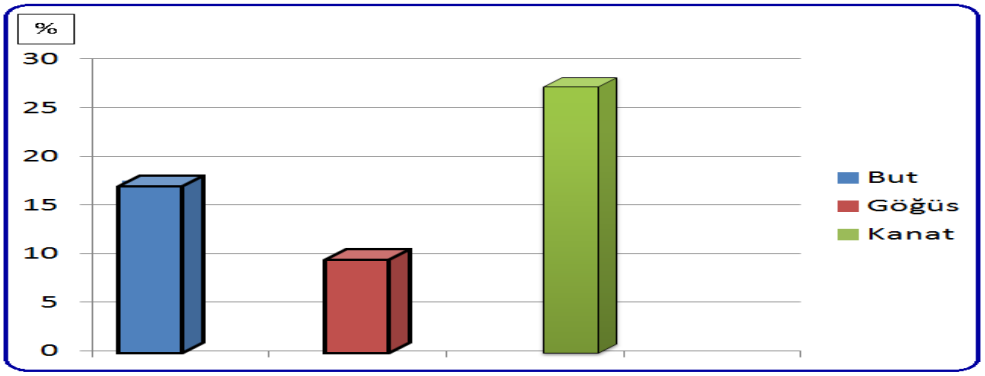
3.1.3. *S. aureus*

Yapılan analizler sonucunda incelenmiş olan 120 paket, tavuk parça eti örneğinin 22'sinde (% 18.33) minimum 3.04, maksimum 4.43 ve ortalama olarak 3.74 log kob/g düzeyinde *S. aureus* saptanmıştır (Şekil 3.3).

But örneklerinin 7'sinde (% 17.5) minimum 3.47, maksimum 4.07 ve ortalama olarak 3.56 Log kob/g düzeyinde *S. aureus* tespit edilmiştir.

Göğüs örneklerinin 4'ünde (% 10) minimum 3.04, maksimum 3.90 ve ortalama olarak 3.54 log kob/g düzeyinde *S. aureus* bulunmuştur.

Kanat örneklerini 11'inde (% 27.5) minimum 3.3, maksimum 4.43 ve ortalama olarak 3.54 Log kob/g düzeyinde *S. aureus* tespit edilmiştir.



Şekil 3.3. Piliç parça etlerinde kültür tekniği ile saptanan *S. aureus* örneklerin dağılım oranı

Çizelge 3.2. Analiz edilen tavuk parça eti örneklerindeki ortalama mikroorganizma düzeyleri (log kob/g) (N=120).

Mikroorganizma	Min	Max	X±SS
Mikrokok/stafilokok	2,95	4,64	3.64±0,28
Koagulaz pozitif stafilokok	3,14	4.43	3.71±0,29
S. aureus	3.04	4,43	3.74±0,24

N:toplam örnek sayısı, X: ortalama, SS: standart sapma.

Çizelge 3.3. Analiz edilen tavuk parça eti örneklerinin mikrokok/stafilokok, koagulaz pozitif stafilokok, ve *S. aureus* ile kontaminasyon düzeyleri.

Mikroorganizma	n/N (%)
Mikrokok/stafilokok	66/120 (55)
Koagulaz pozitif stafilokok	42/120 (35)
S. aureus	22/120 (18,33)

Çizelge 3.4. Tavuk parça eti örneklerindeki mikroorganizma düzeylerinin (log kob/g) istatistiksel olarak değerlendirilmesi.

Mikroorganizma												
	n	Min	Maks	X±SS	n	Min	Maks	X±SS	n	Min	Maks	X±SS
Mikrokok/ stafilokok	23	3,04	4,36	3,60±0,25	26	3,14	4,64	3,85±0,35	17	2,95	4,46	3,66±0,33
Koagulaz pozitif stafilokok	14	3,3	4,07	3,57±0,19	19	3,14	4,43	3,84±0,32	9	3,3	4,07	3,66±0,24
S. aureus	7	3,47	4,07	3,56±0,09	11	3,3	4,43	3,89±0,31	4	3,04	3,9	3,54±0,26

3.2. Enterotoksin Oluşturma Yeteneğinin Belirlenmesi

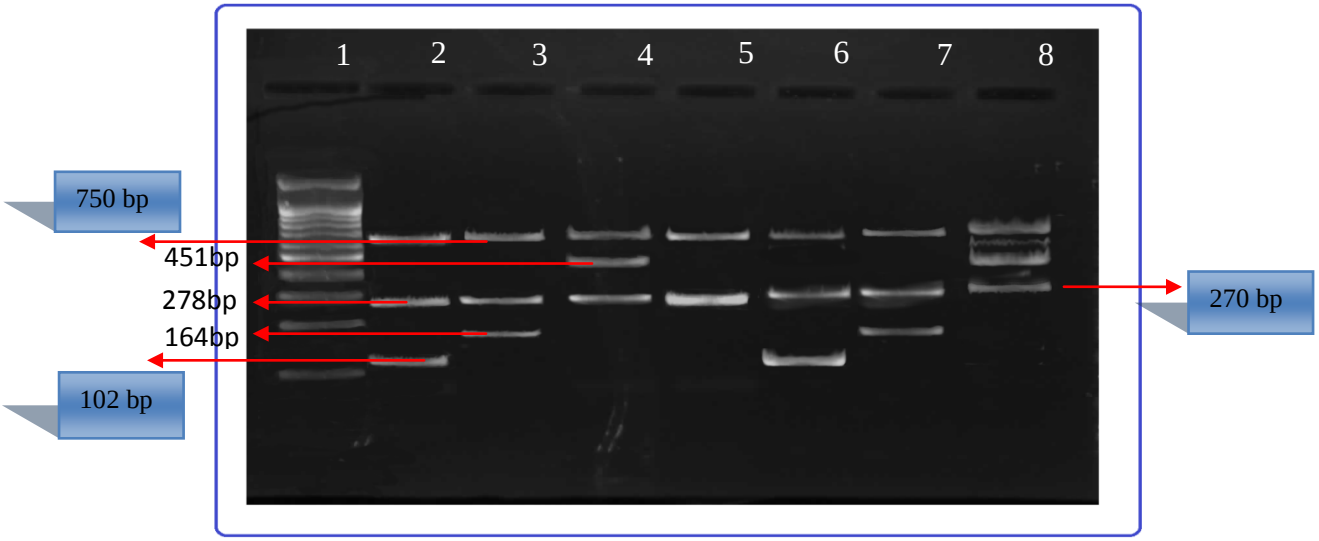
S. aureus olarak identifiye edilen izolatların enterotoksin oluşturma yetenekleri (*sea, seb, sec, sed*) Multiplex PCR tekniği ile saptanmıştır. Bu izolatlarda standart PCR tekniği ile *nuc* geni yönünden incelenmiş ve izolatların tamamen *nuc* geni içerdiği belirlenmiştir. Daha sonra multipleks PCR yöntemiyle Mehrotra ve ark (2000),

tarafından önerilen *sea, seb, sec, sed* gen sekansları esas alınarak moleküler karakterizasyonları yapılmıştır. *S. aureus* izolatlarının multipleks PCR ile yapılan moleküler tiplendirilmesi sonucunda, but örneklerinden elde edilen izolatlardan 1'nin *sea* genine, bir başka but izolatı ise *sec* genine sahip olduğu, göğüs örneklerinden elde edilen izolatlardan 1'inin *sec* geni taşıdığı, kanat örneklerinden elde edilen izolatlarda ise 1'nin *seb*, genine diğer kanat izolatından 2'sinin *sec* genini taşıdığı görülmüştür. Elde edilen sonuçlar (Şekil. 3.4) gösterilmiştir.

Çizelge 3.5. Standart PCR ile But, Göğüs ve Kanat örneklerinden *S. aureus*'un *nuc* geninin tespiti.

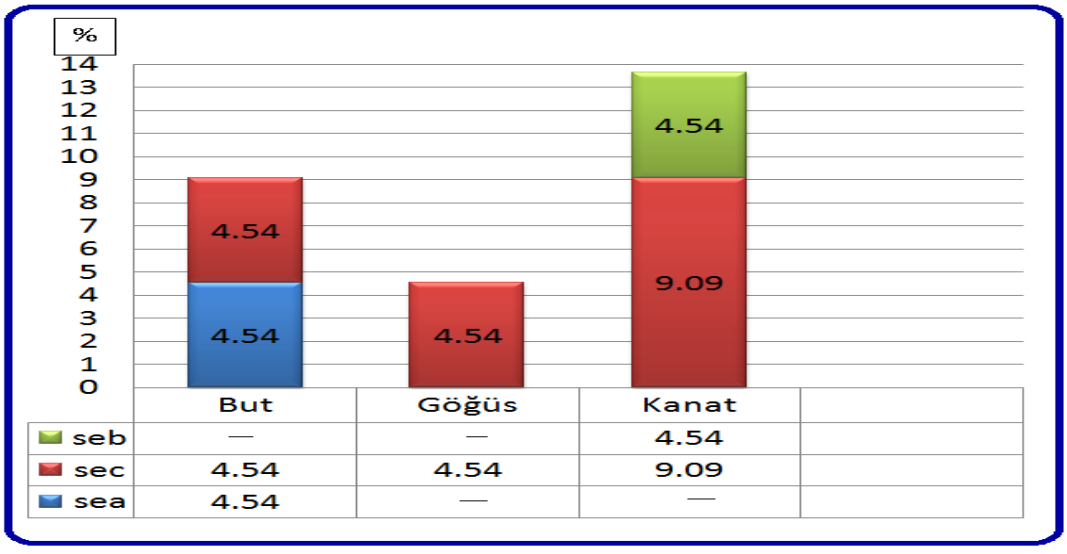
NO	Pozitif Örnekler	PCR
		nuc
1	But	+
2	But	+
3	But	+
4	But	+
5	But	+
6	But	+
7	But	+
Toplam: 7		
1	Kanat	+
2	Kanat	+
3	Kanat	+
4	Kanat	+
5	Kanat	+
6	Kanat	+
7	Kanat	+
8	Kanat	+
9	Kanat	+
10	Kanat	+
11	Kanat	+
Toplam:11		
1	Göğüs	+
2	Göğüs	+
3	Göğüs	+
4	Göğüs	+
Toplam:4		

3.2.1. PCR Sonuçları



Şekil 3.4. Multipleks PCR ile saptanan gen dağılımı

Şekil 3.4. Multipleks PCR ile *16S rRNA* (750bp), *nuc* (270bp), *sea* (102bp), *seb* (164bp), *sec* (451bp), *sed* (278bp), genlerinin aktarımı ve *(16s rRNA), nuc, sea, seb, sec* geni içeren *S. aureus* izolatlarının görünümü (1: 100bp DNA marker, 2-5: Pozitif kontroller: 2; *S. aureus* ATCC 13565 (*sea* geni), 3; *S. aureus* ATCC 14458 (*seb* geni), 4; *S. aureus* ATCC 19095 (*sec* geni), 5: *S. aureus* 90-S-1025 (*sed* geni), 6; *16s rRNA, nuc* ve *sea* geni tespit edilen *S. aureus* izolatı, 7; *16s rRNA, nuc* ve *seb* geni tespit edilen *S. aureus* izolatı, 8; *16s rDNA, nuc* ve *sec* geni tespit edilen *S. aureus* izolatı ve *sed* geni açısından negatif).



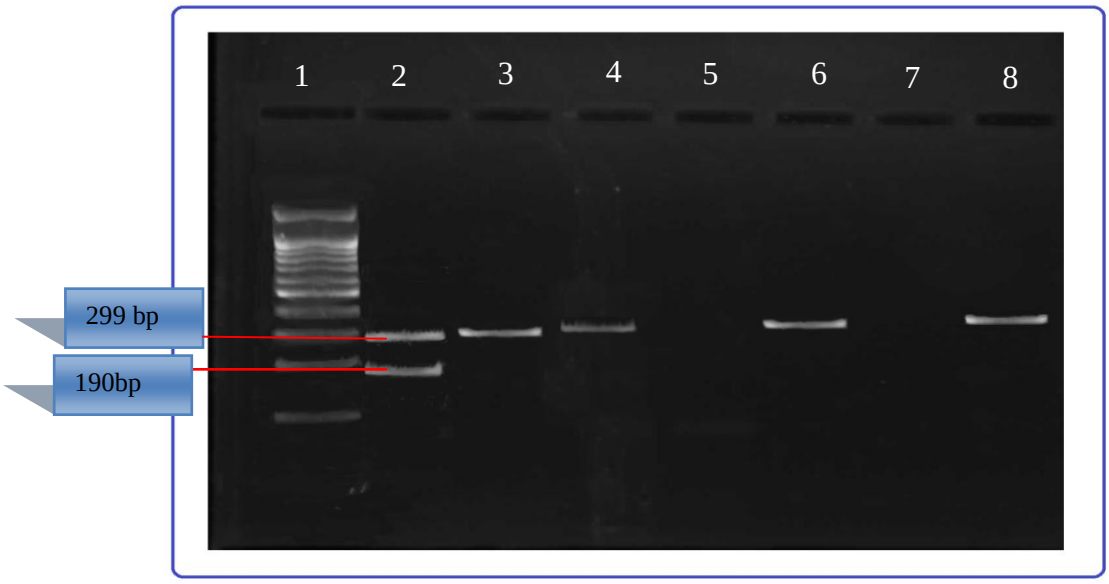
Şekil 3.5. Multipleks PCR ile *S. aureus, sea, seb, sec, sed* gen sekansları esas alınarak moleküler karakterizasyonu ve örnek tipine göre dağılımı.

Çizelge 3.6. But, Göğus ve Kanat örneklerinden *S. aureus*'un, *nuc*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed* gen sekansları esas alınarak multipleks PCR ile moleküler karakterizasyonu.

NO	Pozitif Örnekler	MULTİPLEKS PCR				
		Gen				
		nuc	***sea***	***seb***	***sec***	***sed***
1	But	+	-	-	+	-
2	But	+	-	-	-	-
3	But	+	-	-	-	-
4	But	+	-	-	-	-
5	But	+	-	-	-	-
6	But	+	-	-	-	-
7	But	+	+	-	-	-

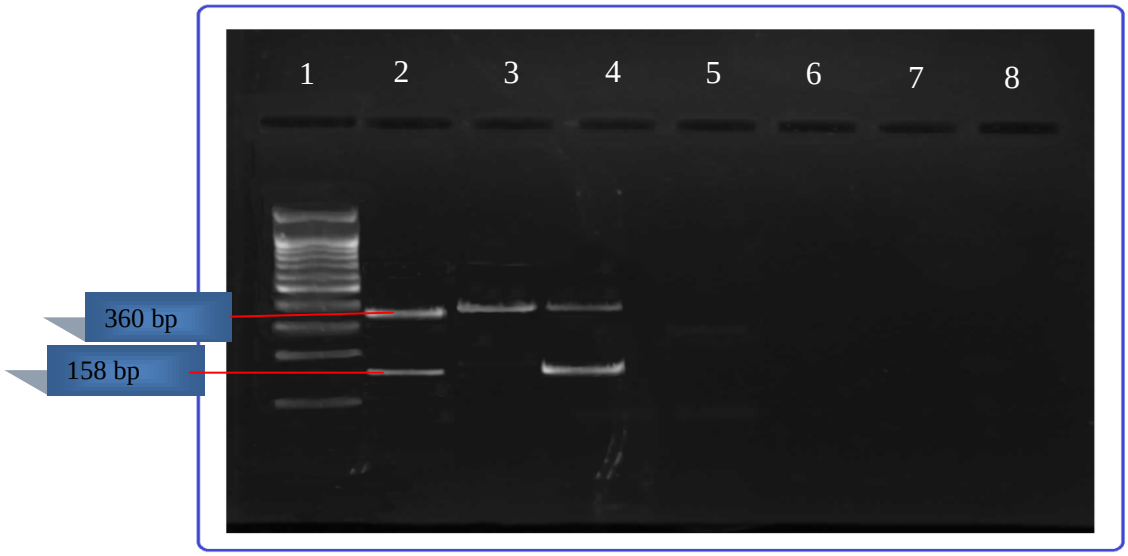
NO	Pozitif Örnekler	MULTİPLEKS PCR				
		Gen				
		nuc	***sea***	***seb***	***sec***	***sed***
1	Göğüs	+	-	-	-	-
2	Göğüs	+	-	-	-	-
3	Göğüs	+	-	-	+	-
4	Göğüs	+	-	-	-	-

NO	Pozitif Örnekler	MULTİPLEKS PCR				
		Gen				
		nuc	***sea***	***seb***	***sec***	***sed***
1	Kanat	+	-	-	+	-
2	Kanat	+	-	+	-	-
3	Kanat	+	-	-	-	-
4	Kanat	+	-	-	-	-
5	Kanat	+	-	-	-	-
6	Kanat	+	-	-	-	-
7	Kanat	+	-	-	-	-
8	Kanat	+	-	-	-	-
9	Kanat	+	-	-	+	-
10	Kanat	+	-	-	-	-
11	Kanat	+	-	-	-	-



Şekil 3.6. Standart PCR ile *erm*(A) *erm*(C) genlerinin dağılımı

Şekil 3.6. Standart PCR ile *erm*(A) (190bp), *erm*(C) (299bp) genlerinin aktarımı ve *erm*(C) geni içeren *S. aureus* izolatların görünümü (1: 100 bp DNA marker, 2:Pozitif kontrol, 3-4-6-8; *erm*(C) geni tespit edilen *S. aureus* izolatları ve *erm*(A) geni açısından negatif.



Şekil 3.7. Standart PCR ile *tet*(K) ve *tet*(M) genlerinin dağılımı

Şekil 3.7. Standart PCR ile *tet*(K) (360bp), ve *tet*(M) (158bp), genlerinin aktarımı ve *tet*(K), *tet*(M) geni içeren *S. aureus* izolatların görünümü (1: 100 bp DNA marker, 2: pozitif kontroller, 3-4; *tet*(K), *tet*(M),) geni tespit edilen *S. aureus* izolatları

Çizelge 3.7. But, Göğus ve Kanat örneklerinden *S. aureus*'un, *nuc*, *erm*(C), *erm*(A), *tet*(K) ve *tet*(M) gen sekansları esas alınarak multipleks PCR ile moleküler karakterizasyonu.

NO	Pozitif Örnekler		MULTİPLEKS PCR				
			Gen				
		nuc	*mecA*	*erm*(A)	*erm*(C)	*tet*(K)	*tet*(M)
1	But	+	-	-	-	-	-
2	But	+	-	-	-	-	-
3	But	+	-	-	-	-	-
4	But	+	-	-	-	-	-
5	But	+	-	-	-	-	-
6	But	+	-	-	+	-	-
7	But	+	-	-	-	-	-
NO	**Pozitif Örnekler**		**MULTİPLEKS PCR**				
			Gen				
		nuc	***mecA***	***erm*(A)**	***erm*(C)**	***tet*(K)**	***tet*(M)**
1	Göğüs	+	-	-	-	-	-
2	Göğüs	+	-	-	-	-	-
3	Göğüs	+	-	-	-	-	-
4	Göğüs	+	-	-	-	-	-
NO	**Pozitif Örnekler**		**MULTİPLEKS PCR**				
			Gen				
		nuc	***mecA***	***erm*(A)**	***erm*(C)**	***tet*(K)**	***tet*(M)**
1	Kanat	+	-	-	+	-	-
2	Kanat	+	-	-	-	+	-
3	Kanat	+	-	-	-	+	+
4	Kanat	+	-	-	-	-	-
5	Kanat	+	-	-	-	-	-
6	Kanat	+	-	-	-	-	-
7	Kanat	+	-	-	-	-	-
8	Kanat	+	-	-	-	-	-
9	Kanat	+	-	-	+	-	-
10	Kanat	+	-	-	+	-	-
11	Kanat	+	-	-	-	-	-

Çizelge 3.8. (x: Standart PCR tekniği ile doğrulanan örnek sayısı;
y: Toplam örnek sayısı).

Örnek Tipi	Standart PCR				
	Genler				
	mecA	***erm(A)***	***erm(C)***	***tet(K)***	***tet(M)***
But x/y (%)	-	-	1/22 (4.54)	-	-
Göğüs x/y (%)	-	-	-	-	-
Kanat x/y (%)		-	3/22 (13.63)	2/22 (9.09)	1/22 (4.54)
Toplam x/y (%)		-	4/22 (18.17)	2/22 (9.09)	1/22 (4.54)

3.3. Antibiyotik Dirençlilik Sonuçları

S. aureus olarak identifiye edilen 22 izolatın 14 farklı antibiyotiğe karşı dirençlilikleri disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışmaya göre, 17 izolat en az bir antibiyotiğe, 12 izolat en az iki antibiyotiğe, 8 izolat en az 3 antibiyotiğe, 3 izolat en az 4 antibiyotiğe dirençli bulunurken, 5 izolat çalışmadaki antibiyotiklerin tamamına karşı duyarlı olarak saptanmıştır.

Çizelge 3.9. Tavuk karkaslarından izole edilen *S. aureus* suşlarının antibiyotik dirençlilik tablosu.

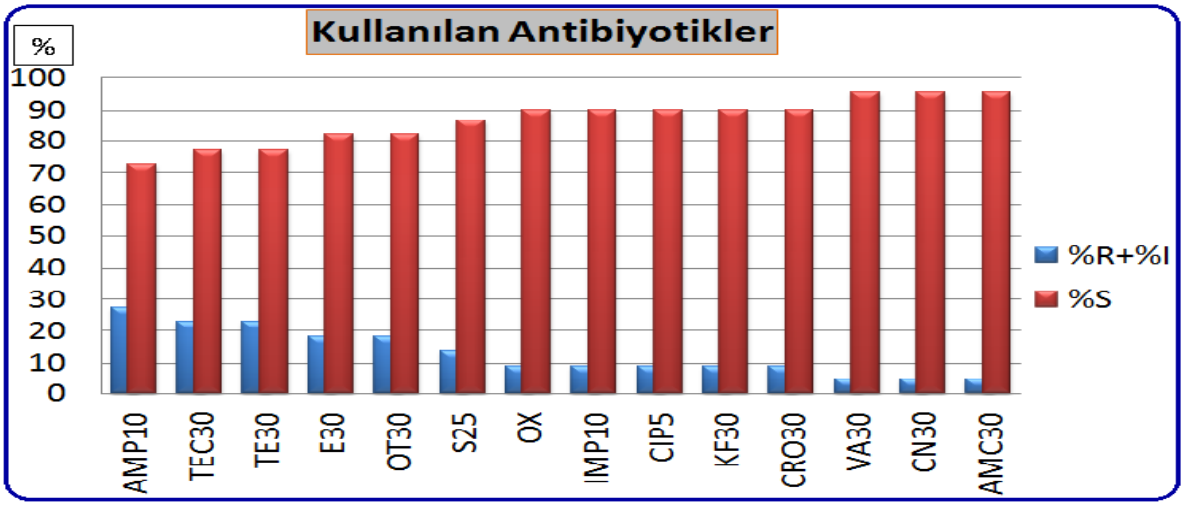
İzolatlar	MET	VA30	E30	CN30	AMP10	IMP10	CIP5	KF30	CRO30	TEC30	TE30	S25	AMC30	OT30
İzolat1	R	S	S	S	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S
İzolat2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
İzolat3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
İzolat4	S	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S
İzolat5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
İzolat6	S	S	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	R	S
İzolat7	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
İzolat8	S	S	S	S	I	S	S	S	R	S	R	S	S	S
İzolat9	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
İzolat10	S	R	S	S	I	S	S	S	S	R	S	S	S	I
İzolat11	S	S	S	S	R	I	I	S	I	S	S	S	S	S
İzolat12	S	S	R	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	I
İzolat13	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R
İzolat14	S	S	S	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
İzolat15	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	I
İzolat16	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
İzolat17	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
İzolat18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
İzolat19	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S
İzolat20	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
İzolat21	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
İzolat22	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

S; Duyarlı, I; Orta derecede duyarlı, R; Dirençli, MET; methicillin, VA30; vancomycin, E30; erythromycin, CN30; gentamicin, AMP10; ampicillin, IMP10; imipenem, CIP5; ciprofloxacin, KF30; cephalothin, CRO30; ceftriaxone. TEC30; teicoplanin, TE30; tetracycline, S25; streptomycin, AMC30; amoxicillin/clavulanic acid, OT30; oxytetracycline

Çizelge 3.10. İzolatların çalışmada kullanılan antibiyotiklere dirençlilik düzeyleri.

Antibiyotikler	Dirençli n (%)	Orta düzeyde dirençli n (%)	Duyarlı n (%)
Metisilin	2 (9.09)	0	20 (90.9)
Teikoplanin	2 (9,09)	3 (13,63)	17 (77,27)
Ampisilin	3 (13,63)	3 (13,63)	16 (72,72)
Vankomisin	1 (4,54)	0	21 (95,45)
Gentamisin	0	1 (4,54)	21 (95,45)
Eritromisin	4 (18,18)	0	18 (81,81)
İmipenem	1 (4,54)	1 (4,54)	20 (90,9)
Siprofloksasin	0	2 (9,09)	20 (90,9)
Sefalotin	0	2 (9,09)	20 (90,9)
Seftriakson	1 (4,54)	1 (4,54)	20 (90,9)
Tetrasiklin	3 (13.63)	2 (9,09)	17 (77.27)
Oksitetrasiklin	1 (4,54)	3 (13,63)	18 (81,81)
Streptomisin	2 (9,09)	1 (4,54)	19 (86,36)
Amoksisilin	1 (4,54)	0	21 (95,45)

İzolatlar arasında en yüksek dirençlilik % 27.26 ile ampisiline karşı gelişirken, bunu sırayla % 22.72 ile teikoplanin, ve tetrasiklin, % 18.17 ile eritromisin, ve oksitetrasiklin, % 13.63 ile streptomisin, % 9.09 ile metisilin, imipenem, siprofloksasin, sefalotin, seftriakson, % 4.54 ile vankomisin, centamisin, amoksisilin ve klavulonik asit izlemiştir.



R: Dirençli I: Orta duyarlı S: Duyarlı

Şekil 3.8. *S. aureus* izolatlarının duyarlılık ve dirençlilik değerleri

4. TARTIŞMA

Quddooumi ve ark. (2006), toplam 1260 örneğin (kırmızı et ve kanatlı eti ve ürünleri) 157'sinden (% 12.46), Otalo ve ark. (2011), 400 tavuk örneğinin 23'ünden (%5.75) koagulaz pozitif Stafilokok ve 13'ünden (% 3.25) *S. aureus* izole etmişlerdir. Normanno ve ark.(2007a), inceledikleri et ve süt ürünleri örneklerinin % 12.8'inden, Fang ve ark. (2003), 916 etli hazır gıda örneğinin 164'ünden (%17.9), Guang- Hua ve Xiao-Ling. (1994), piliç büt ve göğüs örneklerinin %13'ünde *S. aureus* tespit etmişlerdir. Bu tez çalışması sonucunda 120 tavuk (40 paket but- 40 paket göğüs- 40 paket kanat) örneğinin 22'sinde (%18.33) *S. aureus* izole edilmiştir. Bu sonuçların tez çalışmasındaki bulgulardan düşük olması, kontaminasyonun daha az olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bhargava ve ark. (2011), toplam 289 (156 sığır, 76 tavuk, 57 hindi) et örnekleri analizleri sonucnda sığır örneklerinin 32'sinden (%20.5), Tavuk örneklerinin19'undan (%25) Hindi etlerinin 14'ünden (%24.5) ve numunelerin toplamından 65'inden (% 22.5), Duman ve ark. (2011), 35 but, 35 kanat ve 35 boyun olmak üzere toplam 105 tavuk örneğinden 195 izolat elde etmişler. Bu izolatlardan 92'sinden (%47,2), Astorga ve ark. (2002), kanat örneklerinin % 60'ından but örneklerinin % 40'ından *S.aureus* tespit etmişlerdir. Gündoğan ve ark. (2004), Ankara'da bulunan değişik semtlerdeki marketlerden temin ettikleri 150 adet tavuk eti ve diğer et örneklerinden 80 *S. aureus* izolatı elde etmişler ve bu izolatların %32,5 tavuk etinden olduğunu belirtmişlerdir. Kitai ve ark. (2005) Japonya'da yaptıkları bir çalışmada ise; Japonya'da perakende olarak satılan tavuk etlerinde, 292 örnekten 131'inde (%65,8) *S. aureus* izole etmişlerdir. Bu sonuçların tez çalışma bulgularından yüksek bulunnması, karkasların parçalama işleminde, paketleme ve hatta nakil sırasında kontaminasyona uğraması nedeniyle olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmadaki bulgular ile uyumlu olarak Fang ve ark. (2003), Tayvan'da süpermarketlerden toplanan 164 hazır gıda örneğinden izole ettikleri bakterilerin % 17.9 *S. aureus* olarak bulmuşlardır.

Normanno va ark. (2005), yaptıkları çalışmada 298 *S. aureus* izolatının % 55.5'inin bir yada birden çok enterotoksin ürettiğini, % 33.9'u SEC, % 26.5'i SEA, % 20,5'i SEA+SED, % 13.4'ü SED, % 2.7'si SEB, % 1.7'si SEA+SEB, % 0.07'si SEC+SED, % 0.3'ü SEA+ SEC ve SEB+SEC içerdiğini; Marcia ve ark. (2009), toplam 200 İzolatın 102'sinden (% 51) koagulaz pozitif *S. aureus*, 91'izolat (% 45.5) *femA* geni taşıyan koagulaz pozitif, 10 izolat (% 5) SEA, 12 izolat (% 6) SED ve 4 izolat (% 2) SEE içerdiğini; Hazariwala.(2002), 34 kanatlı izolatından sadece 1 izolatın (% 2.9) SEC içerdiğini; Normanno ve ark. (2007a), inceledikleri et ve süt ürünleri örneklerinin % 12.8 düzeyinde *S. aureus* ile kontamine olduğunu saptamışlardır. İzolatların sırasıyla % 33.6, % 18.4, % 15.2, % 6.4 düzeyinde SED, SEA, SEC ve SEB sentezlediklerini bulmuşlardır. Bu çalışma kapsamında but izolatlarınnın 1'inden SEA (% 4.54) ve 1'inden SEC (%4.54), kanat izolatlarının 2'sinden (%9.09) SEC ve 1'inden SEB (% 4.54), göğüs izolatlarının 1'inden SEC (%4.54) enterotoksinleri tespit edilmiştir. Çalışma bulguları genel olarak benzer olmakla birlikte, incelenen göğüs örneklerindeki değerlerin daha düşük olmasının, göğüs örneklerinin deri içermemesi nedeniyle kontaminasyon oranının az olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Gündoğan ve ark. (2005), tavuk etinden izole edilen *S. aureus*'ların metisiline dirençlilik oranını % 67.5 olarak belirlemişlerdir. *S. aureus* suşlarının %53.8'i penisilin G'ye, %7.5'i eritromisin'e dirençli bulunurken vankomisin, siprofloksasinne duyarlı bulunmuştur. Quddooumi ve ark. (2006), 157 izolatın 30'u (%19.1) fenotipik olarak metisiline dirençli olarak saptanmıştır. 30 izolattan 15 tanesinin *mecA* genini taşıdığı ve bu MRSA izolatlarının başlıca koyun ve kanatlı eti örneklerinden izole edildiği belirtilmiştir. Lee (2003), bir çalışmada 1913 örneğin (sığır, domuz ve piliç) 421'inde (% 22) *S. aureus* saptamıştır. Disk difüzyon yöntemi ile 28 izolatın 2 µg/ml'den yüksek konsantrasyondaki oksasiline dirençli olduğu bulunarak, bunlardan 15'inin (%3.56),

PCR ile *mecA* genini taşıdığı tespit edilmiştir. Bütün MRSA izolatlarının disk difüzyon yöntemi ile ampisilin, oksasilin ve penisiline dirençli olduğu bulunurken, vankomisin ve trimetoprim-sülfametoksazole duyarlı oldukları belirlenmiştir.

Lee, (2006). Bşka bir çalışmada 2523 hayvansal numunenin 525'inde (% 20.8) *S. aureus* izole etmiş ve 19 izolatın (%3.61) *mecA* geni taşıdığını bulmuştur. MRSA izolatlarından 13'ünün süt örneklerinden izole edildiği ve bunların 10'unun mastitisli süt olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada, 4 *mecA* pozitif *S. aureus* suşunun *mecI* geni taşımamasına ragmen, metisilin direncini eksprese edebildiği bulunmuştur.

Pesavento ve ark., (2007), 176 örneğin (piliç, sığır) antibiyotik dirençlilik testi sonucunda, *S. aureus* olarak identifiye edilen 42 izolatın metisilin, teikoplanin ve vankomisine duyarlı olduğu saptanmıştır. Buna karşın izolatların % 30.9 düzeyinde diğer antibiyotiklere karşı çoklu direnç gösterdikleri belirlenmiştir. İzolatlar arasında en fazla direnç %42.8 düzeyinde ampisiline karşı tespit edilmiştir. Bhargava ve ark. (2011), *S. aureus* olarak tanımlanan 65 izolatın (sığır, tavuk, hindi) 6'sından (% 9.2) *mecA* geni taşıdığı ve MRSA olarak tanımlanmasını ortaya koymuşlardır.

Nawaz ve ark (1999), 35 tavuk eti örneğinden 46 izolat elde etmişlerdir ve bu izolatların 34'ü (% 73.9) koagulaz pozitif olarak değerlendirilmiştir. İzolatların 1'i vankomisine karşı dirençli olarak saptanmıştır ve PCR işlemiyle 12'si (%35) *erm(C)* dirençli gene sahip oldukları saptanmıştır. Otalu ve ark. (2011), tarafından toplam 400 tavuk örneği incelendiğinde 23'ü (%5.75) koagulaz pozitif stafilokok ve 13'ü (% 3.25) *S. aureus* olarak değerlendirildi. İzolatlar 12 antibiyotiğe karşı dirençlik durumları incelendiğinde izolatların hepsı amikasine duyarlı iken aynı zamanda izolatların hepsı tetrasiklin eritromisin ve penisiline dirençli bulunmuştur. Bunları takiben 8 izolat (% 61,5) metisiline, 6 izolat (%46,2) vankomisin ve kloramfenikole, 5 izolat (%38,5) sulfametoksazol, trimetoprim ve gentamisine, 3 izolat (%23) oksasilin ve amoksisilin/klavulanik asite ve 2 izolat (%15,4) siprofloksasine dirençli olarak bulunmuştur.

Duman ve ark. (2011), 105 tavuk örneğinden (but, kanat, boyun) 195 izolat elde etmişler. Bu izolatlardan 92'si (%47,2) *S. aureus* olarak tanımlanmıştır. En yüksek antibiyotik direnci sırasıyla penisilin (%75) ve metisilin (%50)e karşı bulunurken bunları tetrasiklin (% 40.2), eritromisin (%36,9), siprofloksasin (%31,5) ve kloramfenikol (%2,2) izlemiştir. İzolatların hepsi vankomisine duyarlı olarak bulunmuştur. Aarestrup ve ark. (2000), 118 kümes hayvanından izole ettikleri 83 *S. aureus* suşunun % 7'sinin basitrasine, % 30'unun siprofloksasine, % 24'ünün eritromisine, % 7'sinin penisiline, % 4'ünün streptomisine, %19'unun sulfametaksozole ve % 47'sinin tetrasikline dirençli, tüm suşların vankomisin, oksasilin, kanamisin, gentamisin, kloramfenikol, trimethoprim, kuinupristin + dalfopristine duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir.

Topçu (2006), yapmış olduğu çalışmada tavuk ve et döner örneklerinden izole edilen tüm *S. aureus* izolatlarının; gentamisin, eritromisin, tetrasiklin, kloramfenikol, sefalotin, streptomisin ve vankomisine %100 duyarlı olduklarını bulmuştur. Örneklerden izole edilen *S. aureus* izolatlarının; çiğ ve pişmiş tavuk dönerde ampisiline % 80 (50 örnek), et döner de ise % 92,3 (50 örnek) dirençli olduğu tespit etmiştir.

Bayhün (2008), İncelenen 284 gıda örneklerine ait (çiğ süt, peynir ve tavuk) *S. aureus* izolatının %92.0 Penisilin, %9.5 Tetrasiklin, %9.15 Eritromisin, %8.09 Klindamisin, %3.87 Norfloksasin, %2.46 Metisilin, %1.4 Siprofloksasin, Levofloksasin ve Moxifloksasin, % 0.35 Trimethoprim/Sulfamethoksazol'e dirençli bulunmuştur.

Bu çalışmadaki bulgular ile uyumlu olarak Silva ve ark. (2006), yaptıkları çalışmada hayvan orijinli *S. aureus* izolatlarının eritromisine % 14 oranında direnç tespit etmişlerdir.

Bu çalışmada 40 tavuk kanat örneklerinden elde edilen *S. aureus* izolatlardan 1'inde *tet(K),* 1'inde *tet*(M), *tet*(*K),* 3'ünde *erm(C)* geninin, 40 but örneklerinde ise 1'inde *erm*(C) geninin varlığı görülmüştür. Son aşamada disk difizyon yöntemiyle *S. aureus* olarak identifiye edilen 22 izolatın 14 farklı antibiyotiğe karşı dirençlilikleri araştırılmıştır. İzolatlar arasında en yüksek dirençlilik %27.26 ile ampisiline karşı gelişirken, bunu sırayla % 22.72 ile teikoplanin, ve tetrasiklin, %18.17 ile eritromisin, ve oksitetrasiklin, %13.63 ile streptomisin, % 9.08 ile imipenem, siprofloksasin, sefalotin, seftriyakson, %4.54 ile vankomisin, centamisin, amoksisilin ve klavulonik asit izlemiştir. Çalışmada metisillin dirençli suşların sadece fenotipik olarak saptanması yanında, incelenen diğer antibiyotiklere dirençlilik tablosunun düşük olması yetiştiricilikte antibiyotik kullanımının sınırlı olaması, atılım sürelerine uygun hareket edilmesi nedeniyle olabileceği düşünülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada materyal olarak, Ankara'daki farklı marketlerden temin edilen ve herbirinden 40'ar paket (but, göğüs, kanat) olmak üzere toplam 120 paket tavuk eti kullanılmıştır. Bu örneklerde mikrokok/stafilokok, koagulaz pozitif stafilokok ve *S. aureus* düzeyleri saptanmıştır. Yapılan analizler sonucunda, incelenmiş olan 120 paket tavuk örneğinin 66'sında (%55) ortalama olarak 3.64 log kob/g düzeyinde mikrokok stafilokok, 42'sinde (%35) ortalama olarak 3.71 log kob/g düzeyinde koagulaz pozitif stafilokok ve 22' sinde (%18.33) ortalama olarak 3.74 log kob/g düzeyinde *S. aureus* bulunmuştur. Klasik kültür tekniği ve microbact Staph 12S test kiti ile but örneklerinin 7'sinde (% 17,5), göğüs örneklerinin 4'ünde (%10) kanat örneklerinin 11'inde (% 27,5) ve toplam tavuk eti olarak 120 örneğin 22'sinde (%18.33) *S. aureus* izole ve identifiye edilmiştir. Bu izolatların tamamının *nuc* geni içerdiği, standart PCR tekniği ile belirlenerek *S. aureus* olarak identifiye edilen izolatların enterotoksin oluşturma yetenekleri multipleks PCR yöntemiyle *sea, seb, sec, sed* gen sekansları esas alınarak moleküler karakterizasyon yapılmıştır.

Bir sonraki aşamada izolatların Metisilin, Tetrasiklin ve Eritromisin direnci belirlenmek üzere *mecA*- *tet*(K), *tet*(M), *erm*(A) ve *erm*(C) gen sekansları esas alınarak PCR işlemi yapılmıştır.

S. aureus izolatlarının multipleks PCR ile yapılan moleküler tiplendirilmesi sonucunda, but örneklerinden elde edilen izolatlardan 1'nin *sea* genine, bir başka but izolatı ise *sec* genine sahip olduğu, göğüs örneklerinden elde edilen izolatlardan 1'nin *sec* geni taşıdığı, kanat örneklerinden elde edilen izolatlarda ise 1'nin *seb,* genine diğer kanat izolatından 2'sinin *sec* genini taşıdığı, aynı zamanda kanat örneklerinden elde edilen izolatlardan 1'inde *tet*(K), 1'inde *tet*(M), *tet*(K), 3'ünde *erm*(C) geninin, but örneklerinde ise 1'inde *erm*(C) geninin varlığı görülmüştür. Son aşamada ise *S. aureus* olarak identifiye edilen 22 izolatın 14 farklı antibiyotiğe karşı dirençlilikleri

araştırılmıştır. İzolatlar arasında en yüksek dirençlilik %27.26 ile ampisiline karşı gelişirken, bunu sırayla %22.72 ile teikoplanin, ve tetrasiklin, % 18.17 ile eritromisin, ve oksitetrasiklin, %13.63 ile streptomisin, %9.08 ile imipenem, siprofloksasin, sefalotin, seftriyakson, % 4.54 ile vankomisin, centamisin, amoksisilin ve klavulonik asit izlemiştir.

Sonuç olarak, tavuk etlerinde *S. aureus* kontaminasyonu düşük oranda olmakla birlikte uygun koşullarda etkenlerin çoğalarak enterotoksin oluşturma potansiyeline sahip oldukları düşünüldüğünde bu durum gıda intoksikasyonları yönünden önemlidir.

Antibiyotik dirençliliğin insanlara taşınmasında gıdalarda antibiyotik kalıntılarının bulunmasının ve antibiyotiklere dirençli patojenlerin varlığı ile bu mikroorganizmalar arasında dirençlilik aktarımının olmasına neden olabilecektir. Bu nedenle kontaminasyon oranları düşük olsa bile risk oluşumu göz önüne alınmalıdır.

Piliç eti ve ürünlerinden kaynaklanabilecek gıda infeksiyonu ve intoksikasyonları halk sağlığını tehdit etmesinin yanı sıra büyük ekonomik kayıplara da neden olabilmektedir. Bu nedenle gıda patojenlerinin neden olabileceği infeksiyonların önlenmesi için; çiftlikten sofraya gıda güvenliği kuralları ve işletmelerde GMP (Good Manufacturing Practise: İyi Üretim Uygulaması) ve HACCP (Hazard Analysis Critical Kontrol Points: Tehlike Analizi Kritik Kontrol Noktaları) gibi gıda güvenliği ve kalite kontrol sistemleri etkin şekilde uygulanmalıdır.

ÖZET

Tavuk Etlerinde *Staphylococcus aureus* İzolasyonu, PCR Yöntemi İle EnterotoksinTiplendirilmesi ve *mecA, tetM, tetK, ermA, ermC* Genlerinin Saptanması

Bu çalışma Şubat-Ekim 2011 tarihleri arasında tavuk parça etlerinde *Staphylococcus aureus*'un varlığı ve PCR tekniği kullanılarak enterotoksijenik özellikleri ile *mec(*A), *tet(*M) genlerinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Ankara'daki farklı marketlerden temin edilen, paketlenmiş olarak satılan ve herbirinden 40'ar paket (but, göğüs, kanat) olmak üzere toplam 120 paket tavuk eti materyal olarak kullanılmıştır. Numuneler laboratuvara soğuk zincir altında getirilip, aynı gün içinde analize alınmıştır.

Alınan örneklerde *S. aureus*'un varlığı klasik kültür tekniği ve microbact Staph 12S test kiti kullanılarak belirlenmiştir. *S. aureus* izolatlarının enterotoksijenik özellikleri ile *mec*(A), *tet*(M) genleri ise PCR tekniği kullanılarak yapılmıştır.

Klasik kültür tekniği ve microbact Staph 12S test kiti ile incelenen 120 paket örneğin 22'sinde (%18.33) ortalama olarak 3.74 log kob/g düzeyinde *S. aureus* saptanmıştır. Aynı şekilde, but örneklerinin 7'sinde (%17.5), ortalama olarak 3.56 Log kob/g düzeyinde , göğüs örneklerinin 4'ünde (%10) ortalama olarak 3.54 log kob/g düzeyinde, ve kanat örneklerinin ise 11'inde (%27.5) ortalama olarak 3.54 Log kob/g düzeyinde *S. aureus* bulunmuştur. *S. aureus* olarak tespit edilen izolatların hepsi, PCR tekniğinde de *S. aureus* olarak saptanmıştır.

S. aureus suşlarının enterotoksijenik özellikleri yönünden ise but örneklerinden izole edilen 2 adet *S. aureus* suşundan 1'nin *sea* ve diğerinin *sec* genine, göğüs örneklerinden elde edilen izolatlardan 1'nin *sec* genine, kanat örneklerinden elde edilen izolatlardan ise 1'nin *seb* genine diğer 2'sinin ise *sec* genine sahip olduğu belirlenmiştir. Aynı şekilde, kanat örneklerinden elde edilen suşların *tet*(M), *tet*(K), *erm*(C), but örneklerinden elde edilen izolatların ise *erm*(C) genine sahip olduğu saptanmıştır. İzole edilen 22 adet *S. aureus* suşunun 14 farklı antibiyotiğe karşı dirençliliğinin belirlenmesi sonucu, 17 suşun en az bir antibiyotiğe, 11 suşun en az iki antibiyotiğe, 3 suşun en az 3 antibiyotiğe ve 3 suşun ise en az 4 antibiyotiğe dirençli bulunduğu, 5 suşun ise çalışmadaki antibiyotiklerin tamamına karşı duyarlı olduğu saptanmıştır.

Sonuç olarak, tavuk parça etlerinde *S. aureus* kontaminasyonu düşük oranda olmakla birlikte uygun koşullarda etkenlerin çoğalarak enterotoksin oluşturma potansiyeline sahip

oldukları ve çoklu antibiyotik dirençlilikleri de düşünüldüğünde halk sağlığı açısından potansiyel bir risk taşıyacağı düşünülmüştür. Bu nedenle sağlıklı piliç eti üretimi ve halk sağlığının korunması için, piliç eti üretiminin tüm aşamalarında etkin bir hijyen ve kontrol sisteminin uygulanmasının önemli olacağı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Antibiyotik dirençlilik, enterotoksin, PCR, *S. aureus*, tavuk eti.

SUMMARY

Isolation of *Staphylococcus aureus,* enterotoxin typing and identifiying *mecA, tetM, tetK, ermA, ermC* genes with PCR techniques in Chicken meat

This study is aimed to investigate the existence of *Staphylococcus aureus* in pieces of chicken meat collected between February-October 2011 and to determine *mec(*A), *tet(*M) genes with enterotoxigenic characteristics of the isolates using PCR techniques. Our experiment materials are obtained from Ankara's common and different markets which all were packed (drumstick, breast, wing) and totally 120 packs of chicken meat have been used. The samples brought to the laboratory under cold chain and were analyzed in the same day..

Existence of *S. aureus* in collected samples has been determined using classic culture techniques and microbact Staph 12S test kit. Investigation of enterotoxigenic features with *mec*(A), *tet*(M) gene prevalences of *S. aureus* isolates is done using PCR techniques. .

In 120 packs of examined samples using classical culture technique and microbact Staph 12S test kit, in 22 of them (%18.33) on average 3.74 log kob/g level of *S. aureus* was identified. Likewise, at drumstick samples at 7 of them (%17.5), on average 3.56 log kob/g level, at breast samples at 4 of them (%10), on average 3.54 log kob/g level, and at wing samples at 11 of them (%27.5), on average 3.54 log kob/g level *S. aureus* have been found. All of recorded isolations of *S. aureus,* at PCR technique have been identified as *S. aureus.*

S. aureus strain's enterotoxigenic features point of view from drumstick isolated 2 *S. aureus* strains, we determine that one of them has *sea* and the other has *sec* gene, from produced isolated breast one of them has *sec* gene, from produced isolated wing samples one of them has *seb* gene and the other *sec* gene. Likewise, from produced strains of wing samples having *tet*(M), *tet*(K), *erm*(C), from produced isolated drumstick samples having *erm*(C) genes identified. From 22 isolated *S. aureus* strains, after finding 14 different resistance to antibiotics, 17 strains resistance to at least one antibiotic, 11 strains resistance to at least two antibiotics, 3 strains resistance to at least 3 antibiotics and 3 strains resistance to at least 4 antibiotics was discovered and 5 strains being sensitive to all antibiotics have been identified in the study.

As a conclusion, although low level of *S. aureus* contamination were detected in pieces of chicken meats, under appropriate conditions, they had the potential to produce enterotoxin after multiplication and carry a potential risk for public health considering their resistance to several antibiotics. For this reason, in order to produce healthy chicken meat and to protect public health, implementation of effective hygiene and control measures in all stages of chicken meat production is concluded to be important.

Key words: Antibiotic resistance, chicken meat, enterotoxin, PCR, *S. aureus.*

KAYNAKLAR

AARESTRUP, F.M., AGERSO, Y., AHRENS, P., JORGENSEN, J.C.O., MADSEN, M., JANSEN, L.B. (2000). Antimicrobial susceptibility and presence of resistance

ACCO, M., FERREIRA, F.S., HENRIQUES, J.A.P. VE TONDO, E.C. (2003). İdentification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers, *J. Food Microbiol*., **20:** 489-493.

ADAMS, M.R., MOSS, M.O. (2008). Chapter 7, Bacterial Agents of Foodborne Illness. *Staphylococcus aureus*. Pages: 252-257. In: Food Microbiology, Third edition, ISBN 978-0-85404-284-5, The Royal Society of Chemistry, UK.

ANDRE, M.C.D.P.B. CAMPOS, M.R.H., BORGES, L.J., KIPNIS, A., PIMENTA, F.C., SERAFINI, A.B. (2008). Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electerophoresis following SmaI digenstion. *Food Control*, **19:** 200-207.

ANGELES, A.M., MENDOZA, M.C., RODICIO, M.R. (2010). Food poisoning and *staphylococcus aureus enterotoxins Rev.*, **2(7):** 1751-1773.

ANONYMUS (2001). Microbial pathogen data sheets: *Staphylococcus aureus*. Erişim: http://www.nzfsa.gov.nz/science/data-sheets/staphylococcus-aureus.pdf Erişim tarihi:15.10.2011.

ANONYMUS (2010a). Livestock processed. Erişim: http://faostat.fao.org/ Erişim tarihi:20.05. 2011.

ANONYMUS (2010b). Deoxyribonuclease test. Issue no: 2.1 Issud by: Standards Unit, Department for Evaluations, Standards and Training, page: 1-10. Erişim: www.evaluations-standards.org.uk. Erişim tarihi: 17.11. 2011.

ARDİC, N., OZYURT, M., SAREYYUPOGLU, B., HAZNEDAROGLU, T. (2005). Investigation of erythromycin and tetracycline resistance genes in methicillin resistant staphylococci. *Int. J. Antimicrob. Agents*., **26:** 213-218.

ASAO, T., KUMEDA, Y., KAWAI, T., SHIBATA, T., ODA, H., HARUKI, K., NAKAZAWA, H., KOZAKI, S. (2003). An extensive outbreak of Staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japon: Estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered slim milk. *Epidemiol. Infect*., **130:** 33-40.

ASTORGA, A.M., CAPITA, R., CALLEJA, A.C., MORENO, B., GARCIA FERNANDEZ, M.C. (2002). Microbiological quality of retail chicken by products in Spain. *Meat. Sci*. **62:** 45-50.

BACHMAN, H.P., SPAHR, U. (1995). The fate of potentially pathogenic bacteria in Swiss hard and semihard cheeses made from raw milk. *J. Dairy Sci*., **78:** 476-483.

BAIRD-PARKER, A.C. 1990. HACCP and food Control. *Food Cont*., **1:** 131-133.

BALABAN, N., RASOOLY, A. (2000). Staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol*., **61:** 1-10.

BALEY, N., RASOOLY, A. (2002). *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin A production in anaerobic environment. *J. Food Protect.*, **65:** 199-204.

BASCOMB, S., MANFAI, M. (1998). Use of enzyme tests in characterisation and identification of aerobic and facultatively anaerobic gram-positive cocci. *Clin. Microbiol. Rev*., **11:** 318-340.

BENNERMAN, TL. (2003). Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase-Positive Cocci That Grow Aerobically In Manual of Clinical Microbiology. 8 Ed. Murray PR., Baron EJ., JORGENSEN JH., PFALLER MA., YOLKEN RH., ed, ASM press, Washington U.S.A. **p.:** 384-404.

BENNETT, R.W., LANCETTE, G.A. (1998). *Staphylococcus aureus*. Chapter 12. In: FDA's Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Revision A.

BERGDOLL, M.S. (1989). *Staphylococcus aureus*. In: *Foodborne Bacterial Pathogenes*. DOYLE, M.P. (ed.). Marcel Dekker, New York, 463-523.

BESD-BIR. (2011). Http://www.besd-bir.org/turkiyekanatliistatistikleri.htm. Erişim tarihi: 05.03.2012

BHAKDI, S., TRANUM-JENSEN, J. (1991). Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Mol Biol. Rev*., **55(4):** 733-751.

BHARGAVA, K., WANG, X., DONABEDIAN, S., ZERVOS, M., DA ROCHA, L., ZHANG, Y. (2011). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in retail meat, Detroit, Michigan, USA. *Emreg. Infect. Dis*., **17(6):** 1135-7.

BHATİA, A., ZAHOOR, S., (2007). *Staphylococcus aureus* Enterotoxine: A Review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research,* **1(2):** 188-197.

BILGEHAN, H., (2002). klinik mikrobiyolojik tanı. *Barış Yayınları, İzmir*. **3:**495-504.

BİLGEHAN, H. (1990). Klinik Mikrobiyoloji. Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Infeksiyonları. Barış Yayınları, İzmir, 184-204.

BİLGEHAN, H. (2009) Staphylococcus. Özel Bakterioloji ve Bakteri Enfeksiyomları fakülteler kitabevi Barış yayınları. İzmir : 240-266.

BOER, E.DE. ZWARTKRUIS-NAHUIS JT, WIT B, HUIJSDENS XW, DE NEELING AJ. BOSCH T. (2009). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. *Int. J. Food Microbiol*., **134:** 52-60.

BOERLIN, P., KUHNERT, P., HUSSY, D., SCHAELLIBAUM, M. (2003). Methods for Identification of *Staphylococcus aureus* Isolated in Cases of Bovine Mastitis. *J. Clin. Microbiol.,* **41:** 767-771.

BRAKSTAD, O.G., AASBAKK, K., MAELAND, J.A. (1992). Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplication of *nuc* gene. *J. Clin. Microbiol*., **30(7):** 1654-1660.

BREMER, P.J., FLETCHER, G.C., OSBORNE, C. (2004). *Staphylococcus aureus*. Erişim:http://www.crop.cri.nz/home/research/marine/pathogenes/staphylococcus. Erişim tarihi 14.07.2011.

CAMPANAUD, P.J. (2006). Resistance aux Antibiotiques: L'etat D'urgence. Science & Vie. November 51-55.

CAN, H.Y., (2011). Farklı tip peynirlerde *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*'UN enterotoksin oluşturma yeteneği ile antibiyotik direncinin belirlenmesi. Ankara *Üniv. Vet. Fak. Sağ. Bil. Enst*., Doktora Tezi, Ankara.

CAPİTA, R., ASTORGA, A.M., ALONSO-CALLEJA, C., MORENO, B., & GARCİA-FERNANDEZ, M.C. (2002). Staphylococcal toxins in human disease. *J. Appl Bact*., s.: 101-107.

CHAMBERS, H.F. PENICILLINS. IN: MANDELL, G.L., BENNETT, J.E, DOLIN, R.(2005). Principles and Practise of Infectious Diseases. 6th ed. Philadelphia. Churchill Livingstone; p: 281-294.

CHARLIER, C., CRETENT, M., EYEN, S., LE LOIR, Y. (2009). Interaction between *Staphylococcus aureus* and lactic asid bacteria *Int J. Food Microbiol.,* **131:** 30-39.

CHEN, T., HSIAO, M., CHIOU, C., TSEN, H. (2001). Development and use of PCR primers for the investigation of C1, C2 and C3 enterotoxin types of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foodborne outbreaks. *Int. J Food Microbiol.,* **71:** 63-70.

CHEUNG, A.L., EBERHARDT, K., HEINRICHES, H.J. (1997). Regulation of protein A synthesis by the *sar* and *agr* loci of *Staphylococcus aureus. Infect. Immun*. **65:** 2243-2249.

CHIO, SM., KIM, S., KIM, C. (2003). multiplexPCR for the detection of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes and methicillin resistance a mong *Staphylococcus* species. *J. Korean Med Sci*. **18:** 631-6.

CLIMO, M.W., ARCHER, G.L., MONROE, S. (2003). Vancomycin-resistant Gram-positive pathogens: potential approaches for prevention and control, "Wenzel RP (ed): Prevention and control of Nosocomial Infections, 4th ed" kitabında p.: 169-85, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.

CLİNİCAL AND LABORATORY STANDARDS INSTİTUTE(CLSI). (çeviri: A.Başustaoğlu, Z. Gülay, İ. Köksal, M.A. Özinel, G. Söyletir, B. Sümerkan) Antimikrobik Duyarlılık Testleri için Uygulama Standartları; Onyedinci Bilgi Eki. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2007: 44-56.

COONEY, J., KIENLE, Z., FOSTER, T.J., O, TOOLE, P.W. (1993). The gamma-hemolysin locus of *Staphylococcus aureus* comprises three linked genes, two of which are identical to the genes for the F and S components of leukocidin. *Infect. Immun*., **61(2):** 768-771.

COWELL, N.A., HANSEN, M.T., LANGLEY, A.J., GRAHAM, T.M., BATES, J.R. (2002). Outbreak of staphylococcal enterotoxin food poisoning (Australia). *Commun. Dis. Inel*., **26:** 574-575.

DEVRIESE, LA. BAELE, M. VANEECHOUTTE, M. MARTEL, A. HAESEBROUCK, F. (2002). Identification and antimicrobial susceptibility *Staphylococcus chromogenes* isolates from intramammary infections of dairy cows. *Vet. Microbiol.*, **87:** 175-182.

DINGES, M.M., ORWIN, M.P., SCHLIEVERT, P.M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus. Clin. Microbiol., Rev*. **Jan:** 16-34.

DİZBAY, M (2012). Gram pozitif bakterilerde identifikasyon algoritması. www.klinik.org.tr/wp-content/uploads/2012/02/882011161232. Erişim tarihi: 05.03.2012.

DO CARMO, L.S., DIAS, R.S., LINARDI, V.R., DE SENA, M.J., DOS SANTOS, D.A., DE FARIA, M.E., PENA, E.C., JETT, M., HENEINE, L.G. (2002). Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* presents in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiol.*, **19:** 9-14.

DUIJKEREN, E., BOX, A.T.A., HECK, M.E.O.C., WANNET, W.J.B. VE FLUIT, A.C. (2004). Methicillin- Resistant Staphylococci Isolated from Animals, *Veterinary Microbiology*, **103:** 91-97.

DUMAN, T., (2007). Tavuk karkaslarından izole edilen *STAPHYLOCOCCUS*'ların virülans faktörleri ve antibiyotik dirençliliği. Gazi Üniv. Biology. Ana bilim dalı. Fen. Bil. Enst. Yüksek lisans Tezi, Ankara.

Erişim tarihi: 20.10.2011.
Erişim Tarihi: 27.12.2006.
Erişim: (htt://www.infeksiyon.org/Detail. Asp?ctg=25&Article=384)
Erişim: http://www.microrao.com/micronotes/ coagulase.pdf

EROL, İ. (2007). *Staphylococcus aureus*. In: Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi kitabı, Ed.: İ. Erol, Ankara, ISBN 978-975-00131-0-9, s.: 135-144.

EROL, İ., İŞERI, Ö. (2004). Stafilokokal enterotoksinler. *Vet. Fak. Derg*, **51:** 239-245, 2004.

EROL, İ., USCA, A. (1996). Donmuş piliç karkaslarından izole edilen koagulaz pozitif stafilokokların enterotoksin oluşturma yeteneklerinin SET-RPLA testi ile belirlenmesi. *A. Ü. Vet .Fak Derg*., **43(4):** 443-448.

ERSOY, D.Y., FIRAT, M., KUZUCU, Ç., BAYINDIR, Y., KARAASLAN, Ş., BILIŞIK, G., BUT, A. D. (2003). *İnönü ÜniV. Tıp. Fak Dergisi***.** hastane infeksiyonları. **10(3):** 133-137.

FANG, T.J. WEI, Q.K. LIAO, C.W. HUNG, M.J. WANG, T.H. (2003). Microbiological guality of 18˚C ready to eat food products sold in Taiwan. *Int. J. Food Microbiol,* **80:** 241-250.

FOSTER, T. (2003). Staphylococcus. Erişim: [http://gsbs.utmb.edu./microbook/ch012] 02.10.2011. Erişim tarihi: 05.03.2012.

FUEYO, J. M., MENDOZA, M.C., MARTIN, M.C. (2005). Enterotoxins and toxic shock syndrome toxin in *Staphylococcus aureus* recovered from human nasal carriers and manually handled foods:epidemiological and genetic findings. *Microb. Infect.*,**7:** 187-194.

FUEYO, J.M., MARTIN, M.C., GONZALES-HEVIA, M., MENDOZA, M.C. (2001), Enterotoxin Production and DNA Fingerprinting in *Staphylococcus aureus* Isolated from Human and Food Samples. Relation Between Genetic Types and Enterotoxins, *Int. J. Food Microbiol.*, **67**, 139-145.

GARRITY, G.M., BELL, J.A., LILBURN, T.G. (2004). Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition, Springer, Inc. New York, USA.

GIANNATALE, E.DI., PRENCIPE, V., TONELLI, A., MARFOGLIA, C., MIGLIORATI, G. (2011). Characterisation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food for human consumption. *Veterinaria Italiana*, **47(2):** 165-173.

GUNDOGAN, N., CITAK, S., YUCEL, N., DEVREN, A. (2004). Anote on the icidence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and chicken samples Meat science **69:** 807-810.

GÜLBANDILAR, A. (2006), Kütahya yöresinde Çeşitli Kaynaklardan Elde Edilen *Staphylococcus aureus* İzolatlarının Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Anadolu Ünv. Fen bilimler Enstitüsü, Biyolojı ana bilim dalı,Eskişehir.

GÜNDOĞAN, N., ÇİTAK, S. VE TURAN, E. (2006). Slime production, Dnase activity and antibiotik resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk, pasteurised milk and ice cream samples, *Food Control.,* **17:** 389-392.

HARTSTEİN, A.I., SEBASTİAN, T.J., STRAUSBAUGH, L.J., (2004): Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, "Mayhall CG (ed): Hospital Epidemiology and Infection Control, 3rded" kitabında s.471-94, Lippincott Williams and Wilkins.

HAUSLER, T. (2006). Viruse vs. Superbugs a Solution to the Antibiotics Crisis. 1se ed. Macmillan, U.S. p:16-30.

HAZARIWALA, A., SANDERS, Q., HUDSON, C.R., HOFACRE, C., THAYER, S.G., MAURER, J.J. (2002). Distribution of Staphylococcal enterotoxin genes among *Staphylococcus aureus* isolates from poultry and humans with invasive *Avian Dis.*, **46(1):** 132-136.

HIRSH, D.C., MACLACHLAN, N.J. WALKER, R.L. (2004). *Vet. Microbiol*., 2nd ed, Blackwell Publishing, Iowa, p: 153-160.

HURBER, H., ZIEGER, D., PFLÜGER, V., VOGEL, G., ZWEİFEL, C., STEPHAN, R. (2011). Prevalence and characteristics of methicillin resistant coagulase-negative staphylococci from live stonk, chicken carcasses, bulk tank milk, minced meat and contactpersons. *BMC Veterinary Research.,* **7:**6.

HUSEBY, M., SHI, K., BROWN, C.K., DIGRE, J., MENGISTU, F., SEO, K.S., BOHACH, G.A., SCHLIEVERT, P.M., OHLENDORF, D.H., EARHART, C.A. (2007). Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol*., **189(23):** 8719-8726.

ITO, H., YOSHIDA, H., BOGAKI-SHONAI, M., NIGA, T., HATTORI, H., NAKAMURA, S. (1994). Quinolone resistance mutations in the DNA Gyrase *gyrA* and *gyrB* genes of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother*., **38(9):** 2014-2023.

JAY, J.M. (1996). *Staphylococcus gastroenteritis*. 429-450. In: Modern Food Microbiology. 5th ed., New York.

JAY, J.M., LOESSNER, M.J., GOLDEN, D.A. (2005). Staphylococcal Gastroenteritis. In: Modern Food Microbiology, Seventh Edition. ISBN 0-387-23180-3, USA.

JONES, T.F., KELLUM, M.E., PORTER, S.S., BELL, M., SCHAFFNER, W. (2002). An outbreak of community-acquired foodborne illness caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Diseases.,* **8(1):** 82-84.

JORGENSEN, H.J., MORK, T., HOGASEN, H.R., RORVIK, L.M. (2005a). Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk Norway. *J. Appl. Microbiol*., **99:** 158-166.

JORGENSEN, H.J., MORK, T., RORVIK, L.M. (2005b). The occurrence of *Staphylococcus aureus* on a farm with small scale production of raw milk cheese. *J. Dairy Sci*., **88:** 3810-3817.

KAATZ, G.W., SEO, S.M., RUBLE, C.A. (1993). Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemothe*., **37(5):** 1086-1094.

KITAI, S., SHIMIZU, A., KAWANO, J., SATO, E., NAKANO, C., KITAGAWA, H., FUJIO, K., MATSUMURA, K., YASUDA, R., INAMOTO, T. (2005). Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* and enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in retail raw chicken meat throughout japan. *J. Vet. Med. Sci*., **67:** 269-274.

KLEVENS, R.M., MORRİSON, M.A., NADLE, J., PETİT, S., GERSHMAN, K., RAY, S., HARRİNSON, L.H., LYNFİELD, R., DUMİYATİ, G., TOWNES, J.M., CRAİG, A.S., ZELL, E.R., FOSHEİM, G.E., MCDOUGAL, L.K., CAREY, R.B., FRIDKIN, S.K., INVESTIGATORS, A.B.C.S.A.M., (2007). Invasive methicillin-resistant *Staphulococcus aureus* infections in the United States. JAMA **298:** 1763-1771.

KLOOSW, T.E., WOLFSHOHL, J.F. (1982). Identification of *Staphylococcus* species with the api staph.ident. system, *J. Clin. Microbiol*., **16:** 509-516.

KONEMA, E.W., ALLEN, S.D., JANDA, W.M., SHRECKENBERGER, P.C., WINN, W.C. (1997). The Gram-Positive Cocci: Part I: Staphylococci and Related Organisms: Color Atlas and Texttbook of Diagnostic Microbiology. Lippincott, 539-565, 786-798.

KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., JANDA, W.M., SCHRECKENBERGER, P.C., WINN, W.C. (1992). Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology", 4th Ed., *J.B Lippincott Company*., Philadelphia, **25:**435-466.

KONEMAN, M.D., AILLEN, S.D., SCHRECKENBERGER, P.C., JANDA, W.M., WINN, W.C. (1993). "Diagnostic microbiology", J.B. Lippincott Company, 423-425, 435-466.

KUDINHA, T., SMINGO, C. (2002) Prevalence of coagulase-negative *Staphylococci* in bovine mastitis in Zimbabwe, *Tydskr. S. Afr. Vet. Ver.*, **73:** 62-65.

KUNDAKÇI, A., YÜCEL, A., UYLAŞER, V., KONCA, R., CAN, S., Soğuk koşullarda Depolanan ve Satışa Sunulan Piliç Etlerinin Mikroflorası ve Kalitesi, II. Uluslar arası Gıda Sempozyomu Bildiri Kitabı, Bursa 1-3/Ekim 1991. :ss191-200.

KUTLU, D.S.B., (2006). Çeşitli klinik materyallerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında metisilin direnci ve E-test ile vankomisin MIC değerlerinin araştırılması. Uzmanlık tezi, *T.C. sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi,*. **21:** 4231-4234.

KÜÇÜKATEŞ, E., KOCAZEYBEK, B., KARAYEL, E. N., AYYILDIZ, A., ORDU, A., GÜLSOY, Ö., (2003). Stafilokok suşlarının kinolonlara duyarlılıkları. *Turk. Mikrobiyol. Cem. Derg*., **33:** 16-18.

KWON, N., PARK, K., JUNG, W., YOUN, H., LEE, Y., KIM, S., BAE, W., LIM, J., KIM, J., KIM, J., HONG, S., PARK, Y., (2006). Characteristics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from chicken meat and hospitalized dogs in korea and their epidemioligical relatedness. *Vet. Microbiol*., **117:** 304-312.

LADHANI, S. (2003). Understanding the mechanism of action of the exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*., **39:** 181-189.

LE LOIR, Y., BARON, F., GAUTIER, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research,* **2(1):** 63-76.

LEE, H.J. (2006). Occurrence of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* strains from cattle and chicken, and analysis of their *mecA*, *mecR1*, and *MecI* genes. *Vet. Microbiol*., **114:** 155-159.

LEE, J.H. (2003). Methicillin (Oxacillin)-resistance *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl. Environ. Microbiol*., **69(11):** 6489-6494.

LEVINSON, W., JAWETZ, E. (2003). Medical Microbiology 2 Immunology. 7th ed. Singapore.

LOWY, F.D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *The New Eng. J. Med*. 20: 520-531.

LOWY, F.D. (2003). Antimicrobial resistance: The example of *Staphylococcus aureus. J. Clin. Invest.,* **111(9):** 1265-1273.

MANNA, A., CHEUNG, A.L. (2001). Characterization of *sarR*, a modulator of *sar* expression in *Staphylococcus aureus. Infect. Immun*., **69:** 885-896.

MARSHALL, M.J., BOHACH, G.A., BOEHM, D.F. (2000). Characterization of *Staphylococcus aureus* beta-toxin induced leukotoxicity. *J-Nat-Toxins*, **9(2):** 125-38.

MEHROTRA, M., WANG, G., JOHNSON, W. M. (2000). Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *Clin. Microbiol.* 1032-1035.

MORANDI, S., BRASCA, M., ANDRIGHETTO, C., LOMBARDI, A., LODI, R. (2009). Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* strains from Italian dairy products. *Int. J. Microbiol*., **2009:** 501362.

MORANDI, S., BRASCA, M., ANDRIGHETTO, C., LOMBARDI, A., LODI, R. (2009). Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* strains from Italian dairy products. *Int. J. Microbiol*., **2009:** 501362.

MORANDI, S., BRASCA, M., LODI, R., CREMONESI, P., CASTIGLIONI, B., (2007). Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. *Vet. Microbiol*., **124:** 66-72.

MUNSON, S.H., TREMAINE, M.T., BETLEY, M.J., WELCH, R.A. (1998). Identification and characterization of Staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus. Infect. Immun*., **66(7):** 3337-3348.

MUNSON, S.H., TREMAINE, M.T., BETLEY, M.J., WELCH, R.A. (1998). Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus. Infect. Immun*., **66(7):** 3337-3348.

MURRAY, P.R., ROSENTHAL, K.S., KOBAYASHI, G.S., PFALLER, MA. (2002). Staphylococcus and related organisms. *Medical Microbiology.*, pp.: 202-216. 4th ed. St. Louis, Missouri., Mosby, Inc.

NASCIMENTO, JS., FAGUNDES, PC., PAIVA BRITO, MAV. SANTOS, K. FREIRE BASTOS, MC. (2005). Production of Bacteriocins by Coagulase-Negative *Staphylococci* Involved in Bowine Mastitis. *Vet. Microbiol.*, **106:** 61-71.

NAWAZ, M.S.,KHAN, A.A., KHAN, S.A., PAINE, D.D., POTHULURI, J.V., CERNIGLIA, C.E. (1999). Molecular characterization of erythromycin resistant avian Staphylococcus spp. Isolated from chickens. *Poul. Sci.,* **78:** 1191-1197.

NISHIJIMA, S., KOUROKAWA, I. (2002). Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from skin infections. *Int J Antimicrob Agents*., **19:** 241-243.

NORMANNO, G., CORRENTE, M., LA SALANDRA, G., DAMBROSIO, A., QUAGLIA, N.C., PARISI, A., GRECO, G., BELLACICCO, A.L., VIRGILIO, S., CELANO, G.V. (2007b). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in food of animal origin product Italy. *Int. j. Food Microbiol*., **117:** 219-222.

NORMANNO, G., *FIRINU*, A., VIRGILIO, S., MULA, G., DAMBROSIO, A., POGGIU, A., DECASTELLI, L., MIORN, R., SCUOTA, S., BOLZONI, G., DI GIANNATALE, E., SALINETTI, A.P., LA SALANDRA, G., BARTOLI, M., ZUCCON, F., PRİNO, T., SIAS, S., PARISI, A., QUACLIA, N.C., CELANO, G.V. (2005). *Coagulase positive Staphylococci and Staphylococcus aureus in food products marketed in Italy. Int. J. Food Microbiol.,* **98:** 73-79.

NORMANNO, G., FIRINU, A., VIRGILLIO, S., MULA, G., DAMBROSIO, A., POGGIU, A., DECASTELLI, L., MIORN, R., SCUOTA, S., BOLZONI, G., DI GIANNATALE, E., SALINETTI, A.P., LA SALANDRA, G., BARTOLI, M., ZUCCON, F., PRINO, T., SIAS, S., PARISI, A., QUACLIA, N.C. VE CELANO, G.V. (2005). Coagulase-Pozitive resistant Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in Food Products Marketed in Italy. *Int. J. Food Microbiol*., **98:** 73-79.

NORMANNO, G., LA SALANDRA, G., DAMBROSIO, A., QUAGLIA, N.C., CORRENTE, M., PARISI, A., SANTAGADA, G., FIRINU, A., CRISETTI, E., CELANO, G.V. (2007a). Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *Int. J. Food Microbiol*., **115:** 290-296.

NOVICK, R.P. (2003). Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol. Microbiol*., **48(6):** 1429-1449.

NOVISK, R.P., ROSS, H.F., PROJAN, S.J., KORNBLUM, J., KREISWIRTH, B., MOGHAZEH, S. (1993). Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by regulatory RNA molecule. *EMBO J*., **12:** 3967-3975.

OTALO,J.R. JUNAIDU, KABIR., CHUKWUDI, O. E. JARALATH, U.V. (2011). Multidrug resistant coagulase positive *Staphylococcus aureus* from live and slaughtered chickens in Zaria, Nigeria. *Int. J. Poul Scie.,* **10 (11):** 871-875.

ÖZTÜRK, R. (2002). Akılcı antibiyotik kullanımı ve erişkinde toplumdan edinilmiş enfeksiyonlar. **31:** 195-224.

PELISER, M.R., KLEIN, C. S., ASCOLI, K.R., ZOTTI, T.R., ARISILI, A. C.M. (2009). Occurrence of *Staphylococcus aureus* and Multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. *Brazilian J. Microbiol*., **40(1):** 145-148.

PELISER, M.R., KLEIN, C.S., ASCOLI, K.R., ZOTTI, T.R., MAISONNAVE ARISI, A.C. (2009). Ocurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. *Braz. J. Microbiol*., **40:** 145-148.

PESAVENTO, G., DUCCI, B., COMODO, N., LO NOSTRO, A. (2007). Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: A research for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Food Control.*, **18:** 196-200.

PREVOST, G., CRIBIER, B., COUPPIE, P., PETIAU, P., SUPERSAC, G., FINCK-BARBANCON, V., MONTEIL, H., PIEMONT, Y. (1995). Panton-Valentine Leukocidin and Gamma-Hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infect. Immun*., **63(10):** 4121-4129.

QI, Y., MILLER, K.J. (2000). Effect of low water activity on staphylococcal enterotoxin A and B biosynthesis. *J. Food Protect*., **63:** 473-8.

QUDDOUMİ, S.S., BDOUR, S.M. MAHASNEH, A.M. (2006). Isolation and characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from livestock and poultry meat. **56:** 155-161.

QUINN, PJ., CARTER, ME., MARKEY, B., CARTER, GR.. (2000). Clinical Veterinary Microbiology. 6rd ed, Grafos, S.A. Arte Sobre Papel. Spain p:118-126.

RAO, S. (2006). Coagulase test.

RHODEN, D.L., MILLER, J.M. (1995). Four year prospective study of STAPH-IDENT system and conventional method for refrence identification of *Staphylococcus Stomatococcus* and *Micrococcus* spp. *J. clin. Microbiol*., **33:** 96-98.

RICH, M., (2005). Staphylococci in animals: Prevalence, identification and antimicrobial susceptibility, with an emphasis on methicillin-resistant *S. aureus. Brlt. J. Biomed. Sci*., **62:** 98-105.

RILLA, N., MARTINEZ, B., RODRIGUEZ, A. (2004). Inhibition of methicillin-resistant Staphylococcus strain in Afuega'1 pitu cheese by the nisin Z-producing strain Lactococcus lactis subsp. Lactis IPLA 729. *J. Food Prot*., **67(5):** 928-933.

RYAN, KJ. (2004). Antimicrobial resistance. *Sherris Medical Microbiology*. Ed: RYAN, KJ, RAY, C.G, SHERRIS, J.C. 4. Ed., McGraw-Hill Companies U.S.A. **p.:** 215-227.

SAĞUN, E., ALİŞARLI, M. DURMAZ, H. (2003). Farklı Sıcaklıklarda Muhafazanın Çiğ Köftede *Staphylococcus aureus*' un Gelişimi ve Enterotoksin Üretimi Üzerine Etkisi, *Turk. J. Vet. Anim. Sci*., **27:** 839-845.

SARAVIA-OTTEN, P., MULLER, H.P., ARVIDSON, S. (1997). Transcription of *Staphylococcus aureus* fibronectin binding protein genes is negatively regulated by *agr* and *agr*- independent mechanism. *J. Bacteriol*., **170:** 4365-4372.

SCHLEIFER, K.H., PETER, H.A., NICHOLAS, S.M., SHARPE, M.E., HOLT, G.J., EDıTOR. (1984). Section 12, Gr(+) Cocci, Bergey's of Manual Systematic Bacteriology, Vol. 29 th Edition., *Williams and Wilkins*, Baltimor, London, Losangeles, Sydney. 1013-1035.

SCHLEIFER, K.H., KROPPENSTEDT, R.M. (1990). Chemical and molecular classification of *staphylococci. J. Appl. Bacteriol* ss**.:** 9-24.

SCHLIEVERT, PM., TRIPP, TJ., PETERSON, ML. (2004). Reemergence of Staphylococcal Toxic Shok Syndrome *J. Clin. Microbiol*., **42:** 2875-2876.

SCHMITZ, F.J., KREY, A., SADURSKI, R., VERHOEF, J., MILATOVIC, D., FLUIT, C. (2001). Resistance to tetracycline and distribution of tetracycline resistance genes in European *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Antimicrob. Chemother*., **47 :** 239-240.

SEO, K.S., BOHACH, G.A. (2007). Foodborne Pathogenic Bacteria. *Staphylococcus aureus*. In: *Food Microbiol.,* Third Ed, 493-518.

SHIMAMURA, Y., MURATA, M. (2008). Relationship among properties of *Staphylococcus aureus* isolated from retail foods and human hands and distribution of MRSA. *Food Science and Technology Research*, **14(5):** 513-518.

SILVA, J., PEREIRA,V., LOPES, C., CASTRO, A., GIBBS, P., TEİXEİRA, P. (2009). Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. *Food Microbiol*., **26(3):** 278-282.

SIMEAO DO CARMO, L., DIAS, R.S., LINARDI, V.R., SENA, M.J., SANTOS, D.A., FARIA, M.E., PENA, E.C., JETT, M., HENEINE, L.G. (2002). Food poisoning due to enterotoxigenic strain of *Staphylococcus* present in Minase cheese and raw milk in Brazil. *Food. Microbiol*., **19:** 9-14.

SOUSA, MA., LENCASTRE, H. (2004). Bridges from hospitals to the laboratory: genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *FEMS Immunol. Medical Microbiol*., **40:** 101-111.

SUNDSFJORD, A., SIMONSEN, G.S., HALDORSEN, B.C., HAAHEIM, H., HJELMEVOLL, S., LITTAUER, P., DAHL, K.H. (2004). Genetic methods for detection of antimicrobial resistance. *Acta Pathologica*, *Microbiologica et* Immunologica *Scandinavica* (*AMPIS*), **112:** 815-837.

SVETOVH, E.A., LEVCHUK, V.P., POKHILENKO, V.D., ERUSLANOV, B.V., MITSEVICH, E.V. MITSEVICH, I.P., PERELYGIN, V.V., STEPANSHIN, Y.G. (2008). Inactivating Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and other pathogens by use of bacteriocins OR-7 and E 50-52. J. Clin Microbiol., **46(11):** 3863-3865.

TEGMARK, K., KARLSSON, A., ARVIDSON, S. (2000). Identification and characterization of SarH1, a new global regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol*. **37:** 398-409.

THAM, T., HADJU, L.J., A comparison of six media isolation *S.aureus* from foods *Food Microbiol*, **4:** 133-146 (1997).

TINWEB, (2004). Deri ve yumuşak doku infeksiyonları.

TODAR, K. (2005). *Staphylococcus*. Erişim:http://www.textbookofbacteriology.net/staph.html. Erişim tarihi: 10.07.2011.

TOPÇU, A.W. (2002). Aminoglikozidler. Topçu, A.W, Söyletir, G., Doğanay, M.. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul; 214-222.

TSEN, H.Y., YU, G.K., WANG, K.C., WANG, S.J., CHANG, M.Y., LIN, L.Y. (1998). Comparison of the enterotoxigenic types, toxic shock syndrome toxin I (TSST-1) strains and antibiotic susceptibilities for enterotoxigenic ***Staphylococcus aureus*** strains isolated from food and clinical samples. *Food Microbio.,*. **15:** 33-41.

UDO, E.E., AL-BUSTAN, M.A., JACOB, L.E., CHUGH, T.D. (1999). Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci in restaurant workers from Kuwait city may be a potential cause of food poisoning. *J. Med. Microbiol*., **48:** 819-823.

ULUSOY, S. LEBLEBİCİOĞLU, H., USLUER, G., ULUSOY, S., (2003). Linolonlar. güncel bilgiler ışığında antibiyotikler, Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi; 407-415.

ÜNAL S. AKHAN S. (1996). Stafilokok infeksiyonları. Infeksiyon Hastalıkları Kitabı. Birinci baskı, Nobel Tıp Kitabevleri Đstanbul. 1996. ss 773-781.

ÜNAL, S. (2004) *Staphyococcus aureus*: Direnç mekanizmaları. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; s : 23-38.

ÜNAL, S., HOSKINS, J., FLOKOWITSCH, J.E., ERNIE WU, C.Y., PRESTON, D.A.,SKATRUD, P.L. (1992). Detection of methicillin-resistant staphylococci by using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol*., **30(7):** 1685-1691.

VANDERHAEGHEN, W., HERMANS, K., HAESEBROUCK, F., BUTAYE, P. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in food producing animals. *Epidemiol. Infect*., **138:** 606-625.

VILLARD, L., LAMPRELL, H., BORGES, E., MAURİN, F., NOEL, Y., BEUVİER, E., CHAMBA, J.F. KODJO, A. (2005), Enterotoxin D Producing Strains of *Staphylococcus aureus are Typeable by* Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE), *Food Microbiol.,* **22:** 261-265.

VOUNG, C., GOTZ, F., OTTO, M. (2000). Construction and characterization of an *agr* deletion mutant of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun*. **68:** 1048-1053.

WALDVOGEL, F.A., MANDELL, G.L., BENNET, J.L., DOLIN, R. EDS. (2000). *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococci Toxic Shock). In: Principles and Practice of Infectious Diseases. **2000:** 2069-2092.

WEI, H.L., CHIOU, C.S. (2002). Moleculer subtyping of *Staphylococcus aureus* from an outbreak associated with a food handlers. *Epidemiol. Infec.,* **128:** 15-20.

WESSE, JS., VAN DUİJKEREN E., (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology* **140:** 418-429.

WETTSTEIN, K., DESCLOUX, S., ROSSANO, A., PERRETENT, V., (2008). Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Switzerland: three cases of urinary tract infections in cats. Schweiz. Arch. Tierheilkd. **150:** 339-343.

WILKINSON B.J., 1997, Biology. The *Staphylococci* in Human Disease. Crossley K., Archer G.L. (eds), Newyork, Churchill Livingstone Inc., 1-38.

WINN, W., ALLEN, S., JANDA, W., KONEMAN, E., PROCOP, G.W., SCHRECKENBERGER, P.C., WOODS, GL. (2006). Gram Positive Cooci. Koneman' s Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Darcy P. Lippincott Williams. Baltimore: 623-671.

YARWOOD, J.M., SCHLIEVERT, P.M. (2003). Quorum senising in *Staphylococcus* infections. *J. Clin. Invest*. **112(11):** 1620-1624.

YILDIZ O, AYGEN B. Stafilokokların Antibiyotik Duyarlılığı ve Direnç Sorunu. İnfeksiyon Hastalıkları Serisi 2002; **5(3):**128-136.

YUCEL, N., CİTAK, S., BAYHUN, S. (2011). Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples and foods of animal origin. *Foodborne Path and Dis*. **8(3):** 427-431.

ZETOLA, N., FRANCIS, J.S., NUERMBERGER, E.L., BISHAI, W.R. (2005). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet. Infect. Dis.*, **5:** 275-86.

ZHANG, S., IANDOLO, J.J., STEWART, G.C. (1998). The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). *FEMS Microbiol. Lett*., **168:** 227-233.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı	: Alireza
Soyadı	: DAFE
Doğum yeri ve tarihi	: TABRİZ- 1982
Uyruğu	: İRANLI
Medeni durumu	: Bekar
İletişim adresi ve telefonu	: İran-Tabriz. Amir Kabir. cad. Sok. Razi 05319599838

II- Eğitimi

Yüksek Lisans	: 2009-2012 Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,Veterner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü
Üniversite	: 2001-2005 Tabriz Üniversitesi, Ziraat Mühendisliği
Ortaokul-Lise	: 1994-2001 Şahit Rezai Lisesi
İlkokul	: 1989-1994
Yabancı dili	: İngilizce

III- Ünvanları

IV- Bilimsel İgili Alanlar

Gıda Mikrobiyolojisi, süt hijyeni, süt ürünleri teknolojisi.

V- Verdiği Seminerler:

Sütte Plasmin Sistemi